(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090685 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2020.11.30**

(22) Дата подачи заявки
**2013.05.16**

(51) Int. Cl. ***C07H 3/02*** (2006.01)
***A61K 38/17*** (2006.01)
***A61K 47/50*** (2006.01)
***A61K 47/55*** (2006.01)
***A61K 47/62*** (2006.01)
***A61K 47/64*** (2006.01)

## (54) НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ОКСИМНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

(31) **61/647,814; 13/488,043**
(32) **2012.05.16; 2012.06.04**
(33) **US**
(62) **201790935; 2013.05.16**

(71) Заявитель:
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД (US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)**

(72) Изобретатель:
**Зикманн Юрген, Хайдер Штефан, Роттенштайнер Ханспетер, Турецек Петер (AT)**

(74) Представитель:
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к материалам и способам конъюгации водорастворимого полимера с окисленным углеводным компонентом терапевтического белка, включающим осуществление контакта окисленного углеводного компонента с активированным водорастворимым полимером в условиях, которые допускают конъюгацию. Конкретнее, настоящее изобретение относится к вышеупомянутым материалам и способам, в которых водорастворимый полимер содержит активную аминооксигруппу и в которых оксимная или гидразоновая связь образуется между окисленным углеводным компонентом и активной аминооксигруппой водорастворимого полимера, и при этом конъюгацию осуществляют в присутствии нуклеофильного катализатора.

202090685 A1

202090685 A1

# НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ОКСИМНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0001]** Настоящее изобретение относится к веществам и способам, предназначенным для конъюгации водорастворимого полимера с белком.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0002]** Получение конъюгатов с помощью образования ковалентной связи между водорастворимым полимером и терапевтическим белком может выполняться разнообразными химическими способами. ПЭГилирование лекарственных веществ полипептидной природы защищает их при циркуляции и улучшает их фармакодинамические и фармакокинетические профили (Harris and Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21). В процессе ПЭГилирования повторяющиеся мономеры этиленгликоля (полиэтиленгликоль (ПЭГ)) присоединяются к полипептидному лекарственному веществу. Молекулы ПЭГ обладают большим гидродинамическим объемом (в 5-10 раз больше размера глобулярных белков), имеют высокую растворимость в воде и высокую способность к гидратации, нетоксичны, неиммуногенны и быстро выводятся из организма. ПЭГилирование молекул может приводить к увеличению устойчивости лекарственных веществ к ферментативному расщеплению, увеличению периода полувыведения *in vivo*, снижению частоты дозирования, уменьшению иммуногенности, увеличению физической и термической стабильности, увеличению растворимости, увеличению устойчивости в жидкостях и снижению агрегации. Первые ПЭГилированные лекарственные вещества были одобрены FDA в начале 1990 гг. С тех пор FDA одобрило несколько ПЭГилированных лекарственных веществ для перорального, инъекционного и местного применения.

**[0003]** Полисиаловая кислота (ПСК), также именуемая как коломиновая кислота (КК), представляет собой встречающийся в природе полисахарид. Это вещество является гомополимером N-ацетилнейраминовой кислоты с $\alpha(2\rightarrow8)$ кетокислотной связью и содержит вицинальные диольные группы на невосстанавливающем

конце. Это вещество является отрицательно заряженным и представляет собой природный компонент организма человека. Этот вещество может быть легко получено, в больших количествах и с предварительно установленными физическими свойствами, из бактерий (патент США № 5846951). В связи с тем, что полученная с помощью бактерий ПСК является химически и иммунологически идентичной ПСК, синтезированной в организме человека, бактериальная ПСК неиммуногенна даже при связывании с белками. В отличие от других полимеров кислота ПСК способна к биодеградации. Было показано, что ковалентное связывание коломиновой кислоты с каталазой и аспарагиназой увеличивает ферментную стабильность в присутствии протеолитических ферментов или в плазме крови. Сравнительные исследования in vivo с полисиалированной и немодифицированной аспарагиназой выявили, что полисиалирование увеличивает период полувыведения данного фермента (Fernandes and Gregoriadis, Int J Pharm. 2001;217:215-24).

**[0004]** Обзор связывания производных ПЭГ с пептидами и белками представлен в статье Roberts et al. (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76). Одним подходом для связывания водорастворимых полимеров с терапевтическими белками является конъюгация полимеров посредством углеводных компонентов белка. Вицинальные гидроксильные (OH) группы углеводов в белках могут легко окисляться перйодатом натрия ($NaIO_4$) с образованием активных альдегидных групп (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, J Biol Chem 1971;246:1889-94). В дальнейшем полимер может соединяться с альдегидными группами углевода с помощью реагентов, содержащих, к примеру, активную гидразидную группу (Wilchek M and Bayer EA, Methods Enzymol 1987;138:429-42). Более поздняя технология предполагает использование реагентов, содержащих аминооксигруппы, которые реагируют с альдегидами с образованием оксимных связей (WO 96/40662, WO2008/025856).

**[0005]** Дополнительные примеры, описывающие конъюгацию водорастворимого полимера с терапевтическим белком, описаны в заявке WO 06/071801, в которой сообщается об окислении

углеводных компонентов фактора фон Виллебранда и последующем связывании с ПЭГ с применением методов химии гидразидов; в публикации патента США № 2009/0076237, в которой сообщается об окислении rFVIII, последующем связывании с ПЭГ и другими водорастворимыми полимерами (например, ПСК, ГЭК, декстраном) с применением методов химии гидразидов; в заявке WO 2008/025856, в которой сообщается об окислении разных факторов коагуляции, например, rFIX, FVIII и FVIIa, последующем связывании с, к примеру, ПЭГ с применением методов химии аминооксигрупп путем образования оксимной связи и в патенте США № 5621039, в котором сообщается об окислении FIX и последующем связывании с ПЭГ с применением методов химии гидразидов.

**[0006]** Недавно был описан улучшенный способ включающий осуществление мягкого окисления перйодатом сиаловых кислот до образования альдегидов с последующей реакцией с реагентом, содержащим аминоокси-группу, в присутствии каталитических количеств анилина (Dirksen A., and Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008;19,2543-8; и Zeng Y et al., Nature Methods 2009;6:207-9). Анилиновый катализ кардинально ускоряет оксимное связывание, допуская использование очень низких концентраций реагента. Применение нуклеофильных катализаторов также описано в статьях Dirksen, A., et al., J Am Chem Soc., 128:15602-3 (2006); Dirksen, A., et al., Angew chem. Int Ed., 45:7581-4 (2006); Kohler, J.J., ChemBioChem., 10:2147-50 (2009); Giuseppone, N., et al., J Am Chem Soc., 127:5528-39 (2005); and Thygesen, M.B., et al., J Org Chem., 75:1752-5 (2010).

**[0007]** Несмотря на то, что анилиновый катализ может ускорить оксимное связывание, обеспечивая короткое время реакции и применение низких концентраций аминоокси реагента, анилин обладает токсическими свойствами, которые должны быть учтены, например, при получении конъюгированного терапевтического белка, образующего основу фармацевтического препарата. К примеру, было показано, что анилин индуцирует метгемоглобинемию (Harrison, J.H.., and Jollow, D.J., Molecular Pharmacology, 32(3) 423-431, 1987). Показано, что долговременное включение анилина в диету крыс индуцировало образование опухолей в селезенке (Goodman,

DG., et al., J Natl Cancer Inst., 73(1):265-73, 1984). Исследования in vitro также показали, что анилин способствует индукции хромосомных мутаций и имеет потенциальную генотоксическую активность (Bombhard E.M. et Herbold B, Critical Reviews in Toxicology 35,783-835, 2005).

**[0008]** Эти факты сохраняют необходимость разработки веществ и способов для конъюгации водорастворимых полимеров с белками, которые улучшают фармакодинамические и фармакокинетические свойства белков при минимизации затрат, связанных с применением различных реагентов, и минимизации рисков для здоровья пациента-потребителя.

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0009]** В настоящем изобретении предложены вещества и способы для конъюгации полимеров с белками, которые улучшают фармакодинамические и/или фармакокинетические свойства белков при минимизации затрат, связанных с применением различных реагентов, и рисков для здоровья пациентов-потребителей, если реакция конъюгации катализируется нуклеофильным катализатором. В разных вариантах реализации изобретения предложены альтернативные катализаторы для замены анилина.

**[0010]** В настоящем раскрытии изобретения также представлена оптимизированная методика для получения различных реагентов водорастворимых полимеров-аминоокси линкеров, которые можно применять для конъюгации терапевтических белков, как описано в данном документе. Недавние исследования методом ЯМР показали, что если получение ПСК-аминоокси реагента выполняется при комнатной температуре, то на восстанавливающем конце ПСК могут проходить побочные реакции. Поэтому, в различных вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения новый процесс получения проводят при температуре в пределах 2-8°C. В одном варианте реализации ПСК-аминоокси реагент получают при 4°C в соответствии с процессом, описанным в данном документе. Кроме того, в настоящем раскрытии изобретения также предполагается очистка реагента с применением стадии хроматографической очистки (например, ИОХ) при температуре в пределах 2-8°C. Прохождение

нежелательных побочных реакций на восстанавливающем конце ПСК значительно снижается, когда весь процесс (химической реакции и очистки конъюгата методом ИОХ) проводится при температуре в пределах 2-8°С.

**[0011]** В одном варианте реализации в соответствии с настоящим раскрытием изобретения предложен способ конъюгации водорастворимого полимера с окисленным углеводным компонентом терапевтического белка, включающий осуществление контакта окисленного углеводного компонента с активированным водорастворимым полимером в условиях, позволяющих провести конъюгацию; указанный водорастворимый полимер содержит активную аминооксигруппу и выбран из группы, состоящей из: полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветленного ПЭГ, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), полисиаловой кислоты (ПСК), крахмала, гидроксиалкилкрахмала (ГАК), гидроксилэтилкрахмала (ГЭК), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформаля) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2′-этилтриметиламмония фосфата (МФК), причем этот водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, получают способом, включающим: а) инкубацию раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени между около 1 минутой и около 24 часами; температуру между около 2°С и около 8°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания; при этом образуется водорастворимый полимер,

содержащий активную аминооксигруппу; и b) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу методом, выбранным из группы, состоящей из: хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения при температуре между около 2°C и около 8°C; указанный углеводный компонент окисляется инкубированием с буферным раствором, содержащим окисляющий агент, выбранный из группы, состоящей из: перйодата натрия ($NaIO_4$), тетраацетата свинца ($Pb(OAc)_4$) перрутената калия (KRuO4); причем оксимная связь образуется между окисленным углеводным компонентом и активной аминооксигруппой водорастворимого полимера и, причем, образование указанной оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, состоящей из: о-аминобензойной кислоты, м-аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, сульфаниловой кислоты, о-аминобензамида, о-толуидина, м-толуидина, п-толуидина, о-анизидина, м-анизидина и п-анизидина.

**[0012]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор, содержащий окисленный водорастворимый полимер, и аминоокси линкер, содержащий активную аминооксигруппу, инкубируют при 4°C в течение 1 ч в отсутствие света и при перемешивании. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, очищают анионообменной хроматографией при температуре 4°C. В другом варианте реализации предложен вышеуказанный способ, в котором окисленный водорастворимый полимер представляет собой ПСК и окисляется при инкубации с $NaIO_4$.

**[0013]** В другом варианте реализации раскрытия изобретения предложен способ конъюгации водорастворимого полимера с окисленным углеводным компонентом терапевтического белка, включающий осуществление контакта окисленного углеводного компонента с активированным водорастворимым полимером в условиях, которые допускают конъюгацию; указанный водорастворимый полимер содержит активную аминооксигруппу и выбирается из группы, состоящей из: полиэтиленгликоля (ПЭГ),

разветленного ПЭГ, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), полисиаловой кислоты (ПСК), крахмала, гидроксиалкилкрахмала (ГАК), гидроксилэтилкрахмала (ГЭК), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформаля) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2′-этилтриметиламмония фосфата (МФК), причем водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, получают способом, включающим: a) инкубирование раствора, содержащего водорастворимый полимер с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между водорастворимым полимером и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени между около 1 минутой и около 24 часами; температуру между около 22°C и около 37°C; присутствие или отсутствие света, и наличие или отсутствие перемешивания; при этом образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу; и b) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из: хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения; указанный углеводный компонент окисляется при инкубации с буферным раствором, содержащим окисляющий агент, выбранный из группы, состоящей из перйодата натрия ($NaIO_4$), тетраацетата свинца ($Pb(OAc)_4$ ) и перрутената калия (KRuO4); при этом оксимная связь образуется между окисленным углеводным компонентом и активной аминооксигруппой водорастворимого полимера и, причем, образование указанной оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, состоящей из: о-аминобензойной кислоты, м-

аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, сульфаниловой кислоты, о-аминобензамида, о-толуидина, м-толуидина, п-толуидина, о-анизидина, м-анизидина и п-анизидина.

**[0014]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеприведенный способ, в котором раствор, содержащий водорастворимый полимер и аминоокси линкер, содержащий активную аминооксигруппу, инкубируют при 22°С в течение 2 ч в отсутствие света и при перемешивании. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор, содержащий водорастворимый полимер, и аминоокси линкер, содержащий активную аминооксигруппу, инкубируют при 22°С в течение 2 ч в отсутствие света и при перемешивании; указанный способ дополнительно включает стадию повышения температуры раствора до температуры между около 32°С и около 37°С и инкубацию дополнительно в течение 12-24 часов. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, включающий дополнительную стадию добавления дополнительного количества аминоокси линкера, содержащего активную аминооксигруппу, непосредственно перед повышением температуры. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, очищают методом, выбранным из группы, состоящей из: диализа, ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) и хроматографии при температуре 22°С. В другом варианте реализации изобретения предложенный вышеупомянутый способ дополнительно содержит стадию очистки водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из: диализа, УФ/ДФ и хроматографии при 4°С.

**[0015]** В разных вариантах реализации настоящего раскрытия изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором терапевтический белок выбран из группы, состоящей из: Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка С, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (ТФ), протеазы ADAMTS 13, ИЛ-1

альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЭПО, интерферона-альфа (ИФН-альфа), консенсусного интерферона, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбопоэтина (ТПО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина A, активина B, активина C, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора IA костного морфогенетического белка, рецептора IB костного морфогенетического белка, рецептора II костного морфогенетического белка, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, белка крипто, криптического белка, индуцированного цитокинами хемотаксического фактора 1 нейтрофилов, индуцированного цитокинами хемотаксического фактора 2α нейтрофилов, индуцированного цитокинами хемотаксического фактора 2β нейтрофилов, эндотелиального клеточного фактора роста β, эндотелина 1,

эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, аттрактанта нейтрофилов эпителиального происхождения, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора α1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептора α2 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, связанного с ростом белка, связанного с ростом белка α, связанного с ростом белка β, связанного с ростом белка γ, связывающего гепарин эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, фактора роста, полученного из гепатомы, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, ингибирующего лейкемию фактора, рецептора α ингибирующего лейкемию фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропоэтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина M (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, цепи A тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, цепи B тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора α тромбоцитарного фактора роста, рецептора β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующего фактора роста предшественников B-клеток, фактора стволовых клеток (ФСК), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста α, трансформирующего фактора роста β,

трансформирующего фактора роста β1, трансформирующего фактора роста β1.2, трансформирующего фактора роста β2, трансформирующего фактора роста β3, трансформирующего фактора роста β5, латентного трансформирующего фактора роста β1, связывающего белка I трансформирующего фактора роста β, связывающего белка II трансформирующего фактора роста β, связывающего белка III трансформирующего фактора роста β, тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазмогена урокиназного типа, активирующего белка фосфолипазы (PUP), инсулина, лектина рицина, пролактина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреостимулирующего гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α-галактозидазы, β-галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, белка Хумира (адалимумаба), белка Пролиа (деносумаба), белка Энбрел (этанерсепта), белка из Табл. 1 или их биологически активного фрагмента, производного или варианта.

**[0016]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор, содержащий начальную концентрацию терапевтического белка между около 0,3 мг/мл и около 3,0 мг/мл, корректируют до значения pH между около 5,0 и около 8,0 перед осуществлением контакта с активированным водорастворимым полимером. В одном варианте реализации изобретения начальная концентрация терапевтического белка составляет около 1,0 мг/мл, а pH составляет около 6,0.

**[0017]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором терапевтический белок приводят в контакт с требуемой избыточной концентрацией активированного водорастворимого полимера, причем избыточная концентрация находится между около 1-молярным и около 300-молярным избыточным количеством. В одном варианте реализации изобретения избыточная

концентрация составляет около 50-кратное молярное избыточное количество.

**[0018]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером в условиях, включающих период времени между около 0,5 часа и около 24 часами; температуру между около 2°C и около 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания. В одном варианте реализации изобретения условия включают период времени около 120 минут, температуру около 22°C, отсутствие света и наличие перемешивания.

**[0019]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором нуклеофильный катализатор добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации нуклеофильного катализатора между около 1,0 мМ и около 50 мМ, в условиях, включающих период времени между около 0,1 минуты и около 30 минутами; температуру между около 2°C и около 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания. В одном варианте реализации изобретения конечная концентрация нуклеофильного катализатора составляет около 10 мМ, а условия включают период времени до около 15 минут, температуру около 22°C, отсутствие света и наличие перемешивания.

**[0020]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором окисляющий агент добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации окисляющего агента между около 50 мкМ и около 1000 мкМ, в условиях, включающих период времени между около 0,1 минуты и около 120 минутами; температуру между около 2°C и около 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания. В одном варианте реализации изобретения конечная концентрация окисляющего агента составляет около 400 мкМ, а условия включают период времени около 10 минут, температуру около 22°C, отсутствие света и наличие перемешивания.

**[0021]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором конъюгацию водорастворимого полимера с окисленным углеводным компонентом терапевтического белка останавливают добавлением останавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из: L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, метабисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; причем останавливающий агент добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента между около 1 мМ и около 100 мМ, в условиях, включающих период времени между около 5 минутами и около 120 минутами; температуру между около 2°С и около 37°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания. В одном варианте реализации изобретения останавливающий агент является L-цистеином. В еще одном варианте реализации изобретения L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации около 10 мМ, а условия включают период времени около 60 минут, температуру около 22°С, отсутствие света и наличие перемешивания.

**[0022]** В другом варианте реализации предложен вышеприведенный способ, включающий: a) первую стадию, включающую корректирование значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH между около 5,0 и около 8,0, на которой концентрация терапевтического белка составляет между около 0,3 мг/мл и около 3,0 мг/мл; b) вторую стадию, включающую окисление одного или более углеводов терапевтического белка, причем окисляющий агент добавляют к раствору на первой стадии для получения конечной концентрации между около 50 мкМ и около 1000 мкМ в условиях, включающих период времени между около 0,1 минуты и около 120 минутами; температуру между около 2°С и около 37°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания; c) третью стадию, включающую осуществление контакта терапевтического белка с требуемой избыточной концентрацией водорастворимого полимера, причем

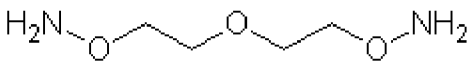
избыточная концентрация составляет количество между около 1-молярным избытком и около 300-молярным избытком в условиях, включающих период времени между около 0,5 часа и около 24 часами, температуру между около 2°C и около 37°C, присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания; d) четвертую стадию, включающую добавление нуклеофильного катализатора к раствору с третьей стадии, причем нуклеофильный катализатор добавляют до получения конечной концентрации между около 1 мМ и около 50 мМ в условиях, включающих период времени между около 0,1 минуты и около 30 минутами, температуру между около 2°C и около 37°C, присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания; e) пятую стадию, на которой терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером и нуклеофильным катализатором в условиях, которые допускают проведение конъюгации активированного водорастворимого полимера с одним и более окисленными углеводами терапевтического белка, указанные условия включают период времени между около 0,5 часа и около 24 часами, температуру между около 2°C и около 37°C, присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания; и f) шестую стадию, на которой конъюгация водорастворимого полимера с одним и более окисленными углеводами терапевтического белка на пятой стадии останавливают добавлением останавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, $Na_2S_2O_5$ (метабисульфита натрия), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; причем останавливающий агент добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации между около 1 мМ и около 100 мМ, в условиях, включающих период времени между около 5 минутами и около 120 минутами; температуру между около 2°C и около 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания. В другом варианте реализации изобретения начальная концентрация терапевтического белка на первой стадии составляет около 1 мг/мл, а pH составляет около 6,0; причем конечная концентрация

окисляющего агента на второй стадии составляет около 400 мкМ, а условия на пятой стадии включают период времени около 10 минут, температуру около 22 °С, отсутствие света и наличие перемешивания; причем избыточная концентрация на третьей стадии составляет около 50-кратный молярный избыток; при этом условия на третьей стадии включают период времени равный около 15 минутам, температуру около 22 °С, отсутствие света и наличие перемешивания; причем конечная концентрация нуклеофильного катализатора на четвертой стадии составляет около 10 мМ, а условия на четвертой стадии включают период времени около 15 минут, температуру около 22 °С, отсутствие света и наличие перемешивания; при этом условия инкубирования терапевтического белка с активированным водорастворимым полимером и нуклеофильным катализатором на пятой стадии включают период времени около 2 часов, температуру около 22 °С, отсутствие света и наличие перемешивания; при этом останавливающий агент на шестой стадии является L-цистеином, и причем L-цистеин добавляют до получения конечной концентрации около 10 мМ, а условия на шестой стадии включают период времени около 60 минут, температуру около 22 °С, отсутствие света и наличие перемешивания. В еще одном варианте реализации изобретения водорастворимый полимер является ПСК. В одном варианте реализации изобретения водорастворимый полимер является ПЭГ. В другом варианте реализации изобретения водорастворимый полимер является ГЭК. В еще одном варианте реализации изобретения водорастворимый полимер является ГАК. В другом варианте реализации изобретения ПСК содержит около 10-300 мономеров сиаловой кислоты. В еще одном варианте реализации изобретения терапевтический белок является FIX. В другом варианте реализации изобретения терапевтический белок является FVIIa. В еще одном варианте реализации изобретения терапевтический белок является FVIII.

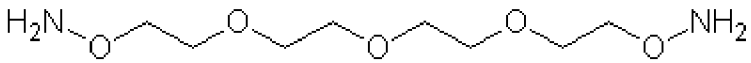
**[0023]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором окисляющий агент представляет собой перйодат натрия ($NaIO_4$).

**[0024]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором окисленный углеводный компонент терапевтического белка расположен на пептиде активации белка коагуляции крови.

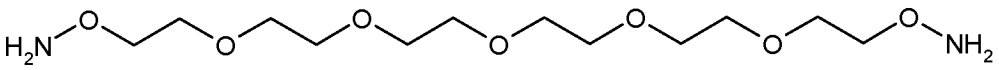
**[0025]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором ПСК включает активированный аминоокси линкер, выбранный из группы, состоящей из: a) 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминного линкера формулы:

**[0026]**  ,

**[0027]** b) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминного линкера формулы:

**[0028]**  и

**[0029]** c) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминного линкера формулы:

**[0030]** 

**[0031]** где ПСК окисляют инкубацией с окисляющим агентом до образования концевой альдегидной группы на невосстанавливающем конце ПСК.

**[0032]** В другом варианте реализации изобретения аминоокси линкер является 3-окса-пентан-1,5-диоксиамином.

**[0033]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором нуклеофильный катализатор применяют в концентрации между около 1 мМ и около 50 мМ. В другом варианте реализации изобретения нуклеофильный катализатор является м-толуидином. В еще одном варианте реализации изобретения м-толуидин вводится в реакцию конъюгации в концентрации около 10 мМ.

**[0034]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, дополнительно включающий стадию очистки конъюгированного терапевтического белка. В одном варианте реализации изобретения конъюгированный терапевтический белок очищают методом, выбранным из группы, состоящей из

хроматографии, фильтрации и осаждения. В еще одном варианте реализации изобретения хроматография выбрана из группы, состоящей из хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), ионообменной хроматографии (ИОХ), эксклюзионной хроматографии (ЭХ), аффинной хроматографии и обращенно-фазовой хроматографии. В одном варианте реализации изобретения используется антихаотропная соль на стадии загрузки хроматографического носителя и на стадии отмывания хроматографического носителя. В еще одном варианте реализации изобретения хроматография проводится на колонке. В одном варианте реализации изобретения колонка содержит хроматографическую смолу, выбранную из группы, состоящей из фенил-сефарозы FF и бутил-сефарозы FF. В еще одном варианте реализации изобретения смола запакована в колонке на высоту слоя между около 5 см и около 20 см.

**[0035]** В еще одном варианте реализации изобретения высота слоя составляет около 10 см. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, включающий одну и более стадий отмывания, на которых направление потока выбрано в восходящем направлении и при этом скорость потока находится между около 0,2 см/мин и около 6,7 см/мин. В одном варианте реализации изобретения скорость потока равна около 2 см/мин. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, включающий одну и более стадий элюирования, на которых направление потока выбрано в нисходящем направлении и при этом скорость потока находится между около 0,1 см/мин и около 6,7 см/мин. В одном варианте реализации изобретения скорость потока равна около 1 см/мин.

**[0036]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, дополнительно включающий концентрирование конъюгированного терапевтического белка методом ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ). В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором конечная концентрация терапевтического белка находится между около 0,5 и около 3 мг/мл. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором терапевтический белок

содержит в пределах около 5 и около 11 водорастворимых полимерных компонентов.

**[0037]** В еще одном варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором конъюгированный терапевтический белок очищают, применяя хроматографию, при этом антихаотропную соль используют на стадии загрузки и на стадии отмывания; этот способ включает одну и более стадий отмывания, на которых направление потока выбрано в восходящем направлении и при этом скорость потока находится между около 0,2 см/мин и около 6,7 см/мин, и одну и более стадий элюирования, на которых направление потока выбрано в нисходящем направлении и при этом скорость потока равна между около 0,2 см/мин и около 6,7 см/мин; способ дополнительно включает концентрирование конъюгированного терапевтического белка методом ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ).

**[0038]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором хроматография представляет собой хроматографию с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), при которой скорость потока на одной и более стадий отмывания составляет около 2 см/мин и при этом скорость потока на одной и более стадий элюирования составляет около 1 см/мин.

**[0039]** Модифицированный терапевтический белок получают вышеупомянутым способом, который также представлен в настоящем описании изобретения.

**[0040]** В одном варианте реализации настоящего раскрытия изобретения предложен способ получения водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, включающий: а) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени между около 1 минутой и около 24 часами; температуру между около 2°С и около 8°С; присутствие или отсутствие света, и наличие или отсутствие перемешивания; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий

активную аминооксигруппу; и b) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения, при температуре между около 2°C и около 8°C; указанный водорастворимый полимер выбирается из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветленного ПЭГ, PolyPEG® (Warwick Effect Polymers; Coventry, UK), полисиаловой кислоты (ПСК), крахмала, гидроксиалкилкрахмала (ГАК), гидроксилэтилкрахмала (ГЭК), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформаля) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2′-этилтриметиламмония фосфата (МФК), таким образом образуется оксимная связь между водорастворимым полимером и аминоокси линкером.

**[0041]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором образование оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, состоящей из о-аминобензойной кислоты, м-аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, сульфаниловой кислоты, о-аминобензамида, о-толуидина, м-толуидина, п-толуидина, о-анизидина, м-анизидина и п-анизидина.

**[0042]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер является ПСК. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер является ПЭГ. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор, содержащий окисленный водорастворимый полимер, и аминоокси линкер, содержащий активную

аминооксигруппу, инкубируют при 4°С в течение 1 ч в отсутствие света и при перемешивании. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, очищают анионообменной хроматографией при температуре 4°С.

**[0043]** В еще одном варианте реализации настоящего раскрытия изобретения предложен способ получения водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, включающий: a) инкубирование раствора, содержащего водорастворимый полимер, с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между водорастворимым полимером и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени между около 1 минутой и около 24 часами; температуру между около 22°С и около 37°С; присутствие или отсутствие света, и наличие или отсутствие перемешивания; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу; и b) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения; таким образом образуется оксимная связь между водорастворимым полимером и аминоокси линкером.

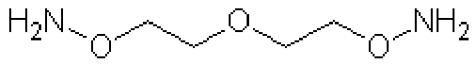
**[0044]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором образование указанной оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, состоящей из о-аминобензойной кислоты, м-аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, сульфаниловой кислоты, о-аминобензамида, о-толуидина, м-толуидина, п-толуидина, о-анизидина, м-анизидина и п-анизидина.

**[0045]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор, содержащий водорастворимый полимер, и аминоокси линкер, содержащий активную аминооксигруппу, инкубируют при 22°С в течение 2 ч в отсутствие света и при перемешивании. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором раствор,

содержащий водорастворимый полимер, и аминоокси линкер, содержащий активную аминооксигруппу, инкубируют при 22°С в течение 2 ч в отсутствие света и при перемешивании; указанный способ дополнительно включает стадию повышения температуры раствора до температуры между около 32°С и около 37°С и инкубацию дополнительно в течение 12-24 часов. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, включающий дополнительную стадию добавления дополнительного количества аминоокси линкера, содержащего активную аминооксигруппу, непосредственно перед повышением температуры.

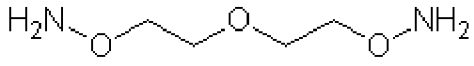
**[0046]** В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, в котором водорастворимый полимер, содержащий аминооксигруппу очищают методом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) и хроматографии при температуре 22°С. В другом варианте реализации изобретения предложен вышеупомянутый способ, дополнительно включающий стадию очистки водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из диализа, УФ/ДФ или хроматографии при 4°С.

**[0047]** В еще одном варианте реализации настоящего раскрытия изобретения предложен способ получения аминооксигруппы ПСК-аминоокси реагента, включающий: a) инкубирование раствора, содержащего окисленную ПСК с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между окисленной ПСК и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени 1 час; температуру 4°С; отсутствие света и наличие перемешивания; благодаря чему образуется ПСК, содержащая активную аминооксигруппу; и b) очистку ПСК, содержащей активную аминооксигруппу, методом анионообменной хроматографии при температуре 4°С; указанный активированный аминоокси линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминный линкер формулы:

[0048]  ;

[0049] таким образом образуется оксимная связь между ПСК и аминоокси линкером.

[0050] В еще одном варианте реализации настоящего раскрытия изобретения предложен способ получения аминооксигруппы ПСК-аминоокси реагента, включающий: a) инкубирование раствора, содержащего неокисленную ПСК с аминоокси линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые допускают образование стабильной оксимной связи между неокисленной ПСК и активированным аминоокси линкером, указанные условия включают период времени 2 часа; температуру 22°C; отсутствие света и наличие перемешивания; благодаря чему образуется ПСК, содержащая активную аминооксигруппу; и b) очистку ПСК, содержащей активную аминооксигруппу, методом диализа при температуре 22°C; указанный активированный аминоокси линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминный линкер формулы:

[0051]  ;

[0052] таким образом образуется оксимная связь между неокисленной ПСК и аминоокси линкером.

В еще одном варианте реализации настоящего раскрытия изобретения предложен способ конъюгации водорастворимого полимера с окисленным углеводным компонентом белка коагуляции крови, включающий осуществление контакта окисленного углеводного компонента с активированным водорастворимым полимером в условиях, допускающих проведение конъюгации; указанный белок коагуляции крови выбирается из группы, состоящей из Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), протеина C, проеина S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (ТФ) и протеазы ADAMTS 13 или их биологически активного фрагмента, производного или варианта; указанный водорастворимый полимер, содержащий активную

аминооксигруппу и выбранный из группы, состоящей из: полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветленного ПЭГ, полисиаловой кислоты (ПСК), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформаля) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2′-этилтриметиламмония фосфата (МФК); и указанный углеводный компонент окисляется инкубированием с буферным раствором, содержащим окисляющий агент, выбранный из группы, состоящей из перйодата натрия ($NaIO_4$), тетраацетата свинца ($Pb(OAc)_4$ ) перрутената калия (KRuO4); причем оксимная связь образуется между окисленным углеводным компонентом и активной аминооксигруппой водорастворимого полимера.

**ФИГУРЫ**

**[0053]** На Фигуре 1 показана первичная структура фактора коагуляции IX (SEQ ID NO: 1).

**[0054]** На Фигуре 2 показано связывание окисленного rFIX с аминоокси-ПСК.

**[0055]** На Фигуре 3 показан синтез водорастворимых ди-аминоксильных линкеров 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиамина.

**[0056]** На Фигуре 4 показано получение аминоокси-ПСК.

**[0057]** На Фигуре 5 показано наглядное представление конъюгатов ПСК-FIX, полученных в присутствии разных катализаторов методом ДСН-ПААГ-ЄЛЕКТРОФОРЕЗ. a) Сравнение анилина с м-тодуидином при применении разных концентраций. b) Сравнение анилина с о-аминобензойной кислотой, м-аминобензойной кислотой, п-аминобензойной кислотой, п-аминобензамидом и сульфаниловой кислотой. c) Сравнение анилина и м-толуидина с о-анизидином и м-анизидином.

**[0058]** На Фигуре 6 показан процент полисиалирования с разными нуклеофильными катализаторами.

**ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0059]** Фармакологические и иммунологические свойства терапевтических белков можно улучшить химической модификацией и конъюгацией с полимерными соединениями, такими как: полиэтиленгликоль (ПЭГ), разветленный ПЭГ, полисиаловая кислота (ПСК), гидроксиалкилкрахмал (ГАК), гидроксилэтилкрахмал (ГЭК), углевод, полисахариды, пуллулан, хитозан, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, дерматансульфат, крахмал, декстран, карбоксиметилдекстран, полиалкиленоксид (ПАО), полиалкиленгликоль (ПАГ), полипропиленгликоль (ППГ), полиоксазолин, полиакрилоилморфолин, поливиниловый спирт (ПВС), поликарбоксилат, поливинилпирролидон, полифосфазен, полиоксазолин, сополимер полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимер полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформаль) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2′-этилтриметиламмония фосфат (МФК). Свойства получаемых конъюгатов обычно сильно зависимы от структуры и размера полимера. Поэтому полимеры с определенным и узким распределением размеров, как правило, предпочтительны в этой области. Синтетические полимеры, такие как ПЭГ, легко производятся с узким распределением размеров, тогда как ПСК можно очистить таким образом, что приводит к получению конечного препарата ПСК с узким распределением размеров. Кроме того, реагенты для ПЭГилирования с определенными полимерными цепями и узким распределением размеров представлены в продаже и коммерчески доступны по умеренным ценам.

**[0060]** Добавление растворимого полимера, например при полисиалировании, представляет собой один подход для улучшения свойств терапевтических белков, таких как белок коагуляции крови FIX, а также других белков коагуляции (например, VWF, FVIIa (см., например, публикацию США 2008/0221032A1, включенную в данный документ посредством ссылки) и FVIII).

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ**

**[0061]** В определенных вариантах реализации изобретения примерами вышеприведенных полипептидов и полинуклеотидов являются следующие терапевтические белки: ферменты, антигены, антитела, рецепторы, белки коагуляции крови, факторы роста, гормоны и лиганды. В определенных вариантах реализации изобретения терапевтический белок представляет собой белок коагуляции крови, такой как Фактор IX (FIX), Фактор VIII (FVIII), Фактор VIIa (FVIIa), Фактор фон Виллебранда (VWF), Фактор FV (FV), Фактор X (FX), Фактор XI (FXI), Фактор XII (FXII), тромбин (FII), белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевый фактор (ТФ) или протеаза ADAMTS 13. В одном варианте реализации изобретения терапевтический белок в соответствии с изобретением является гликопротеином или, в разных вариантах реализации изобретения, белком, который не является природно гликозилированным in vivo (например, белком, который не содержит сайт природного гликозилирования или белком, который не гликозилирован в клетке-хозяине перед проведением очистки).

**[0062]** В определенных вариантах реализации изобретения терапевтические белки представляют собой иммуноглобулины, цитокины, такие как: ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующий фактор-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), ЭПО, интерферон-альфа (ИФН-альфа), консенсусный интерферон, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбопоэтин (ТПО), ангиопоэтины, например, Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобные полипептиды человека ANGPTL 1-7, витронектин, фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенин, активин A, активин B, активин C, костный морфогенетический белок-1, костный морфогенетический белок-2, костный морфогенетический белок-3, костный морфогенетический белок-4, костный морфогенетический белок-5, костный морфогенетический белок-6, костный морфогенетический белок-7, костный морфогенетический белок-8, костный морфогенетический белок-9, костный морфогенетический белок-10, костный морфогенетический

белок-11, костный морфогенетический белок-12, костный морфогенетический белок-13, костный морфогенетический белок-14, костный морфогенетический белок-15, рецептор IA костного морфогенетического белка, рецептор IB костного морфогенетического белка, рецептор II костного морфогенетического белка, нейротрофический фактор головного мозга, кардиотрофин-1, цилиарный нейротрофический фактор, рецептор цилиарного нейротрофического фактора, белок крипто, криптический белок, индуцированный цитокинами хемотаксический фактор 1 нейтрофилов, индуцированный цитокинами хемотаксический фактор 2α нейтрофилов, индуцированный цитокинами хемотаксический фактор 2β нейтрофилов, эндотелиальный клеточный фактор роста β, эндотелин 1, эпидермальный фактор роста, эпиген, эпирегулин, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, фактор роста фибробластов 4, фактор роста фибробластов 5, фактор роста фибробластов 6, фактор роста фибробластов 7, фактор роста фибробластов 8, фактор роста фибробластов 8b, фактор роста фибробластов 8c, фактор роста фибробластов 9, фактор роста фибробластов 10, фактор роста фибробластов 11, фактор роста фибробластов 12, фактор роста фибробластов 13, фактор роста фибробластов 16, фактор роста фибробластов 17, фактор роста фибробластов 19, фактор роста фибробластов 20, фактор роста фибробластов 21, кислый фактор роста фибробластов, основный фактор роста фибробластов, рецептор α1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептор α2 нейротрофического фактора глиальной линии клеток, связанный с ростом белок, связанный с ростом белок α, связанный с ростом белок β, связанный с ростом белок γ, связывающий гепарин эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, фактор роста гепатомы, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста, фактор роста кератиноцитов, ингибирующий фактор лейкемии, рецептор α ингибирующего фактора лейкемии, фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейропоэтин, нейротрофин-3, нейротрофин-4,

онкостатин М (OSM), плацентарный фактор роста, плацентарный фактор роста 2, тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток, цепь А тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарный фактор роста АА, тромбоцитарный фактор роста АВ, цепь В тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарный фактор роста ВВ, рецептор α тромбоцитарного фактора роста, рецептор β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующий фактор роста предшественников В-клеток, фактор стволовых клеток (ФСК), рецептор фактора стволовых клеток, ФНО, включая ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующий фактор роста α, трансформирующий фактор роста β, трансформирующий фактор роста β1, трансформирующий фактор роста β1.2, трансформирующий фактор роста β2, трансформирующий фактор роста β3, трансформирующий фактор роста β5, латентный трансформирующий фактор роста β1, связывающий белок I трансформирующего фактора роста β, связывающий белок II трансформирующего фактора роста β, связывающий белок III трансформирующего фактора роста β, тимусный стромальный лимфопоэтин (ТСЛП), рецептор I типа фактора некроза опухолей, рецептор II типа фактора некроза опухолей, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, фактор роста эндотелия сосудов и химерные белки и их биологически и иммунологически активные фрагменты.

**[0063]** В определенных вариантах реализации изобретения терапевтические белки представляют собой альфа-, бета- и гамма-интерфероны, колониестимулирующие факторы, включая колониестимулирующие факторы гранулоцитов, факторы роста фибробластов, тромбоцитарные факторы роста, активирующий фосфолипазу белок (PUP), инсулин, растительные белки, такие как лектины и рицины, факторы некроза опухолей и родственные им аллели, растворимые формы рецепторов факторов некроза опухолей, рецепторы интерлейкинов и растворимые формы рецепторов интерлейкинов, факторы роста, такие как тканевые факторы роста, такие как TGFα или TGFβ и эпидермальные факторы роста, гормоны, соматомедины, гормоны пигментации, гипоталамические

высвобождающие факторы, антидиуретические гормоны, пролактин, хорионический гонадотропин, фолликулостимулирующий гормон, тиреостимулирующий гормон, тканевый активатор плазминогена и иммуноглобулины, такие как IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α-галактозидазу, β-галактозидазу, ДНКазу, фетуин, лютеинизирующий гормон, эстроген, кортикостероиды, инсулин, альбумин, липопротеины, фетопротеин, трансферрин, тромбопоэтин, урокиназу, ДНКазу, интегрины, тромбин, гематопоэтические факторы роста, лептин, гликозидазы, белок Хумира (адалимумаб), белок Пролиа (деносумаб), белок Энбрел (этанерсепт) и их фрагменты или любые гибридные белки, содержащие любые из вышеупомянутых белков или их фрагментов. В дополнение к вышеупомянутым белкам в следующей Табл. 1 представлены терапевтические белки, предполагаемые в настоящем изобретении:

**Таблица 1**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Пептид, секретируемый фолликулярными дендритными клетками | Ангиотензинпревращающий фермент | Представитель 6 семейства интерлейкина-1 | Герстатин |
| Дермокин | Антитромбин-III | Экспрессируемый простатой и яичками белок 2 | Белок 28, содержащий богатые лейцином повторы |
| Секреторный белок 1, родственный белку frizzled | Аполипопротеин B-100 | Секреторная фосфолипаза A2 группы XIIA | Белок с C-концом подобным LRRN4 |
| Эктодисплазин-A | Аполипопротеин D | Цепь коллагена альфа-3(V) | Белок 2, содержащий домен Ly6/PLAUR |
| Секреторный белок 2, родственный белку frizzled | Аполипопротеин E | Белок 1, подобный альфа-2-макроглобулину | Трансмембранный белок 81 |
| Резистин | Бета-1,4-галактозилтрансфераза 1 | Дерматопонтин | Белок 3, подобный миелиновому белку zero |
| Остеопонтин | Костный морфогенетический белок 7 | Белок, ассоциированный с хрящевой тканью | Гомолог белка notum |
| Секреторный белок 5, родственный белку frizzled | Субъединица B подкомпонента комплемента C1q | Белок эфиопского ежа | УДФ-глюкуронозилтрансфераза 3A2 |
| Секреторный белок 4, родственный белку frizzled | Альфа цепь C4b-связывающего белка | Белок 2 внеклеточного матрикса | Протокадгерин альфа-1 |
| Секреторный фосфопротеин 24 | Калретикулин | Желудочный мукопротеид | Фосфолипаза D4 |
| Глипикан-6 | Связывающий кортикостероиды глобулин | Интерлейкин-33 | Ретинолдегидрогеназа 10 |
| Секреторный белок 3, родственный белку frizzled | Карбоксипептидаза A1 | Костный морфогенетический белок 2 | Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин |

| | | | 14 |
|---|---|---|---|
| Хемокин 4 с мотивом C-C | Карбоксипептидаза A2 | Костный морфогенетический белок 6 | Трансмембранный белок 161A |
| Белок меланоцитов Pmel 17 | Эотаксин | Неохарактеризованный белок KIAA0564 | Трансмембранный белок 161B |
| Секреторный белок 1, родственный Ly-6/uPAR | Хемокин 13 с мотивом C-C | Белок Cerberus | Трансмембранный белок 182 |
| Бета-микросеминопротеин | Хемокин 18 с мотивом C-C | Углевод-сульфотрансфераза 8 | Белок FAM24B |
| Глипикан-4 | Хемокин 20 с мотивом C-C | Белок 3, подобный ассоциированному с контактином белку | Трансмембранный белок 52 |
| Представитель 15 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Стимулирующий рецептор 2, экспрессируемый на миелоидных клетках | Белок, подобный секреторной фосфолипазе A2 группы XIIB | Белок 4, содержащий домен суперсемейства мембранных переносчиков |
| Резистинподобный белок бета | Хемокин 2 с мотивом C-C | Кортиколиберин | УДФ-глюкуронозилтрансфераза 2A3 |
| Представитель 12 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Белок ig-h3, индуцируемый трансформирующим фактором роста бета | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 19 | Ассоциированный с одонтогенными амелобластами белок |
| SPARC | Лиганд CD40 | Белок C19orf10 неохарактеризованного семейства белков UPF0556 | Нейросекреторный белок VGF |
| Глипикан-5 | Корнеодесмозин | Хемокин 3 с мотивом C-X-C | Секретируемый фосфопротеин 2, 24 кДа |
| Гомолог антериального градиентного белка 2 | Фактор комплемента D | Цистатин-M | Белок FAM150B |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Гомолог 2 белка покрова | Хромогранин-А | Дефензин-5 | Фактор роста/дифференциации 9 |
| Глипикан-1 | Цепь альфа-1 (I) коллагена | Дефензин-6 | Белок 1, подобный кластерину |
| Белок 2, содержащий домен фактора фон Виллебранда А | Белок 18, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 18 | Белок 2, содержащий домены трансмембранного белка и иммуноглобулина |
| Белок 1, индуцируемый механизмом передачи сигнала WNT1 | Белок 1, содержащий домен LCCL богатого цистеином секреторного белка | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 3 | Белок UNQ5810/PRO19627, содержащий лектиновый домен С-типа |
| Хемокин 1 с мотивом С-С | Цепь альфа-4 (IV) коллагена | Белок 4, родственный белку Dickkopf | Эпидидимальноспецифический липокалин-10 |
| Родственный SPARC модулярный кальцийсвязывающий белок 2 | Белок, ассоциированный с дифференциацией кератиноцитов | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 5 | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 8 |
| Представитель А семейства 11 с лектиновым доменом С-типа | Комплемент С4-В | Белок 1, родственный эпендимину млекопитающих | Эпидидимальноспецифический липокалин-8 |
| Секреторный белок 2, родственный Ly-6/uPAR | Цепь коллагена альфа-2(V) | Фибриллин-3 | Основный богатый пролином пептид Р-Е |
| Глипикан-3 | Комплемент С5 | Фетуин-В | Предполагаемый неохарактеризованный белок C10orf99 |
| Секретируемый и трансмембранный белок 1 | Цепь альфа-1 (VII) коллагена | Фактор роста фибробластов 6 | Неохарактеризованный белок C17orf77 |
| Экспрессируемый яичками белок с | Компонент комплемента С7 | Фактор роста кератиноцитов | Белок 2, подобный арилацетамиддеацет |

| | | | |
|---|---|---|---|
| последовательностью 264 | | | илазе |
| Глипикан-2 | Бета-цепь компонента комплемента C8 | Фактор роста/дифференциации 8 | Эпидидимальноспецифический липокалин-12 |
| Сериновая протеаза 23 | Гамма-цепь компонента комплемента C8 | Желудочный ингибирующий полипептид | Антиген 2 B-меланомы |
| Рибосомный белок L55 субъединицы 39S, митохондриальный | Цепь альфа-1 (XV) коллагена | Гликопротеиновый гормон бета-5 | Антиген 3 B-меланомы |
| Гомолог 3A белка NipSnap | Цепь альфа-1 (XVI) коллагена | Гранзим M | Гомолог 1 белка бычей семенной плазмы |
| Фибронектин | Цепь альфа-1 (XVIII) коллагена | Гастриносвобождающий пептид | Белок 3, подобный комплементу C1q |
| Нейдезин | Цепь альфа-1 (XIX) коллагена | Сериновая протеаза HTRA1 | Белок C2orf69 семейства UPF0565 |
| Рецептор 2 фактора роста фибробластов | Белок олигомерного матрикса хряща | Интерферон альфа-4 | Белок C6orf120 семейства UPF0669 |
| Карбоангидраза 6 | C-реактивный белок | Интерферон альфа-5 | Белок C6orf127, подобный колипазе |
| Выделенный из злокачественных опухолей мозга белок 1 | Колониестимулирующий фактор гранулоцитов | Интерферон альфа-7 | Неохарактеризованный белок C7orf69 |
| Родственный SPARC модулярный кальцийсвязывающий белок 1 | Колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 7 | Белок, подобный рецептору тромбоцитарного фактора роста |
| Белок амилоида бета A4 | Белок CYR61 | Представитель 10 суперсемейства иммуноглобулинов | Хондроадгеринподобный белок |
| Представитель 6 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок, подобный рецептору 1 компонентов комплемента | Белок массой 21 кДа, содержащий протеазо-ассоциированный домен | Предполагаемый неохарактеризованный белок |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | UNQ6490/PRO21339 |
| Субъединица 1 рецептора B-типа гамма-аминомасляной кислоты | Фактор роста стволовых клеток; Лектин C-типа, секретируемый лимфоцитами | Белок FAM108A1, содержащий домен абгидролазы | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6493/PRO21345 |
| Про-нейрегулин-1, мембраносвязанная изоформа | ЦМФ-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 9 | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ5815/PRO19632 |
| Гликопротеиновый гормон альфа-2 | Дипептилпептидаза 4 | Рецептор интерлейкина-9 | Цистатин-A |
| Белок 1, подобный мембранной металло-эндопептидазе | Дентинный сиалофосфопротеин | Интерлейкин-9 | Ингибитор R3HDML пептидазы |
| Белок A, подобный рецептору Fc | Эндотелин-1 | Цепь B ингибина бета | Цистатин-9 |
| Белок, подобный хемокину 4 с мотивом C-C | Эфрин-B1 | Ингибитор сериновой протеазы типа 2 Kazal | Представитель 5 семейства с DAN доменами |
| Рецептор 1, содержащий домен эпителиального дискоидина | Белок, подобный эпидермальноспецифической сериновой протеазе | КМБ-связывающий эндотелиальный регуляторный белок | Белок 1, подобный связывающему инсулиноподобный фактор роста белку |
| Муцин-1 | EMILIN-1 | Ассоциированный с кератиноцитами белок 2 | Эпидидимальный белок 1 связывающий сперматозоиды |
| Фактор роста эндотелия сосудов A | Эндоплазмин | Субъединица альфа-1 ламинина | Элафин |
| Фибулин-1 | Рецептор 3 эфрина A-типа | Хемотаксин-2 лейкоцитарных клеток | Белок FAM55A |
| Рецептор пролактина | Рецептор 6 эфрина B-типа | Желудочная триацилглицеринлипаза | Фактор роста/дифференциации 6 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Пропротеинконвертаза субтилизина/клексина 6 типа | Белок 1, содержащий домен гликозилтрансферазы 1 | Белок 3, содержащий богатый лейцином повтор и гомологичный кальпонину домен | Белок 1, содержащий домен глюкозо-фруктозо-оксидоредуктазы |
| Антиген CD209 | Фактор коагуляции X | Белок 2, родственный панкреатической липазе | Эритропоэтин |
| Цепь коллагена альфа-2(XI) | Фактор коагуляции VIII | Эпидидимоспецифическая альфа-маннозидаза | Глютатионпероксидаза 6 |
| Субъединица альфа рецептора колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов | Белок 7, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Белок 7, содержащий домен фибронектина III типа | Неохарактеризованный белок UNQ511/PRO1026 |
| Эластин | Фибриллин-2 | Ассоциированный с микрофибриллами белок 5 | Бета-дефензин 128 |
| Субъединица альфа рецептора интерлейкина-15 | Альфа-2-HS-гликопротеин | Фактор, ингибирующий клетки Мюллера | Интерлейкин-31 |
| Мидкин | Фактор роста фибробластов 10 | Матриксная металлопротеиназа-21 | Интерлейкин-34 |
| Интегрин альфа-7 | Цепь альфа фибриногена | Матриксная металлопротеиназа-17 | Белок 4, родственный калликреину плазмы |
| Муцин-4 | Цепь бета фибриногена | Матриксная металлопротеиназа-20 | Эпидидимальноспецифический липокалин-9 |
| Пептидилглицин-альфа-амидирующая монооксигеназа | Белок 1, ассоциированный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа | Субъединица гамма N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы | кДНК FLJ60957, в значительной степени подобная секреторному белку 4, родственному белку frizzled |
| Аполипопротеин A-I | Гастрин | Мультимерин-2 | Представитель M липазы |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Протеогликан 4 | Цепь альфа гликопротеиновых гормонов | Промотилин | CLECSF12 |
| Представитель 25 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Субъединицы альфа/бета N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы | Белок 3 внеклеточного матрикса, родственный белку FRAS1 | Секреторная фосфолипаза A2 предполагаемой неактивной группы IIC |
| Аттрактин | Гранзим A | Белок NELL1, связывающий протеинкиназу C | Сериновая протеаза MPN2 |
| Микросеминопротеин, ассоциированный с простатой | Белок, подобный фактору роста гепатоцитов | Белок NELL2, связывающий протеинкиназу C | Нетрин-5 |
| Альфа-амилаза 1 | Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 1 | Нейротрипсин | Белок 3, содержащий повтор NHL |
| Нейротрофический фактор мозга | Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 2 | Нейросерпин | Белок 2B, подобный олфактомедину |
| Представитель M семейства 4 с лектиновым доменом C-типа | Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 4 | Нидоген-2 | Овохимаза-2 |
| Рецептор колониестимулирующего фактора гранулоцитов | Представитель 10D суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок FAM108B1, содержащий домен абгидролазы | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ3029/PRO9830 |
| Инсулиноподобный фактор роста II | Интерферон альфа-1/13 | Нейротрофин-4 | Овохимаза-1 |
| Молекула 1 клеточной адгезии, родственная карциноэмбриональному антигену | Белок 1, содержащий домен индуцированной интерферонами хеликазы C | Эпидидимальная секреторная глютатионпероксидаза | Предполагаемый бета-1-гликопротеин 7, связанный с беременностью |
| Представитель A семейства 7 с лектиновым доменом C- | Интерферон альфа-2 | Секреторная фосфолипаза A2 группы | Гомолог 2 овостатина |

| | | | |
|---|---|---|---|
| типа | | 10 | |
| CMRF35-подобная молекула 1 | Интерферон бета | Секреторная фосфолипаза A2 группы IID | Орексигенный нейропептид QRFP |
| Белок 4, подобный холиновому транспортеру | Интерферон гамма | Лактопероксидаза | Антиген 6K лимфоцитов |
| Белок A1, ассоциированный с легочным сурфактантом | Инсулиноподобный фактор роста IB | Эффектор апоптоза p53, родственный белку PMP-22 | Экспрессируемый простатой и яичками белок 1 |
| Сперминоксидаза | Белок индийского ежа | Плацентоспецифический белок 1 | Белок 1, подобный предполагаемой фосфолипазе B |
| ЦМФ-N-ацетилнейраминат-бета-1,4-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза | Молекула адгезии нервных клеток Белок, подобный белку L1 | Тубероинфудибулярный пептид из 39 остатков | Предполагаемый неохарактеризованный белок FLJ42147 |
| Калликреин-8 | Интерлейкин-13 | Проларгин | Отогелин |
| Активатор плазминогена тканевого типа | Интерлейкин-2 | Секретогранин-2 | Рибонуклеаза 8 |
| Пероксисомальная N(1)-ацетилспермин/спермидин-оксидаза | Представитель 2A семейства химотрипсинподобных эластаз | Белок 1, содержащий домен эндонуклеазы | Белок 2, подобный взаимодействующему с комплексом ядерной поры белку |
| Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDHHC4 | Цепь A ингибина бета | Семафорин-3B | Белок 1, подобный проактиваторному полипептиду |
| Белок-переносчик сложных эфиров холестерина | Ингибитор панкреатического секреторного трипсина | Соматостатин | Гомолог 2 белка spinster |
| Антиген гистосовместимости I класса HLA, цепь A-2 альфа | Представитель 21 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 2, подобный представителю 4 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок, подобный содержащему домен C фактора фон Виллебранда белку 2 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Цепь альфа-1 (II) коллагена | Тяжелая цепь H1 интер-альфа-ингибитора трипсина | Транскобаламин-1 | Уротензин-2B |
| Про-интерлейкин-16 | Тяжелая цепь H2 интер-альфа-ингибитора трипсина | Фактор «трилистника» 2 | Тетраспанин-18 |
| Рецептор лептина | Тяжелая цепь H3 интер-альфа-ингибитора трипсина | Тестикан-1 | Мембранный белок FAM159A семейства UPF0514 |
| Декорин | Простатспецифический антиген | Параоксоназа/лактоназа 3 сыворотки | Латерин |
| Фактор стромальных клеток 1 | Калликреин-4 | Толлоидоподобный белок 2 | Белок 7B, подобный метилтрансферазе |
| Тенасцин | Калликреин плазмы | Трипсин-2 | Белок TEX261 |
| Белок 12, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Регулятор 4 активируемого кальцием хлоридного канала | Белок 1, содержащий палец RING и домен SPRY | Гомолог 7, репарирующего алкилированную ДНК белка alkB |
| Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 13 | Белок 1, подобный бактерицидному/повышающему проницаемость белку | Белок 1, содержащий кальцийсвязывающий и биспиральный домен | Белок 6, содержащий домен трансмембранного белка emp24 |
| Цепь альфа поверхностного гликопротеина CD8 Т-клеток | Лептин | Белок Wnt-2 | Белок 5, родственный белку XK |
| Совместно амплифицируемый с EGFR и сверхэкспрессируемый белок | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 4 | Эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролаза 8 | Предполагаемый белок 7, содержащий V-образный и иммуноглобулиновый домены |
| Связанный с аутофагией белок 16-1 | Печеночная триацилглицеринлипаза | Белок Wnt-8b | Представитель 3 семейства инсулиноподобных факторов роста |
| Белок 3 рака молочной | Белок G6c локуса | УДФ-ГлкNАц:бетаГал- | Белок 1, подобный |

| | | | |
|---|---|---|---|
| железы с антиэстрогенной устойчивостью | комплекса антигена 6 лимфоцитов | бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 4 | взаимодействующему с комплексом ядерной поры белку |
| Кадгерин-23 | Эозинофильная лизофосфолипаза | Белок 1, содержащий домен EMI | Секретируемый фосфопротеин 1 |
| Колониестимулирующий фактор 1 макрофагов | Субъединица бета лутропина | Неохарактеризованный белок C6orf15 | Цепь альфа-5 (VI) коллагена |
| Фолатный рецептор альфа | Ассоциированный с микрофибриллами белок 1 | Коллектин-10 | Антиген 5 B-меланомы |
| Белок 8, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности | Нейротропный фактор мезэнцефальных астроцитов | Лигаза ACSBG2 длинноцепочечных жирных кислот-КоА | Белок 10A, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP |
| Белок LRSAM1 убиквитинпротеинлигазы E3 | Матриксный белок Gla | Белок индуцированного онкопротеином транскрипта 3 | Белок C6orf57 семейства UPF0369 |
| Молекула адгезии нервных клеток 1 | Коллагеназа IV типа массой 72 кДа | Ингибитор 15 пептидазы | Предполагаемый неохарактеризованный белок C10orf31 |
| Нейролигин-4, X-связанный | Стромелизин-1 | Богатый пролином кислый белок 1 | Предполагаемый неохарактеризованный белок C11orf45 |
| Нетрин-G1 | Коллагеназа нейтрофилов | Урокортин | Неохарактеризованный белок C12orf28 |
| Компонент PIG-T ГФИ-трансамидазы | Мезотелин | Трипсин-X3 (EC 3.4.21.4) | Неохарактеризованный белок C17orf67 |
| Лиганд Kit | Муцин-5AC | HHIP-подобный белок 2 | Бета-дефензин 121 |
| Белок, подобный белку Seizure 6 | Муцин-6 | Фракталкин | Бета-дефензин 130 |
| Представитель 7 семейства SLAM | Норрин | Белок Wnt-11 | Белок 2, связывающий нуклеотидную |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | триаду гистидина |
| Фактор некроза опухолей | Окситоцин-нейрофизин 1 | Белок Wnt-7a | Апелин |
| Уромодулин | Фактор роста бета-нервов | Белок 1 с FCH и двойным SH3 доменами | Плацентоспецифический белок 9 |
| Представитель 13 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Представитель 18 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Белок 2, родственный фактору роста гепатомы | Белок TD26, ассоциированный с гепатоцеллюлярной карциномой |
| Белок CREG1 | Нейротрофин-3 | Субъединица альфа интерлейкина-12 | Персефин |
| Белок 8, содержащий ЭФР-подобный домен | Субъединица A тромбоцитарного фактора роста | Белок KIAA1324 семейства UPF0577 | Регулируемый эндокриноспецифический белок 18 |
| Мультифункциональный белок 1, взаимодействующий с комплексом аминоацил-тРНК-синтетазы | Фосфопантотеноилцистеиндекарбоксилаза | Белок 9, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Белок 8, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей |
| ADAMTS-подобный белок 4 | Ингибитор 1 активатора плазминогена | Муцин-17 | Костный морфогенетический белок 8A |
| Фактор коагуляции XI | Ингибитор 2 активатора плазминогена | Лизосомальный белок NCU-G1 | Белок WFDC13 |
| Субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-22 | Энхансер 1 C-эндопептидазы проколлагена | Субъединица альфа-3 пролил-4-гидроксилазы | Белок Wnt-8a |
| Гомолог ауторегуляторного фактора 1 деформированного эпидермиса | Белок 2, содержащий трансмембранный и убиквитинподобный домен | Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза SDCCAG10 | Белок ENSP00000270642, содержащий Ig-подобный домен |
| Простагландин-H2-D-изомераза | Протеин-дисульфидизомераза | Ингибитор 16 пептидазы | Белок 15, содержащий домен абгидролазы |
| Альфа-1-антитрипсин | Фактор пигментного | Белок 4, родственный | Белок 9, подобный |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | эпителия | рецептору полиовирусов | рибонуклеазе |
| Альфа-1-антихимотрипсин | Пепсин А | Представитель 15 семейства 22 растворимых переносчиков | Неохарактеризованный белок C2orf66 |
| Ацил-КоА-связывающий белок | Гастриксин | ГФИ-инозит-деацилаза | Неохарактеризованный белок C17orf99 |
| Фактор комплемента B | Белок ежа Sonic | Трансмембранный белок 43 | Белок FAM150A |
| Субъединица бета хориогонадотропина | Белок I-альфа распознавания пептидогликана | Белок 2, родственный ангиопоэтину | Белок, подобный плацентоспецифическому белку 1 |
| Ядерный белок версикан | Бигликан | Белок 6, родственный ангиопоэтину | Неохарактеризованный белок C18orf20 |
| Рецептор эпидермального фактора роста | Индуцируемый пролактином белок | Арилсульфатаза K | Бета-дефензин 110 |
| Экто-NOX-дисульфидтиол антипортер 2 | Тромбоцитарный фактор 4 | Аугурин | Нейритинподобный белок |
| Гиалуронидаза-1 | Плазминоген | Сериновая протеаза 4, специфическая для мозга | Богатый гистидином на карбоксильном конце белок 1 |
| Белок-антагонист рецептора интерлейкина-1 | Параоксоназа/арилэстераза 1 сыворотки | Белок 1 монооксигеназы, подобной ДБГ | Представитель A семейства 2 с лектиновым доменом C-типа |
| Субъединица бета рецептора интерлейкина-6 | Щелочная фосфатаза, плацентарный тип | Неохарактеризованный белок C1orf56 | Белок 70, содержащий повторы богатые лейцином |
| Белок 1, подобный рецептору интерлейкина-1 | Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза B | Церебеллин-3 | Серпин A13 |
| Инсулин | Протеогликан костного мозга | Церебеллин-4 | Белок 17, содержащий домен BTB/POZ |
| Гликоделин | Основный богатый пролином | Белок C6orf126, | Неохарактеризованн |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | белок 1 слюны | подобный колипазе | ый белок C12orf53 |
| Белок, родственный паратироидному гормону | Белок C, ассоциированный с легочным сурфактантом | Неохарактеризованный белок C11orf83 | Представитель A семейства 9 с лектиновым доменом C-типа |
| Нурим | Паратироидный гормон | Неохарактеризованный белок C16orf89 | Белок 4, подобный комплементу C1q |
| Субъединица альфа-2 пролил-4-гидроксилазы | Компонент амилоида P сыворотки | Белок X2, подобный карбоксипептидазе | Молекула 4, подобная белку CMRF35 |
| Антиген CD276 | Секретогранин-1 | Белок, подобный цистатину-9 | Белок FAM151B |
| Белок 1 с богатым цистеином ЭФР-подобным доменом | Ядерный белок гепарансульфатпротеоглика на, связанный с базальной мембраной | Представитель 13 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок FAM108A2/A3, содержащий домен абгидролазы |
| Белок 1, содержащий домен CUB и sushi | Антилейкопротеиназа | Бета-дефензин 123 | Остеокрин |
| Фиколин-2 | Стабилин-1 | Бета-дефензин 132 | Трансмембранная протеаза, сериновая 11E2 |
| Белок 5, подобный Fc-рецептору | Внеклеточная супероксиддисмутаза [Cu-Zn] | Белок 1, подобный цитокину | Трансмембранный белок 14E |
| Белок GPR89 | Соматотропин | Белок 2, родственный белку Dickkopf | Трансмембранный белок 207 |
| Молекула A соединительной адгезии | Серпин B5 | Белок 1, подобный белку Dickkopf | Белок 1, подобный белку TOMM20 |
| Белок 8A, содержащий богатые лейцином повторы | Спондин-1 | Эпидидимальный секреторный белок E3-бета | Неохарактеризованный белок C3orf41 |
| Множественная инозитполифосфатфосфатаза 1 | Белок 3 структурной поддержки хромосом | Белок 3, содержащий ЭФР-подобный повтор и дискоидин-I-подобный | Белок 3A подчелюстной железы, |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | домен | регулируемый андрогенами |
| Нейропилин-1 | Синтаксин-1A | Белок FAM55D | Антиген 1 B-меланомы |
| Плексин-A4 | Тетранектин | Фактор роста фибробластов 17 | Неактивная карбоксилэстераза 4 |
| Плексин-B1 | Трансформирующий фактор роста бета-1 | Фактор роста фибробластов 22 | Белок 1 четверного боксового соединения |
| Периостин | Тироглобулин | Белок 2, связывающий фактор роста фибробластов | Белок HSN2 |
| Белок RIC-3 | Ингибитор 1 металлопротеиназы | Фактор роста/дифференциации 3 | Хуманин |
| Белок 2, подобный белкам SLIT и NTRK | Ингибитор 2 металлопротеиназы | GLIPR1-подобный белок 1 | Белок, подобный киелину/хордину |
| Модифицирующий сульфатазу фактор 1 | Ингибитор 3 металлопротеиназы | Ингибитор сериновой протеазы типа 6 Kazal | Белок C6orf186 семейства UPF0624 |
| Модифицирующий сульфатазу фактор 2 | Активатор плазминогена урокиназного типа | Интерлейкин-17B | Белок 4/6, подобный предполагаемому нейрофибромину 1 |
| Трансмембранная протеаза, сериновая 6 | Лактотрансферрин | Интерлейкин-17C | Белок, подобный пероксидазину |
| Лимфотоксин-альфа | Трипсин-1 | Интерлейкин-17D | SCO-спондин |
| Представитель 10B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 3B подчелюстной железы, регулируемый андрогенами | Белок 3 связи гиалуронана и протеогликана | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ9165/PRO28630 |
| Поверхностный рецептор активатора плазминогена урокиназного типа | Представитель 1A суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Гомолог белка 1 внешнего слоя вителлиновой мембраны | Представитель 3 семейства активируемых кальцием |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | регуляторов хлоридного канала |
| Ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий V-образный домен | Рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов | Субъединица бета хориогонадотропина, вариант 1 | Вероятная сериновая протеаза UNQ9391/PRO34284 |
| Глюкагон | Белок, связывающий витамин D | Белок 1, подобный лизоциму | Неохарактеризованный белок C4orf26 |
| N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза | Витронектин | Матриксная металлопротеиназа-28 | Неохарактеризованный белок C4orf40 |
| Сульфгидрилоксидаза 1 | Фактор фон Виллебранда | Нефронектин | Неохарактеризованный белок C5orf55 |
| Представитель 4 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок G5c локуса комплекса антигена 6 лимфоцитов | Белок 12, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP | Предполагаемый стимулирующий макрофаги белок MSTP9 |
| Белок, связывающий интерлейкин-18 | Цинк-альфа-2-гликопротеин | Белок 1, подобный олфактомедину | Неохарактеризованный белок C15orf61 |
| Родственный белку подобному IRRE белок 2 | Неохарактеризованный белок C14orf93 | Белок 2A, подобный олфактомедину | Химотрипсиноген B2 |
| Миелоид-ассоциированный маркер дифференциации | Ретиношизин | Сериновая протеаза 27 | Бета-дефензин 108A |
| Хордин | Альфа-1,3-маннозилтрансфераза ALG2 | Представитель 2 семейства 3A секретоглобинов | Бета-дефензин 111 |
| 1-ацил-sn-глицерин-3-фосфатацилтрансфераза гамма | Изоформа CRA_b представителя A семейства 11 с лектиновым доменом C-типа | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 2 | Предполагаемый белок 6, содержащий V-образный и иммуноглобулиновый домены |
| Рецептор конечного продуктспецифического дальнейшего гликозилирования | Белок 7, содержащий домен суперсемейства мембранных посредников | Белок 28, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Белок 3, подобный ингибитору сериновой протеазы типа 5 Kazal |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок 4, содержащий домен CARD семейства NLR | Трансмембранный нейрональный белок 1 с повтором богатым лейцином | Белок 2, подобный бактерицидному/повышающему проницаемость белку | Предполагаемый белок 2, подобный ингибитору сериновой протеазы типа 5 Kazal |
| Про-нейрегулин-2, мембраносвязанная изоформа | Субъединица 11 субкомплекса НАДН-дегидрогеназы [убихинон] 1 бета, митохондриальной | Фосфодиэстераза 3b, подобная кислой сфингомиелиназе | Представитель 7C семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз |
| Ассоциированный со сперматозоидами антиген 11A | Мембранный белок C1orf91 семейства UPF0546 | Ингибитор сериновой протеазы типа 7 Kazal | Бета-дефензин 131 |
| Гомолог белка 1, секретируемого ооцитами | Белок 10, родственный карбоангидразе | Нейрексофилин-4 | Бета-дефензин 134 |
| Альбумин сыворотки | Холецистокинин | Белок Wnt-9b | Бета-дефензин 136 |
| Кохлин | Коданин-1 | Гомолог B белка 16 гранул зимогена | Бета-дефензин 116 |
| Ингибитор протеазы C1 плазмы | Неохарактеризованный белок C6orf89 | Семафорин-3D | Белок FAM132A |
| Субъединица альфа рецептора интерлейкина-7 | Хондроитинсульфатглюкуронил-трансфераза | Аполипопротеин L4 | Белок FAM132B |
| Тяжелая цепь H5 интер-альфа-ингибитора трипсина | Белок 1, содержащий домен хитиназы | Трансмембранная протеаза, сериновая 11D | Бета-дефензин 115 |
| Тромбоцитарный фактор роста D | Трансмембранный белок C9orf7 | Белок 1, отвечающий за заболевание Скрейпи | Бета-дефензин 114 |
| Белок S100-A7 | Молекула 9, подобная белку CMRF35 | Белок, подобный предполагаемому аннексину A2 | Ингибитор сериновой протеазы типа 9 Kazal |
| Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 10 | Цитохром P450 2S1 | Костный морфогенетический белок 10 | Представитель N липазы |
| Белок, подобный антигену тубулоинтерстициального | Гомолог 3 белка Crumbs | Секретогранин-3 | Белок 3, родственный |

| | | | |
|---|---|---|---|
| нефрита | | | панкреатической липазе |
| Представитель 13B суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Представитель 7 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок 4, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Белок, экспрессируемый яичками, простатой и плацентой |
| Лигаза 5 длинноцепочечных жирных кислот-КоА | Белок ENED | Неохарактеризованный белок C1orf54 | Нейромедин-S |
| Клаудин-14 | Белок 4, родственный фактору H комплемента | Карбоксипептидаза A6 | Нейропептид S |
| Белок 20, содержащий богатые лейцином повторы | Представитель 3 семейства LGI с богатым лейцином повтором | Хемокин 19 с мотивом C-C | Белок C16orf38, подобный нейрональному пентраксину |
| Представитель 7 семейства интерлейкина-1 | Глиомедин | Хемокин 25 с мотивом C-C | Отолин-1 |
| Белок G5b локуса комплекса антигена 6 лимфоцитов | Белок 5, содержащий домен глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы | Представитель 2B семейства химотрипсинподобных эластаз | Белок, подобный фосфотазе железо/цинк пурпуровой кислоты |
| Ацетилхолинэстераза | Рецептор 113 вероятно связывающий G-белок | Белок CEI | Гомолог 1 овостатина |
| Амелогенин, изоформа X | Рецептор 114 вероятно связывающий G-белок | Неохарактеризованный белок C6orf1 | Белок A, родственный плазминогену |
| Ангиогенин | Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 4 | Неохарактеризованный белок C7orf34 | Полисераза-3 |
| Рецептор 2 сибиреязвенного токсина | Гремлин-1 | Ассоциированный с кератиноцитами белок 3 | Предполагаемый пептид YY-2 |
| Аннексин A2 | Представитель 17 подсемейства K калиевого канала | Неохарактеризованный белок C9orf47 | Предполагаемый пептид YY-3 |
| Аполипопротеин C-III | Белок 2, содержащий мотив KDEL | Цепь альфа-1 (VIII) коллагена | Белок 10, подобный рибонуклеазе |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Аполипопротеин L1 | Лайилин | Неохарактеризованный белок C18orf54 | Белок 12, подобный рибонуклеазе |
| Субъединица A подкомпонента комплемента C1q | Белок 8B, содержащий богатый лейцином повтор | Цистатинподобный белок 1 | Белок 13, подобный рибонуклеазе |
| Субъединица C подкомпонента комплемента C1q | Белок 8D, содержащий богатый лейцином повтор | Белок 2, содержащий домен C2 | Серпин A11 |
| Кальцитонин | Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 6 | Белок 1, содержащий домен DDRGK | Ингибитор 4 протеазы типа Kunitz |
| Растворимая активируемая кальцием нуклеотидаза 1 | Бета-1-гликопротеин 2, специфический для беременности | Белок FAM55C | Метеоринподобный белок |
| Хемокин 15 с мотивом C-C | Белок 1, содержащий домен Ly6/PLAUR | Цепь альфа-1 (XXVI) коллагена | Предполагаемая сериновая протеаза 2 яичек |
| Антиген CD97 | Белок 5, содержащий домен Ly6/PLAUR | Белок FAM19A2 | Бета-дефензин 112 |
| Контактин-4 | Гомолог N-концевого домена MLN64 | Белок FAM5B | Неохарактеризованный белок FLJ37543 |
| Комплемент C2 | Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов | Фактор роста фибробластов 5 | Белок FAM24A |
| Цепь коллагена альфа-6(IV) | 2-ацилглицерин-O-ацилтрансфераза 3 | Вероятная сериновая протеаза HTRA3 | Секреторный белок 4, родственный белку frizzled |
| Цепь коллагена альфа-2(VI) | Гомолог 1 митохондриального переносчика | Представитель 8 семейства интерлейкина-1 | Белок 2, подобный комплементу C1q |
| Цепь альфа-1 коллагена (XI) | Аполипопротеин L6 | Ингибитор сериновой протеазы типа 4 Kazal | Предполагаемый неохарактеризованный белок C17orf69 |
| Гомолог 1 белка Crumbs | Протокадгерин альфа-6 | Отоспиралин | Предполагаемый цистатин-13 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Цистатин-C | Протокадгерин гамма-A12 | Антимикробный пептид 2, экспрессируемый печенью | Бета-дефензин 109 |
| Дефензин 1 нейтрофилов | Потенциалозависимый водородный канал 1 | Гомолог 1 лизилоксидазы | Бета-дефензин 113 |
| Эндотелин-3 | Универсальная транс-ретинол-13,14-редуктаза | Гомолог 2 лизилоксидазы | Бета-дефензин 135 |
| Fc-рецептор иммуноглобулина эпсилон низкой аффинности | Белок 2 регулятор динамики микротрубочек | Белок 4, ассоциированный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа | Белок LOC136242, содержащий домен пептидазы S1 |
| Рецептор 3 фактора роста фибробластов | R-спондин-4 | Белок 2, подобный лизоциму g | Фактор роста/дифференциации 7 |
| Рецептор 4 фактора роста фибробластов | Белок 3 транспорта длинноцепочечных жирных кислот | Эндомуцин | Гомолог IgA-индуцируемого белка |
| Белок 6, связанный с остановкой пролиферации | Белок SEC22c миграции везикул | Нейропептид B | Предполагаемый белок 1, подобный липокалину 1 |
| Рецептор гормона роста | Клаудин-1 | Кинезинподобный белок KIF7 | Предполагаемая сериновая протеаза 29 |
| Бифункциональная УДФ-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза/N-ацетилманнозаминкиназа | Белок 3, содержащий богатый лейциновыми повторами и иммуноглобулинподобный домены | Иммуноглобулинподобный рецептор 2, ассоциированный с лейкоцитами | Белок LOC619207, содержащий домен предполагаемого богатого цистеином фагоцитарного рецептора |
| Представитель 8 суперсемейства иммуноглобулинов | Представитель 9 семейства SLAM | Кальцийзависимая фосфолипаза A2 | Белок, подобный секретоглобину |
| Цепь альфа рецептора интерлейкина-4 | Транстиретин | Адапторный белок проапоптозной каспазы | Предполагаемый стереоцилинподобны |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | й белок |
| Калликреин-14 | Серин/треонин-протеинкиназа 32B | Белок 1, подобный интегрину-бета | Представитель 2 семейства инсулиноподобных факторов роста |
| Калликреин-6 | Субъединица B тромбоцитарного фактора роста | Толлоидоподобный белок 1 | KIR2DL4 |
| Субъединица бета-3 ламинина | Ноггин | Ингибитор 3 протеазы типа Kunitz | Предполагаемый белок 1, подобный цинк-альфа-2-гликопротеину |
| Лейцил-цистиниламинопептидаза | Триптаза альфа-1 | Белок TMEM155 | Представитель 4 семейства инсулиноподобных факторов роста |
| Лектин-сериновая протеаза 1, связывающая маннан | Белок 14 с тетратрикопептидным повтором | Просалузин | Неохарактеризованный белок C2orf72 |
| Лектин-сериновая протеаза 2, связывающая маннан | Белок трансактивированного XTP3 гена B | Белок amnionless | Белок, подобный белку инициирующему репликацию |
| Липокалин нейтрофилов, ассоциированный с гелатиназой | Пальмитоилтрансфераза ZDHHC15 | Белок WFDC10B | Экспрессируемый простатой и яичками белок 3 |
| Нейропептид Y | Связывающий сперматозоиды белок 3 блестящей оболочки яйцеклетки | Белок 8, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP | Антиген 4 B-меланомы |
| Ядерный белок аггрекан | Белок 39, содержащий повторы богатые лейцином | Белок Wnt-5b | Предполагаемый неохарактеризованный белок C1orf191 |
| Белок B, ассоциированный с легочным сурфактантом | Панкреатическая триацилглицеринлипаза | Белок Wnt-7b | Белок, подобный бета-дефензину |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 108B |
| Белок 1, родственный рецептору полиовирусов | Трансмембранный белок 139 | Белок 2 связывающий блестящую оболочку яйцеклетки | Неохарактеризованный белок FLJ90687 |
| Ренин | Фактор, ингибирующий лейкемию | Белок, подобный связывающему домен SH3 белку 5 | Секреторный белок 2, родственный белку frizzled |
| Панкреатическая рибонуклеаза | Галектин-1 | Молекула адгезии адипоцитов | Основный богатый пролином пептид IB-1 |
| Семеногелин-1 | Хемокин 21 с мотивом C-C | Неохарактеризованный белок C12orf59 | Фактор роста фибробластов 16 |
| Молекула передачи сигнала активации лимфоцитов | Белок, подобный антигену CD5 | Белок, связывающий аполипопротеин A-I | Ингибитор сериновой протеазы типа 8 Kazal |
| Ингибитор механизма действия тканевого фактора | Углевод-сульфотрансфераза 9 | Клаудин-17 | Неохарактеризованный белок KIAA0495 |
| Ушерин | Белок, связывающий липополисахариды | Неактивная каспаза-12 | Белок 2, подобный основному белку тромбоцитов |
| Фактор роста фибробластов 23 | Богатый цистеином белок двигательного нейрона 1 | Неохарактеризованный белок C7orf58 | Серпин E3 |
| Субъединица альфа интерлейкина-23 | Фактор роста соединительной ткани | Цепь альфа-1 (XXVIII) коллагена | Рецептор CR1 |
| Эпидидимальный секреторный белок E1 | Гомолог белка закрывания глаз | Белок 4 дентинового матрикса | Секретируемый фосфопротеин 1 |
| ADAMTS-подобный белок 1 | Муцинподобный белок 1 | Неохарактеризованный белок C16orf48 | Индуцируемый стрессом секретируемый белок 1 |
| Хемокинподобный фактор | Фактор роста фибробластов 19 | Карбоксилэстераза 3 | Белок Wnt |
| Белок 7, содержащий ЭФР- | Белок 3, родственный | Белок FAM20B | Белок Wnt |

| | | | |
|---|---|---|---|
| подобный домен | фоллистатину | | (Фрагмент) |
| Тектоник-1 | Белок, взаимодействующий с белком ежа | ГТФаза 3 с петлей GPN | Предполагаемая сериновая протеаза LOC138652 |
| Трансмембранный белок 25 | Рецептор B интерлейкина-17 | Белок 1B, содержащий домен GRAM | Белок TOM1 |
| УДФ-ГалNAц:бета-1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1 | Регулятор ионного транспорта 5, содержащий домен FXYD | Белок биосинтеза фосфотидилинозитгликанового якоря класса U | Предполагаемый неохарактеризованный белок FLJ46089 |
| Интерлейкин-15 (ИЛ-15) | Эндотелиальная липаза | Субъединица альфа интерлейкина-27 | Предполагаемый неохарактеризованный белок C1orf134 |
| Белок 11, подобный множественным доменам эпидермального фактора роста | Белок 2 внеклеточного матрикса, подобный ЭФР-содержащему фибулину | Про-нейрегулин-4, мембраносвязанная изоформа | УДФ-ГлкNAц:бетаГал-бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 9 |
| Белок, подобный муцину и кадгерину | Отораплин | Нейрональный белок 3 с повтором богатым лейцином | Неохарактеризованный белок C11orf44 |
| Рибонуклеаза 4 | Секреторная фосфолипаза A2 группы 3 | Белок 2, регулируемый рецептором NMDA | Неохарактеризованный белок C12orf73 |
| Белок 3C, содержащий домен SH2 | Фосфолипаза A2 группы XV | НАДН-цитохром-b5-редуктаза 1 | Предполагаемый подобный цистатину-9 белок 2 |
| ЦМФ-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза | Представитель 14 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Белок 1, содержащий домен 7 болезни Паркинсона | Белок FAM108A5, содержащий предполагаемый домен абгидролазы |
| Трансмебранный белок 9 | Плексин-A2 | Белок 11, связывающий белок FK506 | Бета-дефензин 133 |
| Белок 2, содержащий основной домен четырех | Папилин | Представитель B семейства 12 с | Фиброзин-1 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| дисульфидных связей белка WAP | | лектиновым доменом C-типа | |
| Рецептор аденозина A3 | Прокинетицин-1 | Представитель F5 семейства 35 растворимых переносчиков | Вероятный фолатный рецептор дельта |
| Субъединица APH-1A гамма-секретазы | Рибонуклеаза 7 | Связывающий сиаловую кислоту подобный Ig лектин 12 | RPE-спондилин |
| Базигин | Ингибитор 1 протеазы типа Kunitz | Белок FAM19A3 | Белок ENSP00000346774, подобный белку NPIP |
| Белок 7, содержащий повтор бакуловирусов IAP | Спондин-2 | Белок 82, содержащий повтор WD | Предполагаемый прионный белок, специфический для яичек |
| Калуменин | Тестикан-2 | Белок 1, связывающий энхансер адипоцитов | Богатый пролином белок 1 |
| Альфа-S1-казеин | Неактивная сериновая протеаза PAMR1 | Белок 3, подобный ADAMTS | Предполагаемый неохарактеризованный белок FP248 |
| Циклин-L1 | Торсин-2A | Белок 80, содержащий биспиральный домен | Белок C8orf55 семейства UPF0670 |
| Фактор комплемента H | Вазогибин-1 | Экто-NOX-дисульфидтиол антипортер 1 | Предполагаемый белок 2, подобный цинк-альфа-2-гликопротеину |
| Хорионический гормон соматомаммотропина | Вазорин | Нейрональный регулятор роста 1 | Белок SPARC |
| Рецептор коксакивирусов и аденовирусов | Ксилозилтрансфераза 1 | Протеогликан 1 интерфоторецепторного матрикса | Отопетрин-1 |
| Представитель 2 семейства | Представитель 6 семейства | кДНК FLJ36603 fis, | кДНК FLJ55667, в |

| | | | |
|---|---|---|---|
| эктонуклеотидпирофосфатаз /фосфодиэстераз | эктонуклеотидпирофосфатаз /фосфодиэстераз | клон TRACH2015180, в значительной степени подобная секреторному белку 2, родственному белку frizzled | значительной степени подобная кислому и богатому цистеином секреторному белку |
| Белок альфа, подобный белку ERO1 | Онкостатин-M | Представитель H липазы | Представитель K липазы |
| Фактор коагуляции IX | Дерлин-1 | Муцин-19 (MUC-19) | Представитель C семейства 18 с лектиновым доменом C-типа |
| Рецептор III-B Fc-участка иммуноглобулина гамма с низкой аффинностью | Наследуемый полипротеин Env провируса HERV-FRD_6p24.1 | Белок гена-кандидата 2 чувствительности к псориазу 1 типа | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6125/PRO20090 |
| Фиколин-3 | Простазин | Интегральный мембранный белок 2A | Комплемент C3 |
| Белок 2, подобный Fc-рецептору | Трансмембранная протеаза, сериновая 11E | Белок SFT2B транспорта везикул | Цепь коллагена альфа-2(IV) |
| Трансмембранный белок FLRT3 с повтором богатым лейцином | Антиген гистосовместимости HLA I класса, цепь альфа Cw-16 | Белок 3A, содержащий домен фактора фон Виллебранда A | Неохарактеризованный белок UNQ6126/PRO20091 |
| Гельсолин | Ингибирующий Wnt фактор 1 | Гомолог белка shisa-2 | Серпиноподобный белок HMSD |
| Гранулизин | Натрийуретический пептид C-типа | Субъединица 3 комплекса сигнальной пептидазы | Экспрессируемый простатой и яичками белок 4 |
| Трансмембранный гликопротеин NMB | Ангиопоэтин-2 | Белок CD164, подобный сиаломуцину 2 | Цепь альфа-1 (XXII) коллагена |
| Гранулины | Дезоксирибонуклеаза гамма | Кадгерин-16 | Предполагаемый неохарактеризованный белок C13orf28 |
| Гепараназа | Карбоксипептидаза A5 | Кадгерин-19 | Цистатин-S |
| Участок цепи C Ig мю | Хемокин 14 с мотивом C-C | Церебеллин-2 | R-спондин-1 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Интерлейкин-1 альфа | Интерлейкин-5 | Трансмембранный белок C3orf1 | C8orf2 |
| Рецептор A интерлейкина-31 | Интерлейкин-10 | Белок 1 экваториального сегмента сперматозоида | Связывающий одоранты белок 2a |
| Молекула B соединительной адгезии | Хемокин 2 с мотивом C-X-C | Неохарактеризованный белок C6orf72 | Опиорфин |
| Липокалин-1 | Хемокин 5 с мотивом C-X-C | Неохарактеризованный белок C11orf24 | Белок, регулируемый андрогенами почек |
| Рецептор 6, связанный с содержащим повторы богатые лейцином G-белком | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 6 | Представитель 2 семейства ацил-КоА-синтетаз, митохондриальный | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ5830/PRO19650/PRO19816 |
| Белок 1, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета | Полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансферазы 1 | Белок SLC35A5, вероятный транспортер УДФ-сахаров | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6975/PRO21958 |
| Матрилин-3 | Фибулин-2 | Представитель A семейства 1 с лектиновым доменом C-типа | Тахикинин-3 |
| Белок 1, подобный миелиновому белку zero | Фиколин-1 | Представитель A семейства 3 с лектиновым доменом C-типа | Секретируемый фосфопротеин 1 |
| Белок 2, подобный нейробеахину | Цитокин SL | Представитель E семейства 4 с лектиновым доменом C-типа | Склеростин |
| Никастрин | Фоллистатин | Представитель G семейства 4 с лектиновым доменом C-типа | Белок 2, подобный ADAMTS |

| | | | |
|---|---|---|---|
| АДФ-рибозопирофосфатаза, митохондриальная | Белок 1 внеклеточного матрикса, родственный белку FRAS1 | Вероятная катион-транспортирующая АТФаза 13A4 | Белок LOC284297, содержащий домен богатого цистеином фагоцитарного рецептора |
| Протокадгерин-15 | Энамелин | Белок C15orf24 семейства UPF0480 | Триптаза бета-1 |
| Плацентарный фактор роста | Белок 1 связи гиалуронана и протеогликана | Связывающий сперматозоиды белок 4 блестящей оболочки яйцеклетки | Триптаза дельта |
| Белок O-связанной-маннозы-бета-1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы 1 | Представитель 3 подсемейства A рецепторов, подобных иммуноглобулину лейкоцитов | Резидентный белок ERp27 эндоплазматического ретикулума | Предполагаемый критический участок белка 9 синдрома кошачьего глаза |
| Вероятная гидролаза PNKD | Интерлейкин-17F | Трансмембранный белок C16orf54 | Белок 1, содержащий домен плексина |
| Плейотрофин | Акцессорный белок рецептора интерлейкина-1 | Цитохром P450 4F12 | Гомолог MC51L-53L-54L (Фрагмент) |
| Рецептор полиовируса | Ингибитор сериновой протеазы типа 5 Kazal | Цитохром P450 4X1 | COBW-подобный плацентарный белок (Фрагмент) |
| Рецептор ретикулона-4 | Калликреин-15 | Цитохром P450 4Z1 | Фактор 2, подобный рецептору цитокинов |
| Белок амилоида A сыворотки | Интерферон альфа-14 | Белок CREG2 | Бета-дефензин 103 |
| Глобулин, связывающий половые гормоны | Бета-1-гликопротеин 4, специфический для беременности | Представитель 9 подсемейства B гомологов DnaJ | Бета-дефензин 106 |
| Представитель 6 семейства SLAM | Коллагеназа 3 | Дипептидаза 3 | Гиалуронидаза-3 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок, ассоциированный с мембраной сарколеммы | Матриксная металлопротеиназа-16 | Мембранный белок FAM174A | Цепь альфа рецептора интерлейкина-28 |
| Белок 1, содержащий домен sishu, фактора фон Виллебранда A, ЭФР и пентраксина | Полипептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза | Белок 15, содержащий домен тиоредоксина | Белок, содержащий домен гликозилтрансферазы 54 |
| Связывающий тироксин глобулин | Прокинетицин-2 | Белок FAM19A4 | Хординподобный белок 1 |
| Белок 1, содержащий трансмембранный и биспиральный домен | Белок 3, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета | Аденозинмонофосфат-протеинтрансфераза FICD | Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ9370/PRO34162 |
| Трансмембранная протеаза, сериновая 3 | Соматолиберин | Белок, подобный пренилцистеиноксидазе | Рецептор нетрина UNC5B |
| Представитель 1°C суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 1, содержащий домен тромбоспондина типа 1 | Белок, подобный взаимодействующему с фитаноил-КоА-гидроксилазой белку | Рецептор FGFR-1 фактора роста фибробластов, секретируемая форма белка (Фрагмент) |
| Представитель 11B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Ангиогенный фактор 1 с G-вставкой и доменами FHA | Регулятор ионного транспорта 4, содержащий домен FXYD | Неохарактеризованный белок ENSP00000244321 |
| Серотрансферрин | Рецептор III типа TGF-бета | Фактор роста/дифференциации 11 | ECE2 |
| Триптаза бета-2 | Субъединица бета тиротропина | Нейротропный фактор церебрального дофамина | EPA6 |
| Белок YIPF5 | Неохарактеризованный белок C19orf36 | ГТФаза 2 с петлей GPN | Предполагаемый рецептор 1 растворимого интерлейкина 18 |
| Белок B/C, ассоциированный со | Белок 2, родственный комплементу C1q и фактору | Трансмембранный белок, индуцируемый гормоном | Белок FAM108A6, содержащий домен |

| | | | |
|---|---|---|---|
| связанным с везикулами мембранным белком | некроза опухолей | роста | предполагаемой абгидролазы |
| кДНК FLJ96669, в значительной степени подобная секретируемому белку Homo sapiens, кислому, богатому цистеином (остеонектин)(SPARC), мРНК | Представитель 5 семейства эктонуклеотидпирофосфатаз / фосфодиэстераз | Белок 2, содержащий домен глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы | Белок ENSP00000303034, подобный предполагаемому белку, содержащему V-образный и иммуноглобулиновый домен |
| кДНК FLJ77519, в значительной степени подобная мРНК секретируемого подобного frizzled белка Homo sapiens | Белок 2, подобный полипептид-N-ацетилгалактозаминилтрансферазе | Белок 1, содержащий домены WAP, kazal, иммуноглобулин, kunitz и NTR | Транскрипционный вариант 4 антигена созревания B-клеток (Представитель 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей) |
| Антиген дифференциации CD6 T-клеток | Белок-гомолог 1 белка Slit | Белок 1, содержащий мотив KDEL | Белок C3orf58 семейства UPF0672 |
| Пикакурин | Вариант гормона роста | Адипофилин | Метилтиорибоза-1-фосфатизомераза |
| Белок 1, подобный фибриногену | Белок 3, родственный ангиопоэтину | Белок, подобный лактазе | 17-бета-гидроксистероид-дегидрогеназа 13 |
| Интерлейкин-32 | Белок 7, родственный ангиопоэтину | Хондромодулин-1 | Аминопептидаза B |
| Матрилин-4 | Экто-АДФ-рибозилтрансфераза 5 | Цепь коллагена альфа-6(IV) | Дермицидин |
| Ассоциированный со сперматозоидами антиген 11B | Белок 11, родственный карбоангидразе | Белок 33, содержащий повторы богатые лейцином | Метеорин |
| Фактор коагуляции XII | Вероятная рибонуклеаза 11 | Белок 1, содержащий домен MANSC | Белок 7A, подобный метилтрансферазе |
| Гепцидин | Вероятная | Липокалин-15 | NL3 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | карбоксипептидаза X1 | | |
| Белок Klotho | Белок FAM3D | Арилсульфатаза I | N-ацетилтрансфераза 15 |
| Серглицин | Хемокин 14 с мотивом C-X-C | Фактор-кандидат развития мезодермы 2 | Эфрин-A4 |
| Томорегулин-2 | Бета-дефензин 127 | Белок 1, родственный белку Dickkopf | Белок Plunc |
| Хординподобный белок 2 | Бета-дефензин 129 | Подокан | Калликреин-11 |
| Представитель 6B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 2, содержащий домен богатого цистеином секреторного белка LCCL | Белок 1, содержащий домен фибронектина III типа | Сплайс-вариант x индуцируемого WNT1 секретируемого белка 1 (Фрагмент) |
| Трансмембранный белок C20orf30 семейства UPF0414 | Фактор роста фибробластов 21 | Нейротримин | Представитель 10 семейства интерлейкина-1 |
| Представитель C семейства 4 с лектиновым доменом C-типа | Альфа-L-фукозидаза плазмы | Обонятельный рецептор 10W1 | PLA2G2D |
| Белок C14orf159 семейства UPF0317, митохондриальный | Гастрокин-1 | Белок PARM-1 | Протеогликан 3 |
| Нетрин-G2 | Гастрокин-2 | Белок 2, содержащий домен PDZ | Инсулиноподобный пептид INSL5 |
| Металлоредуктаза STEAP2 | Глютатионпероксидаза 7 | Проэпирегулин | Белок 3, подобный олфактомедину |
| Белок 4, содержащий домен sushi | HHIP-подобный белок 1 | Белок 1, подобный белку 1 поликистозного заболевания почек | Внеклеточный гликопротеин лакритин |
| Белок YIF1B | Интерферон каппа | WLPL514 | Ретинолдегидрогена за 13 |
| Аполипопротеин M | Аполипопротеин C-I | Матриксная металлопротеиназа-26 | Дефензин 3 нейтрофилов |
| Цепь бета белка, связывающего C4b | Энхансер 2 C-эндопептидазы | Белок 2, подобный белку RELT | GLGQ5807 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | проколлагена | | |
| Цепь бета поверхностного гликопротеина CD8 Т-клеток | Фактор 1 определения левой-правой асимметрии | Представитель E3 семейства 35 растворимых переносчиков | TUFT1 |
| Белок 1, подобный хемокину 3 с мотивом C-C | Представитель 4 семейства LGI с богатыми лейцином повторами | Транспортер цинка ZIP9 | DRLV8200 |
| Фактор роста фибробластов 8 | Субъединица Abraxas комплекса BRCA1-A | Ноэлин-2 | IDLW5808 |
| Сиаломуциновый ядерный белок 24 | Белок 2 с лейциновой молнией | Белок 2, подобный белку Seizure 6 | UBAP2 |
| Лиганд 2 программируемой клеточной гибели 1 типа | Нейрексофилин-3 | Семафорин-3A | Белок 8, родственный C1q/TNF |
| Секретируемый и трансмембранный белок 1 | Остеомодулин | Семафорин-4C | KIR2DL4 (Фрагмент) |
| Белок 6, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Белок 1, содержащий домен ингибитора сериновой протеазы типа Kazal | Белок 14A, содержащий домен абгидролазы | Транскрипционный вариант 2 суперсемейства 2 хемокинподобных факторов |
| Белок 3, подобный рецептору гормона, подобного содержащему муцин ЭФР-подобному элементу | Белок 3, ассоциированный с акросомной мембраной сперматозоида | Белок 36, содержащий домен анкиринового повтора | Трансмембранный белок 1, связанный с кераноцитами |
| Ноэлин-3 | Представитель 1 семейства 3A секретоглобинов | Белок shisa-4 | GKGM353 |
| Связывающий одоранты белок 2b | Белок tsukushin | Нейромедин-U | MATL2963 |
| Уротензин-2 | Клаудин-2 (SP82) | Гомолог белка Nodal | NINP6167 |
| Витрин | Белок 2, родственный фактору комплемента H | Синаптогирин-2 | POM121-подобный белок |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок 3, индуцируемый механизмом передачи сигнала WNT1 | Белок, содержащий богатый лейцином повтор суперсемейства иммуноглобулинов | Белок 2, подобный белку 2, ассоциированному с ингибитором ангиогенеза 1, специфическому для головного мозга | RTFV9368 (SLE-зависимое повышение экспрессии 1) |
| кДНК FLJ75759, в значительной степени подобная фоллистатинподобному белку 3 Homo sapiens (секретируемый гликопротеин) (FSTL3), мРНК | Белок 1, взаимодействующий с рецептором nogo, содержащий богатый лейциновый повтор и иммуноглобулиноподобный домен | Белок 104, содержащий биспиральный домен | Белок 4, взаимодействующий с рецептором nogo, содержащий богатый лейциновый повтор и иммуноглобулиноподобный домен |
| Ангиотензинпревращающий фермент 2 | Родственный белку подобному IRRE белок 3 | Представитель 20 семейства L6 трансмембранных белков 4 | KCNQ2 |
| Адипонектин | Трансдуктор сигнала гематопоэтических клеток | Трансмембранный белок 107 | ELCV5929 |
| Белок 4, родственный ангиопоэтину | Субъединица бета фоллитропина | Трансмембранный белок 143 | KVVM3106 |
| Аполипопротеин A-V | Белок 3, ингибирующий активность меланомы | Трансмембранный белок 178 | ISPF6484 |
| Аспорин | Белок 4, содержащий повтор богатый лейцином | Трансмембранный белок 205 | LKHP9428 |
| Белок, повышающий проницаемость бактерий | Транспортер цинка 5 | Трансмембранный белок 41A | VNFT9373 |
| Белок 1, содержащий домен CUB | Нейрональный белок 1 с повтором богатым лейцином | Трансмембранный белок 50A | ACAH3104 |
| Белок 1 хрящевого промежуточного слоя | Апикальный эндосомальный гликопротеин | Трансмембранный белок 50B | RVLA1944 |
| Бета-Ала-Гис дипептидаза | Белок амилоида A-4 сыворотки | Интерлейкин-28B | Wpep3002 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Цепь альфа-1 (V) коллагена | Пробетацеллулин | Нейрональный пентраксин-2 | ZDHHC11 |
| Цепь альфа-1 (XXV) коллагена | Бета-1,4-галактозилтрансфераза 7 | Коллектрин | AGLW2560 |
| Эстрадиол-17-бета-дегидрогеназа 11 | 3-гидроксибутиратдегидрогеназа 2 типа | Трансмембранный белок 92 | TSSP3028 |
| Представитель 10 подсемейства C гомологов DnaJ | C1GALT1-специфический шаперон 1 | Трансмембранный белок 95 | RFVG5814 |
| Белок 6, содержащий ЭФР-подобный домен | Бета-казеин | Трансмембранный белок 9B | SHSS3124 |
| Цепь A фактора коагуляции XIII | Каппа-казеин | Вероятная карбоксипептидаза PM20D1 | MMP19 |
| Глюкозо-6-фосфатизомераза | Трансмембранный белок C2orf18 | Тетраспанин-12 | GSQS6193 |
| Регулирующий аппетит гормон | N-каталитическая цепь карбоксипептидазы | Тетраспанин-13 | VGPW2523 |
| Субъединица бета интерлейкина-12 | Антиген CD320 | Тетраспанин-15 | LMNE6487 |
| Интерлейкин-22 | Хондроитинсульфатсинтаза 1 | Трансмембранный белок UPF0513 | ALLA2487 |
| Интелектин-1 | Хондроитинсульфатсинтаза 2 | Митохондриальный разобщающий белок 4 | GALI1870 |
| Богатый лецином белок 1, инактивирующий глиому | Молекула 7, подобная белку CMRF35 | Полисераза-2 | FRSS1829 |
| Антиген 96 лимфоцитов | Гомолог 3 белка покрова | Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDHHC24 | MRSS6228 |
| Матрилизин | Короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза 3 | Связывающий сперматозоиды белок 1 блестящей оболочки яйцеклетки | GRPR5811 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Муцин-20 | Белок 4, подобный белку дельта | Связывающий сперматозоиды белок 2 блестящей оболочки яйцеклетки | AVLL5809 |
| Пропротеинконвертаза субтилизина/клексина 9 типа | Рецептор, родственный подобному Delta и Notch эпидермальному фактору роста | Субъединица 7 консервативного олигомерного комплекса Гольджи | CR1 C3b/C4b рецептор SCR9 (или 16) C-конц. экзона SCR=короткий консенсусный повтор |
| Белок распознавания пептидогликана | Долихолкиназа | Белок 2 рецептора адипонектина | PIKR2786 |
| Интерфероиндуцируемый белок 17 кДа | Белок 1, подобный эндотелинконвертирующему ферменту | Цепь C ингибина бета | Белок 3, подобный S100 кальцийсвязывающему белку A7 |
| Белок Wnt-4 | Интегральный мембранный белок 2B | Белок Brorin | GTWW5826 (белок LP5085) |
| Белок, подобный фактору 1 воспаления аллотрансплантата | Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 5 | Семафорин-3C | KTIS8219 (HCG2020043) |
| X-связанный белок 3, содержащий повтор Armadillo | Молекула адгезии, селективная для эндотелиальных клеток | Гепарансульфат-глюкозамин-3-O-сульфотрансфераза 2 | Белок 4 связи гиалуронана и протеогликана |
| Хондроитинсульфат-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1 | Сигнальный пептид, белок 1, содержащий домен CUB и ЭФР-подобный домен | Белок 1, подобный перекрывающемуся транскрипту рецептора лектинов | Микроновел |
| Хитотриозидаза-1 | Белок 3, родственный фактору комплемента H | SPARC-подобный белок 1 | SAMK3000 |
| Белок 1, содержащий домен белка клаудина | Прорелаксин H1 | Фибулин-7 | VFLL3057 |
| Эрлин-2 | Белок 1, родственный фоллистатину | Гомолог 1 белка HEG | CVWG5837 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок 1, содержащий домен гликозилтрансферазы 8 | Глобозид-альфа-1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1 | Белок 1, содержащий домен фибриногена C | VGSA5840 |
| Белок 1 мембраны Гольджи | Гамма-глутамилгидролаза | Представитель A фосфолипазы A1 | GHPS3125 |
| Рецептор 125 вероятно связывающий G-белок | Кадгерин-24 | Основный богатый пролином белок 2 слюны | GRTR3118 |
| Цепь альфа рецептора интерлейкина-20 | Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 3 | Белок 6, ассоциированный со сперматогенезом | PAMP6501 |
| Галектин-7 | Рецептор 56 связывающий G-белок | Белок SRPX2, содержащий повтор sushi | LTLL9335 |
| Лиганд 4 NKG2D | Белок 2, связывающий гиалуронан | Гомолог 1 белка скручивающей гаструляции | VCEW9374 |
| Оксидаза L-аминокислот | Связывающий прогепарин ЭФР-подобный фактор роста | Торсин-1B | AHPA9419 |
| Пролил-3-гидроксилаза 1 | Гликопротеин, богатый гистидином | Белок Wnt-5a | MDHV1887 |
| ГФИ-этаноламинфосфат-трансфераза 2 | Углевод-сульфотрансфераза 14 | Акрозинсвязывающий белок | HSAL5836 |
| ГФИ-этаноламинфосфат-трансфераза 3 | Цепь бета рецептора интерлейкина-20 | Представитель B семейства 18 с лектиновым доменом C-типа | LHLC1946 |
| Белок SCaMC-2 кальцийсвязывающий митохондриальный переносчик (белок 2 малый кальцийсвязывающий митохондриальный переносчик) | Представитель 3 семейства эктонуклеотидпирофосфатаз/фосфодиэстераз | Трансмембранный белок 4A, ассоциированный с лизосомами | Белок 3, ассоциированный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа (Лигандсвязывающий белок RYA3) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок A2, ассоциированный с легочным сурфактантом | Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 7 | Семафорин-3E | LPPA601 |
| Сплайсинг-фактор, белок 16 богатый аргинином/серином | Каллистатин | Амелобластин | PINK1 |
| Альфа-N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 6 | Белок 3B, содержащий домен фибронектина III типа | Белок 5, содержащий домен суперсемейства мембранных переносчиков | SERH2790 |
| Рецептор, родственный единому Ig IL-1 рецептору | Рецептор фактора, ингибирующего лейкемию | Ангиопоэтин-1 | FLFF9364 |
| Тектоник-3 | Гомолог B белка Lin-7 | Ангиопоэтин-4 | APELIN |
| Представитель 11 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Трансмембранный белок 1, родственный тиоредоксину | Белок 9, подобный множественным доменам эпидермального фактора роста | GLSH6409 |
| Представитель 19 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 32, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Фосфодиэстераза 3a, подобная кислой сфингомиелиназе | SFVP2550 |
| Пальмитоилтрансфераза ZDHHC9 | Белок 3, содержащий домен Ly6/PLAUR | ADAMTS-подобный белок 5 | RRLF9220 |
| Фибулин-5 | Представитель A семейства 14 с лектиновым доменом C-типа | Спексин | PTML5838 |
| Белковый Z-зависимый ингибитор протеаз | Гомолог белка cornichon | Предполагаемый трипсин-6 | VLGN1945 |
| Альфа-2-макроглобулин | Белок FAM151A | Прото-онкогенный белок Wnt-1 | AVPC1948 |
| Белок, родственный белку agouti | Белок 14, связывающий белок FK506 | Костный морфогенетический белок 3b | AWQG2491 |
| Панкреатическая альфа-амилаза | Нейропилин- и толлоидоподобный белок 2 | Костный морфогенетический | PSVL6168 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | белок 5 | |
| Натрийуретический пептид B | Протокадгерин бета-13 | Костный морфогенетический белок 8B | LCII3035 |
| Атриальный натрийуретический фактор | Пренилцистеиноксидаза 1 | Белок FAM26D | PPRR6495 |
| Нейтральная керамидаза | Пефлин | Фактор, родственный C1q | RLSC6348 |
| Бета-2-микроглобулин | Белок 1, подобный пептидил-пропил-цис-транс-изомеразе | Белок 1, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP | CSRP2BP |
| Костный морфогенетический белок 4 | Антиген стволовых клеток простаты | Церебеллин-1 | GLLV3061 |
| Биотинидаза | Гомолог 2 белковой вставки | Карбоксипептидаза O | GWSI6489 |
| Белок M130, фагоцитарного рецептора типа 1 богатого цистеином | Хитобиозилдифосфодолихол-бета-маннозилтрансфераза | Белок 2, подобный миелиновому белку zero (Эпителиальный V-образный антиген 1) | кДНК FLJ53955, в значительной степени подобная секреторному белку 4, родственному белку frizzled |
| Карбоксипептидаза B2 | Гомолог 1 белка sel-1 | Белок 1, подобный сериновой протеазе 1 | PPIF |
| Карбоксипептидаза Z | ProSAAS | Белок 70, содержащий биспиральный домен | VSSW1971 |
| Хемокин 5 с мотивом C-C | Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 9 | Хемокин 28 с мотивом C-C | KLIA6249 |
| Хемокин 7 с мотивом C-C | Белок 1, подобный белкам SLIT и NTRK | Неохарактеризованный белок C4orf29 | ALLW1950 |
| Хемокин 8 с мотивом C-C | Статерин | Белок 2, содержащий домен CUB | GVEI466 |
| Гликопротеин CD59 | Тестизин | Белок транскрипта 4, | ESFI5812 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | подобного белку Trem | |
| Фактор комплемента I | Белок 5, подобный белку трансмембранного канала | Неохарактеризованный белок C6orf58 | GNNC2999 |
| Кластерин | Трансмембранная протеаза, сериновая 4 | Хондроадгерин | AAGG6488 |
| Цепь альфа-2(I) коллагена | Супрессор метастаз KiSS-1 | Белок 2 хрящевого промежуточного слоя | HHSL751 |
| Цепь альфа-1(III) коллагена | Полипептид амилоида островковых клеток | Неохарактеризованный белок C10orf25 | Бета-дефензин 108B |
| Цепь альфа-1(IV) коллагена | Белок транскрипта 2, подобного белку Trem | Истмин-1 | Бета-дефензин 118 |
| Цепь альфа-3(IV) коллагена | Белок 12, содержащий домен тиоредоксина | Цистатин-8 | Бета-дефензин 124 |
| Цепь альфа-5(VI) коллагена | Фактор роста эндотелия сосудов B | Кардиотрофин-1 (CT-1) | Бета-дефензин 125 |
| Цепь альфа-3(VI)коллагена | Фактор роста эндотелия сосудов C | Химотрипсиноген B | Бета-дефензин 126 |
| Компонент комплемента C6 | Ретикулокалбин-3 | Хемокин 9 с мотивом C-X-C | Белок 2, подобный дезоксирибонуклеазе-1 |
| Цепь альфа-1 (IX) коллагена | Фибриллин-1 | Хемокин 13 с мотивом C-X-C | Станниокальцин-2 |
| Цепь альфа-1 (X) коллагена | Белок FAM3A | EMILIN-3 | Молекула 1, специфическая для эндотелиальных клеток |
| Цепь альфа-1(XVII) коллагена | Белок G7c | Секретагогин | Карбоксилэстераза 7 |
| Цепь альфа-1(XXI) коллагена | Нейропилин- и толлоидоподобный белок 1 | Эпидидимальный секреторный белок E3-альфа | Гомолог белка NOV |
| Субъединица альфа белка coatomer | Бета-1-гликопротеин 11, специфический для беременности | Эпификан | Белок FAM172A семейства UPF0528 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Рецептор комплемента1 типа | Серпин B4 | Белок FAM5C | Субъединица бета интерлейкина-27 |
| Цистатин-SN | ADAM DEC1 | Фактор роста фибробластов 20 | Белок FAM3C |
| Дезоксирибонуклеаза-1 | АДФ-зависимая глюкокиназа | Белок 3, связывающий фактор роста фибробластов | Белок 1, подобный фактору стромальных клеток 2 |
| Белок 1 внеклеточного матрикса | Альфа-амилаза 2B | Трансмембранный белок 204 | Представитель A1 подсемейства 1 бутирофилина |
| Иммуноглобулин гамма низкой аффинности Рецептор III-A Fc-участка | УДФ-ГлкNАц:бетаГал бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 3 | Белок 4, связывающий фосфатидилэтаноламин | Трансмембранный белок 2, ассоциированный с кератиноцитами |
| Альфа-фетопротеин | Пептид 2, родственный гену кальцитонина | Фактор коагуляции V | Fc-рецептор иммуноглобулина альфа |
| Связывающий гепарин фактор роста 2 | Карбоксипептидаза E | Фактор коагуляции VII | EMILIN-2 |
| Цепь гамма фибриногена | Цитокиновый фактор 1, подобный кардиотрофину | Pro-MCH | Рецептор 10 эфрина A-типа |
| Фактор роста/дифференциации 5 | Цепь альфа-2(VIII) коллагена | Фолатный рецептор гамма | Белок 2, подобный экзостозину |
| Нейротрофический фактор глиальной клеточной линии | Гомолог 2 белка Crumbs | Муцин-7 | Белок 4, родственный фоллистатину |
| Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 3 | Кислый фосфопротеин 1 дентинового матрикса | Пептид, подобный галанину | Белок 5, родственный фоллистатину |
| Инсулиноподобный фактор роста IA | Молекула адгезии клеток при синдроме Дауна | Гемицентин-1 | Трансмембранный белок 66 |
| Участок цепи C Ig гамма-1 | Представитель 1 суперсемейства | Интерлейкин-6 | Фактор роста/дифференциац |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | иммуноглобулинов | | ии 2 |
| Участок цепи C Ig гамма-2 | Интерлейкин-4 | Эмбриональный фактор роста/дифференциации 1 | Рецептор альфа-4 семейства GDNF |
| Участок цепи C Ig гамма-3 | Субъединица альфа рецептора интерлейкина-6 | Интерлейкин-8 | Участок цепи C Ig гамма-4 |
| Инсулиноподобный белок 3 | Интерлейкин-24 | Гремлин-2 | Антиген лимфоцитов 86 |
| Тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина | Ладинин-1 | Стромелизин-2 | Цепь E ингибина бета |
| Белок KIAA0100 семейства UPF0378 | Представитель I липазы | Рецептор 171 вероятно связывающий G-белок | Белок 1C, содержащий домен GRAM |
| Кининоген-1 | Белок 1, родственный панкреатической липазе | Паппализин-2 | Интерферон альфа-10 |
| Субъединица альфа-2 ламинина | Альфа-2-гликопротеин богатый лейцином | Ассоциированный с микрофибриллами гликопротеин 4 | Интерферон альфа-16 |
| Субъединица альфа-4 ламинина | Белок 5, ассоциированный с реконструкцией матрикса | Нейромедин-B | Интерферон альфа-6 |
| Субъединица бета-1 ламинина | Нетрин-4 | Мимекан | Представитель 21 суперсемейства иммуноглобулинов |
| Протеин-лизин-6-оксидаза | Рецептор фактора роста гепатоцитов | Матриксная металлопротеиназа-19 | Агрин |
| Мультимерин-1 | Хемокин 22 с мотивом C-C | Интерлейкин-11 | Пролактин |
| Вазопрессин-нейрофизин-2-копептин | Никталопин | Интерлейкин-17A | Белок 11, подобный белку kelch |
| Нидоген-1 | Остеокальцин | Интерлейкин-18 | Белок Wnt-16 |
| Фосфолипаза A2 | Основный богатый пролином белок 3 слюны | Интерлейкин-26 | Пропердин |
| Перфорин-1 | Бета-1-гликопротеин 10, специфический для беременности | Интерлейкин-28A | Калликреин-13 |
| Фосфатидилинозитгликан- | Трансмембранный белок | Белок 3, содержащий | 1-ацил-sn- |

| | | | |
|---|---|---|---|
| специфическая фосфолипаза D | FLRT2 с богатым лейцином повтором | домен трансмембранного белка emp24 | глицерин-3-фосфатацилтрансфераза дельта |
| Фиброцистин | R-спондин-3 | Интерлейкин-29 | Калликреин-9 |
| Белок-переносчик фосфолипидов | Сиалоадгезин | Инсулиноподобный пептид INSL6 | Белок S, зависимый от витамина K |
| Кислая фосфатаза простаты | Трипсин-3 | Белок Wnt-2b | Белок 8, подобный бутирофилину |
| Белок Z, зависимый от витамина K | Дипептидаза 2 | Бета-1-гликопротеин 1, связанный с беременностью | Субъединица бета-4 ламинина |
| Кислый богатый пролином фосфопротеин 1/2 слюны | Белок 1, содержащий домен связывающий коллаген и кальций ЭФР | Белок 4, ассоциированный с акросомной мембраной сперматозоида | Рецептор 1 гиалуроновой кислоты эндотелиальных лимфатических сосудов |
| Белок зоны беременности | Белок, подобный специфическому гену 1 зародышевых клеток | Субъединица гамма-3 ламинина | Цистатин-SA |
| Прорелаксин H2 | Белок 31, содержащий повтор богатый лейцином | Гомолог 3 лизилоксидазы | Трансмембранный белок 59 |
| Семафорин-4D | Аполипопротеин O | Нейротензин/нейромедин N | Белок 2, подобный аполипопротеину(a) |
| Белок-гомолог 2 белка Slit | Дистрогликан | Белок 2, содержащий домен MAM | Белок 2, подобный лизоциму |
| Альфа-текторин | Дефензин 4 нейтрофилов | Ассоциированный с микрофибриллами белок 2 | Белок 4, подобный лизоциму |
| Тенасцин-X | Белок 3, индуцируемый амфотерином | Белок 2, ингибирующий активность меланомы | Белок reelin |
| Фактор «трилистника» 3 | Субъединица APH-1B гамма-секретазы | Матриксная металлопротеиназа-24 | Связывающий ретинол белок 4 |
| Белок 1 рецептора | Аполипопротеин C-IV | Матриксная | Карбоангидраза 14 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| трансферрина | | металлопротеиназа-25 | |
| Протрансформирующий фактор роста альфа | Арилсульфатаза G | Нетрин-1 | Тубулоинтерстициальный антиген нефрита |
| Трансформирующий фактор роста бета-2 | Фактор, активирующий глии | Нетрин-3 | Нейропептид W |
| Представитель 6 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей | Белок 18, содержащий домен рекрутирования каспазы | Альфа-N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 1 | Альфа-1,3-маннозил-гликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминил трансфераза B |
| Представитель 1B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Гепарансульфат-глюкозамин-3-O-сульфотрансфераза 3A1 | Альфа-N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 3 | Белок 5, содержащий домен трансмембранного белка emp24 |
| Представитель 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Эктоэнзим, разрушающий тиротропин-высвобождающий гормон | Росторегулирующий белок меланомы | Белок 3, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей |
| Тромбопоэтин | Гуанилин | Пептиды, родственные FMRFамиду | Белок 1, подобный подокану |
| Пептиды VIP | Белок 3, подобный холиновому транспортеру | Отоконин-90 | Бета-1-гликопротеин 5, специфический для беременности |
| Кислая хитиназа млекопитающих | 17-бета-гидроксистероид-дегидрогеназа 14 | Нейотурин | Кератокан |
| Секреторный белок 2 богатый цистеином | Полипептид 1, подобный иммуноглобулину лямбда | Нейрексофилин-1 | Секреторная фосфолипаза A2 группы IIE |
| Белок, родственный гаптоглобину | Представитель 14 подсемейства B гомологов DnaJ | Нейрексофилин-2 | Фактор 2 определения левой-правой асимметрии |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Хемокин 26 с мотивом C-C | Белок 8 только с боксом F | Вариант тромбоцитарного фактора 4 | Лиганд 2 NKG2D |
| Коллектин-11 | Фибролейкин | Ноцицептин | Металлоэстераза макрофагов |
| Белок 2, богатый цистеином с ЭФР-подобным доменом | Метионин-R-сульфоксидредуктаза B3, митохондриальная | Белок 1, содержащий V-образный и трансмембранный домены | Стимулирующий рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках |
| Хемокин 16 с мотивом C-X-C | Представитель 2 семейства LGI с богатыми лейцином повторами | Богатый пролином белок 4 | Цитокиновый рецептор-подобный фактор 1 |
| Белок 1, связывающий фактор роста фибробластов | Белок GOT1B транспорта везикул | Пролактинвысвобождающий пептид | Секретин |
| Представитель 5 семейства интерлейкина-1 | Интегральный мембранный белок GPR177 | Сериновая протеаза 33 | Фактор стромальных клеток 2 |
| Представитель 9 семейства интерлейкина-1 | Рецептор 78, вероятно связывающий G-белок | Бета-1-гликопротеин 8, специфический для беременности | Белок 6, подобный лизоциму |
| Калликреин-5 | Представитель 2 семейства HEPACAM | Ретбиндин | Серпин A9 |
| Матрилин-2 | Субъединица альфа рецептора интерлейкина-27 | Пептиды, родственные FMRFамиду | Белок 1, содержащий домен склеротина |
| Рецептор 1 гликопротеина CD200 клеточной поверхности | Проэнкефалин-A | Рибонуклеаза K6 | Лизокардиолипин ацилтрансфераза 1 |
| Фосфатаза лизофосфатидной кислоты 6 типа | Интегрин альфа-10 | Рибонуклеаза T2 | Глутаматкарбоксипептидаза плазмы |
| Фактор обмена нуклеотидов SIL1 | Белок 1, содержащий мотив KTEL | Репетин | Белок-гомолог 3 белка Slit |
| Белок 4, содержащий домен тромбоспондина 1 типа | Представитель 5 подсемейства A рецепторов, подобных | Белок, подобный подкомпоненту комплемента C1r | Белок 8, содержащий C3 и PZP-подобный |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | иммуноглобулину лейкоцитов | | домены альфа-2-макроглобулина |
| Белок 2, индуцируемый механизмом передачи сигнала WNT1 | Белок 3, содержащий богатый лейцином повтор и домен фибронектина III типа | Неохактеризованная гликозилтрансфераза AER61 | Белок 2, респондер рецептора ретиноевой кислоты |
| Белок 9, содержащий домен bromo | Утероглобин | Семафорин-3G | Кислый белок 1 хряща |
| Белок 2, подобный антигену CD99 | Лиганд нетрина-G1 | Представитель 1 семейства 1C секретоглобинов | Станниокальцин-1 |
| Неохарактеризованный белок C1orf159 | Паннексин-1 | Представитель 1 семейства 1D секретоглобинов | Бета-текторин |
| Углевод-сульфотрансфераза 12 | Протокадгерин-12 | Представитель 2 семейства 1D секретоглобинов | Фактор 3 пост-ГФИ присоединения к белкам |
| Вероятная серинкарбоксипептидаза CPVL | Протокадгерин альфа-10 | Серпин A12 | Белок, специфического гена 1 зародышевых клеток |
| Муцин-3A | Протокадгерин бета-10 | Серпин I2 | Рецептор интерлейкина-21 |
| Белок 1, содержащий CUB домен и домен, подобный белку блестящей оболочкия яйцеклетки | Трансмембранный белок 1, ассоциированный с остеопетрозом | Белок, содержащий домены фактора фон Виллебранда C и ЭФР | Белок 4, содержащий V-образный и иммуноглобулиновый домены |
| Полипептид-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 14 | Бета-галактозид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 1 | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 15 | Белок группы B, содержащий домен богатого цистеином фагоцитарного рецептора |
| Галектин-9 | Компонент PIG-S ГФИ-трансамидазы | Субъединица бета-2 натриевого канала | Протиролиберин |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Белок 17, содержащий повтор богатый лейцином | Трансмембранный белок 3 богатый пролином | Ингибитор 4 металлопротеиназы | Семафорин-4A |
| Нейрональный белок 2 с повтором богатым лейцином | Сульфгидрилоксидаза 2 | Иммуномодулирующий белок Т-клеток | |
| Бифункциональная гепарансульфат-N-деацетилаза/N-сульфотрансфераза 3 | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 16 | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 10 | Представитель 27 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей |
| Туфтелин | Белок 3A, содержащий домен SH2 | Лимфопоэтин стромы тимуса | Толл-подобный рецептор 7 |
| Белок-переносчик митохондрий мозга | Трансформирующий SHC белок 4 | Трансмембранный белок 130 | |
| Сигнальный пептид, белок 3, содержащий домен CUB и ЭФР-подобный домен | Белок 23, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Белок, ассоциированный с особым матриксом хряща | Белок 16, содержащий домен тиоредоксина |
| Белок сигма 14-3-3 | Белок 2, подобный трансдуцину бета | Урокортин-2 | Альфа-2-антиплазмин |
| Альфа-1 кислый гликопротеин 1 | Белок 10, содержащий домен Tudor | Урокортин-3 | Белок 3, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP |
| Альфа-1 кислый гликопротеин 2 | Представитель 3 суперсемейства трансмембранных белков 9 | Белок AMBP | Белок WFDC9 |
| Белок 1, содержащий домен фактора фон Виллебранда A | Белок, содержащий домены фактора фон Виллебранда D и ЭФР | Белок, подобный белку 9, родственному комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 14 |
| Белок 9, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 17 | Белок 88, родственный фактору ингибирования роста и дифференциации | Белок, ассоциированный с плазменной мембраной |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | адипоцитов |
| Ангиотензиноген | Белок 2, подобный белку трансмембранного канала | Белок Wnt-10a | Гомолог пероксидазина |
| Аполипопротеин A-II (Apo-AII) (ApoA-II) | Бета-1-гликопротеин 3, специфический для беременности | Белок Wnt-3a | Гомолог белка прогрессирующего анкилоза |
| Аполипопротеин A-IV (Apo-AIV) (ApoA-IV) | Теномодулин | Прото-онкогенный белок Wnt-3 | Белок 1, подобный хитиназе-3 |
| Аполипопротеин C-II (Apo-CII) (ApoC-II) | Тетраспанин-6 | Белок Wnt-6 | Белок CXorf36 семейства UPF0672 |
| Бета-2-гликопротеин 1 | Белок 5, содержащий домен тиоредоксина | Белок Wnt-9a | Арилсульфатаза J |
| Белок 3, связанный с апоптозом | Фактор роста эндотелия сосудов D | Цитокин SCM-1 бета | Кортистатин |
| Бета-секретаза-2 | Бета-1-гликопротеин 9, специфический для беременности | Мембранный белок 16 гранул зимогена | Церулоплазмин |
| Трансфераза системы ABO гистогрупп крови | Семафорин-3F | Белок 1, связывающий блестящую оболочку яйцеклетки | Белок 5, родственный ангиопоэтину |
| Катепсин L2 | Белок 2, подобный кислой фосфотазе | Гомолог антериального градиентного белка 3 | Белок 126, содержащий биспиральный домен |
| Хемокин 3 с мотивом C-C | Белок, подобный аполипопротеину O | Амелотин | Антиген CD177 |
| Представитель B семейства 1 с лектиновым доменом C-типа | Бета-дефензин 119 | Неохарактеризованный белок C5orf46 | Гомолог 4 белка покрова |
| Регулятор 1 активируемого кальцием хлоридного канала | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 12 | Протеинкиназа 1, содержащая домен неохарактеризованного белка aarF | Белок C4orf31, содержащий домен фибронектина III типа |
| Химаза | Белок FAM131A | Драксин | Белок FAM180A |
| Цепь альфа-1 (VI) | Белок FAM3B | Фактор роста | Основный белок |

| | | | |
|---|---|---|---|
| коллагена | | фибробластов 18 | тромбоцитов |
| Цепь альфа компонента комплемента C8 | Белок, подобный бета-галактозидазе-1 | Хемокин 11 с мотивом C-X-C | Интерферон эпсилон |
| Компонент комплемента C9 | Белок 1, подобный лизоциму g | Белок 6, содержащий домен Ly6/PLAUR | Интелектин-2 |
| Белок 2, содержащий домен глюкозо-фруктозо-оксидоредуктазы | Белок, подобный тяжелой цепи H5 интер-альфа-ингибитора трипсина | Представитель 1 семейства химотрипсинподобных эластаз | Альфа-1,3-маннозил-гликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминил трансфераза A |
| Представитель 11 подсемейства B гомологов DnaJ | Белок 5, ассоциированный с акросомой сперматозоида | Рецептор эритропоэтина | Внеклеточный фосфогликопротеин матрикса |
| Представитель 7 семейства эктонуклеотидпирофосфатаз /фосфодиэстераз | Белок 2, взаимодействующий с рецептором nogo, содержащим богатый лейциновый повтор и иммуноглобулиноподобный домен | Белок 2 с гликозилфосфатидилиноз итным якорем, содержащий домен MAM | кДНК FLJ77863, в значительной степени подобная секретируемому и трансмембранному белку 1 (SECTM1), мРНК |
| Аминопептидаза 1 эндоплазматического ретикулума | Белок 2, ассоциированный с сурфактантом | Матриксная металлопротеиназа-27 | Эпидидимальноспеци фический липокалин-6 |
| Рецепторная тирозиновая протеинкиназа erbB-3 | Белок 1 рецептора адипонектина | Неактивная сериновая протеаза 35 | Афамин |
| Резидентный белок ERp44 эндоплазматического ретикулума | Белок 6, подобный множественным доменам эпидермального фактора роста | Белок 134, содержащий биспиральный домен | Вероятная катион-транспортирующая АТФаза 13A5 |
| Белок, связывающий IgGFc | Нейроэндокринный белок 7B2 | Супрабазин | Глютатионпероксида за 3 |
| Белок 1, родственный фактору комплемента H | Альфа-1B-гликопротеин | Представитель 4 семейства 1D секретоглобинов | Клаудин-18 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Полипептид-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2 | Белок 2, содержащий домены WAP, kazal, иммуноглобулина, kunitz и NTR | Белок 2A, содержащий V-образный и трансмембранный домены | Белок KIR3DP1, подобный предполагаемому иммуноглобулиноподобному рецептору клеток-киллеров |
| Гемопексин | Подобный арилацетамиддеацетилазе белок 1 | ADM | Рецептор секреторной фосфолипазы A2 |
| Активатор фактора роста гепатоцитов | Гистатин-3 | Неохарактеризованный белок C2orf82 | Гаптоглобин |
| Белок гена, подобный главному комплексу гистосовместимости I класса | Про-нейрегулин-3, мембраносвязанная изоформа | Представитель 1 семейства инсулиноподобных факторов роста | Молекула 20 клеточной адгезии, родственная карциноэмбриональному антигену |
| Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 6 | Белок, передающий сигнал гена agouti | Белок 29, подобный кадгерину | Костный морфогенетический белок 3 |
| Участок цепи C Ig дельта | Клаудин-8 | Костный морфогенетический белок 15 | Антиген 2 стромы костного мозга |
| Интерлейкин-1 бета | Белок C12orf49 семейства UPF0454 | Ингибитор сериновой протеазы плазмы | Цитохром P450 20A1 |
| Белок 10, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности | Белок 5B1, содержащий домен A фактора фон Виллебранда | Молекула 21 клеточной адгезии, родственная карциноэмбриональному антигену | Белок 3, подобный бактерицидному/повышающему проницаемость белку |
| Молекула C соединительной адгезии | Кадгерин-6 | Альфа-лактальбулин | Гомолог 2 белка dpy-19 |
| Неохарактеризованный белок KIAA0319 | Антимикробный пептид кателицидин | Белок DCC1 когезии сестринских хроматид | Секреторная фосфолипаза A2 группы IIF |
| Субъединица альфа-5 | Субъединица гамма-1 | Белок, связывающий | Карбоксипептидаза |

| ламинина | ламинина | галектин-3 | В |
|---|---|---|---|
| Белок 4, содержащий домен фибронектина III типа | Представитель 7B семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок 1, содержащий домен тяжелой цепи динеина | Белок 2, содержащий домен гликозилтрансферазы 8 |
| Липопротеинлипаза | Хемокин 16 с мотивом C-C | Хемокин 17 с мотивом C-C | Белок FAM19A1 |
| Интерстициальная коллагеназа | Хемокин 24 с мотивом C-C | Редуктаза-1 жирных кислот-КоА | Белок, подобный рецептору альфа семейства GDNF |
| Матриксная металлопротеиназа-9 | Белок C7orf27, содержащий повтор HEAT | Гомолог фактора инициации почки плавника | Вероятная глютатионпероксидаза 8 |
| Муцин-16 | Цепь альфа-2(IX) коллагена | Рецептор полимерный иммуноглобулинов | Цистатин-D |
| Муцин-2 | Цепь альфа-3(IX) коллагена | Прионоподобный белок doppel | Цистатин-F |
| Муцин-5B | Колипаза | Хемокин 6 с мотивом C-X-C | Ацетилгидролаза активирующего тромбоциты фактора |
| Миоцилин | Цепь альфа-1 (XXVII) коллагена | Хемокин 10 с мотивом C-X-C | Паппализин-1 |
| Рецептор 1 окисленного липопротеина низкой плотности | Субъединица 2 карбоксипептидазы N | Бета-дефензин 1 | Представитель 12 семейства 22 растворимых переносчиков |
| Белок, сверхэкспрессируемого гена 1 опухоли простаты | Трансмембранный нейрональный белок 4 с повтором богатым лейцином | Белок 2 связи гиалуронана и протеогликана | Белок 1, подобный гормону хорионическому соматомаммотропину |
| Серин/треонин-протеинкиназа 2, взаимодействующая с рецептором | Белок 1, содержащий коллагеновый трехспиральный повтор | Белок 30, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Белок 3 регулятор динамики движения микротрубочек |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Транспортер 3 уравновешивающих нуклеозидов | Эндотелин-2 | Белок гена-суппрессора фьюзд-гомолога | Ретинолдегидрогена за 14 |
| Селенопротеин P | Фибромодулин | Фолатный рецептор бета | Галанин |
| Белок D, ассоциированный с легочным сурфактантом | Белок B, подобный Fc-рецептору | Внеклеточная сульфатаза Sulf-2 | Транскобаламин-2 |
| Белковый гомолог гена 6, стимулированного ретиноевой кислотой | Белок C1orf124, содержащий домен цинкового пальца RAD18 | Представитель 14 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей | Белок 1, содержащий домен катехол-O-метилтрансферазы |
| Фактор «трилистника» 1 | Фактор роста/дифференциации 15 | Артемин | Трипептидил-пептидаза 1 |
| Ингибитор 2 механизма действия тканевого фактора | Нексин глии | Цепь альфа-1 (XII) коллагена | Белок транскрипта 1, подобного белку Trem |
| Протромбин | Прогонадолиберин-1 | Цепь альфа-1 (XIV) коллагена | Активатор 2B гуанилатциклазы |
| Толл-подобный рецептор 9 | Гранзим K | Бета-дефензин 2 | Индуцибельный костимулятор T-клеток |
| Молекула межклеточной адгезии 4 | Интерферон альфа-17 | Интерлейкин-21 | |
| Интерлейкин-19 | Интерферон альфа-21 | Интерлейкин-3 | |
| Истмин-2 | Интерферон альфа-8 | Интерлейкин-7 | Белок, подобный N-концевому гомологу 2 белка Notch |
| Родственный белку подобному IRRE белок 1 | Интерферон омега-1 | Цепь альфа ингибина | Субъединица бета-2 ламинина |
| Калликреин-10 | Пептид, подобный раннему инсулину плаценты | Субъединица альфа-3 ламинина | Нейропилин-2 |
| Белок 4, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета | Белок 1, содержащий домены ЭФР, латрофилина и седьмой трансмембранный домен | Представитель хромосомы X семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Белок 1 внеклеточного матрикса, подобный ЭФР-содержащему |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | фибулину |
| Рецептор альфа 2 типа подобный сдвоенному иммуноглобулину | Белок 1 с доменами фибронектина 3 типа и анкиринового повтора | Регулятор ионного транспорта 6, содержащий домен FXYD | Рецепторный тип тирозинпротеинфосфатазы каппа |
| Белок 3 альфа регенерации островковых клеток | Гомолог 4 лизилоксидазы | Сериновый инкорпоратор 2 | Белок 4 альфа регенерации островковых клеток |
| Белок RNF5 убиквитинпротеинлигазы E3 | Люмикан | Стромелизин-3 | Тахикинин-4 |
| Протахикинин-1 | Адропин | Секретируемый фосфопротеин 1 | Матриксная металлопротеиназа-23 |
| Секреторный белок 1, родственный белку frizzled, изоформа CRA_a | Трансмембранный белок FLRT1 с повтором богатым лейцином | Белок LACTB, подобный серин-бета-лактамазе, митохондриальный | Белок 5, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей |
| Белок B, родственный плазминогену | Нуклеобиндин-2 | Галектин-3 | Оптицин |
| Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDHHC16 | Фосфолипаза A2 | Панкреатический прогормон | Предшественник малого/секретируемого гликопротеина |
| Белок 1, родственный ангиопоэтину | Проэнкефалин-B | Бета-1-гликопротеин 6, срецифический для беременности | Белок PTX3, родственный пентраксину |
| Белок C19orf63 семейства UPF0510 | Белок распознавания пептидогликана I-бета | Белок 3, родственный белку Dickkopf | Карбоксилэстераза 8 |
| Белок M160, фагоцитарного рецептора типа 1 богатого цистеином | Белок 2, содержащий богатый лейцином повтор суперсемейства иммуноглобулинов | Представитель 11 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз | Трансмебранный белок 4, родственный тиоредоксину |
| Белок 2, подобный альфа-маннозидазе, усиливающей деградацию ER | Белок 2, содержащий V-образный и иммуноглобулиновый домены | Белок 3 гамма регенерации островковых клеток | Белок 2, содержащий домен суперсемейства |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | мембранных переносчиков |
| Белок 2, подобный бета-галактозидазе-1 | Пептид YY | Белок 43 пальца RING | Калликреин-12 |
| Рецептор E интерлейкина-17 | Связывающий ретинол белок 3 | Семеногелин-2 | Ядерный белок бревикан |
| Интерлейкин-20 | Атерин | Муцин-15 | Поримин |
| Интерлейкин-25 | Гомолог SEC63 белка транслокации | Костный сиалопротеин 2 | Торсин-1A |
| Белок 11, содержащий домен PDZ | Трансформирующий фактор роста бета-3 | Лимфотактин | Хемокин 23 с мотивом C-C |
| Релаксин-3 | Белок Wnt-10b | Регулирующий рост белок альфа | Тестикан-3 |
| Сериновая карбоксипептидаза, индуцируемая ретиноидами | Реналаза | R-спондин-2 | Основный богатый пролином белок 4 слюны |
| Белок 2, ассоциированный с карциномой эпителия короткого неба, легкого и носа | Пропротеинконвертаза типа 4 субтилизина/клексина | Белок 3, содержащий трансмембранный и биспиральный домен | Представитель 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей |
| Белок 5, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP | Карбоксипептидаза A4 | Корегулируемый ФРЭС хемокин 1 | Белок brother CDO |
| Тромбоцитарный фактор роста C | Олфактомедин-4 | ADM2 | Бета-1,4-галактозилтрансфераза 4 |
| Белок 33, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназы | Кислотолабильная цепь белкового комплекса, связывающего инсулиноподобный фактор роста | Белок, подобный гидроксистероид-11-бета-дегидрогеназы 1 | Представитель 9 семейства SDR дегидрогеназ/редуктаз |
| Белок 1, содержащий домен BSD | Амелогенин, изоформа Y | Белок 1, подобный белку дельта | Эппин |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Молекула 3 адгезии клеток | Арилсульфатаза F | Эфрин-A1 | Отоанкорин |
| Белок, родственный CDC45 | Вариант 2 субъединицы бета хориогонадотропина | Белок 1, подобный рецептору фактора роста фибробластов | Тенасцин-R |
| Хондролектин | Бета-дефензин 104 | Рецептор альфа-3 семейства GDNF | Фактор роста |
| Диацилглицерин-O-ацилтрансфераза 2 | Бета-дефензин 105 | Тромбоцитарный рецептор Gi24 | Белок TSPEAR |
| 3-кето-стероидредуктаза | Бета-дефензин 107 | Прогонадолиберин-2 | Гефестин |
| Рецептор C интерлейкина-17 | Белок WFDC11 | Калликреин-7 | Белок 3, подобный бутирофилину |
| Рецептор D интерлейкина-17 | Белок 6, содержащий основной домен четырех дисульфидных связей белка WAP | Аполипопротеин F | Белок 9, подобный бутирофилину |
| Субъединица 1 комплекса интегратора | Эпиген | Белок CASC4 | Субъединица гамма-2 ламинина |
| Белок, подобный молекуле соединительной адгезии | Белок FAM19A5 | Белок, подобный белку VIP36 | Белок LMBR1L |
| Белок LNX убиквитинпротеинлигазы E3 | Клаудин-6 | Белок 1 транспортер магния | Муцин-21 |
| Трансмембранный нейрональный белок 3 с повтором богатым лейцином | Молекула 19 клеточной адгезии, родственная карциноэмбриональному антигену | Чувствительная к амилориду аминоксидаза [медьсодержащая] | Маннозилолигосахарид-1,2-альфа-маннозидаза эндоплазматического ретикулума |
| Субъединица бета метионинаденозилтрансферазы 2 | Дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 1 | Белок 2 модулятор регулируемой повреждением ДНК аутофагии | Основной гликопротеин GP2 секреторной гранулярной мембраны поджелудочной железы |
| Белок 2, подобный | Белок COQ10 A, | Трансмембранный белок | Семафорин-4B |

| | | | |
|---|---|---|---|
| подокаликсину | митохондриальный | C17orf87 | |
| Проминин-2 | Неохарактеризованный белок C19orf41 | Белок 5, родственный фактору комплемента H | Семафорин-5B |
| Белок 2, содержащий домен плексина | Неохарактеризованный белок C21orf63 | Белок 7, связывающий FK506 | Эпсилон-саркогликан |
| Гомолог 4 белка Roundabout | Гомолог 2 белка дельта | Сериновый инкорпоратор 1 | Связывающий гуанилат белок 5 |
| Лактозилцерамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза | Транскрипционный белок, регулируемый кокаином и амфетамином | Белок 1, содержащий трансмембранный и убиквитинподобный домен | Эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролаза 6 |
| Представитель 2 семейства трансмембранных белков SID1 | Белок, подобный белку 1 участнику слияния белка HMGIC липомы | Белок, подобный белку ERGIC-53 | Серпин B3 |
| Белок 1, содержащий домен sushi | Белок 18, содержащий повтор богатый лейцином | Толл-подобный рецептор 10 | Гомолог B белка RMD5 |
| Серин/треонин-протеинкиназа TAO2 | Белок 25, содержащий повтор богатый лейцином | Толл-подобный рецептор 8 | Представитель 5 фагоцитарного рецептора класса A |
| Трансмембранная протеаза, сериновая 2 | Белок 3B, содержащий богатые лейцином повторы | Селенопротеин T | Семафорин-6B |
| Декарбоксилаза 1 УДФ-глюкуроновой кислоты | Белок 3, содержащий повтор богатый лейцином | Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 11 | Трансмембранный белок 108 |
| Неохарактеризованный белок C10orf58 | Белок 4, содержащий домен Ly6/PLAUR | Сортирующий белки нексин-24 | Белок 3, содержащий домен sushi |
| Трансмембранный белок 2, родственный тиоредоксину | Субъединица 1 комплекса эпоксидредуктазы витамина K | Белок 1, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей | Белок 2, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета |
| ЦМФ-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа- | Дезинтегрин и металлопротеиназа с | Предполагаемый неохарактеризованный | Предполагаемый неохарактеризованн |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2,3-сиалилтрансфераза | мотивами тромбоспондина 20 | белок UNQ6494/PRO21346 | ый белок UNQ6190/PRO20217 |
| Предполагаемый неохарактеризованный белок ENSP00000380674 | Предполагаемый неохарактеризованный белок ENSP00000381830 | Вариант предшественника секретируемого и трансмембранного белка 1 | Вариант предшественника секретируемого и трансмембранного белка 1 |
| Трансмембранный белок 119 | Белок 1 критического участка синдрома «кошачьего глаза» | Представитель A семейства 18 с лектиновым доменом C-типа | Цепь альфа-1 (XX) коллагена |
| Трансмембранный белок 98 | Экспресиируемый яичками белок 101 | Секреторный белок 3 богатый цистеином | Рецептор нетрина UNC5D |
| Белок 3 предшественников - B-лимфоцитов | Ксилозилтрансфераза 2 | Комплемент C4-B | Муцин-13 |
| Предполагаемый неохарактеризованный белок C14orf144 | Белок FAM20A | Предполагаемый неохарактеризованный белок PRO2829 | АТФ-зависимая металлопротеаза YME1L1 |
| Протеаза сайта-1 мембрансвязывающего фактора транскрипции | Белок 1, содержащий домены трансмембранного белка и иммуноглобулина | Регулятор 2 активируемого кальцием хлоридного канала | Пропротеинконвертаза типа 5 субтилизина/кексина |
| Фиколин 3 (содержащий домен коллагена/фибриногена) (антиген Hakata) (NL3) (Фиколин 3 (содержащий домен коллагена/фибриногена) (антиген Hakata), изоформа CRA_b) | Белок KIR3DX1, подобный предполагаемому иммуноглобулиноподобному рецептору клеток-киллеров (Представитель 12 кластера лейкоцитарных рецепторов) | Суппрессор туморогенности нейробластомы 1 | |

**[0064]** Представленные в данном документе терапевтические белки не должны считаться исчерпывающими примерами. Напротив, как видно из раскрытия изобретения, предложенного в данном документе, способы этого изобретения применимы к любому белку, к которому требуется присоединение водорастворимого полимера, в соответствии с данным изобретением. К примеру, терапевтические белки описаны в публикации США 2007/0026485, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

**Белки коагуляции крови**

**[0065]** В одном аспекте, исходным веществом настоящего изобретения является белок коагуляции крови, который может быть получен из плазмы человека или получен с помощью методик рекомбинантной инженериии как описано в патенте США № 4757006; патенте США № 5733873; патенте США № 5198349; патенте США № 5250421; патенте США № 5919766; и патенте EP 306968.

**[0066]** Терапевтические белки, такие как белки коагуляции крови, включающие Фактор IX (FIX), Фактор VIII (FVIII), Фактор VIIa (FVIIa), Фактор фон Виллебранда (VWF), Фактор FV (FV), Фактор X (FX), Фактор XI (FXI), Фактор XII (FXII), тромбин (FII), белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевый фактор (ТФ) и протеазу ADAMTS 13, быстро разрушаются протеолитическими ферментами и нейтрализуются антителами. Это снижает их период полувыведения и время циркуляции, таким образом ограничивая их терапевтическую эффективность. Для достижения и поддержания требуемого терапевтического и профилактического действия этих белков коагуляции необходимы относительно высокие дозы и частое введение. Вследствие этого, трудно достичь надлежащей регуляции дозы, а потребность частых внутривенных введений накладывает ограничения на образ жизни пациента.

**[0067]** В данном документеописано, что белки коагуляции крови включают, но не ограничиваются: Фактором IX (FIX), Фактором VIII (FVIII), Фактором VIIa (FVIIa), Фактором фон Виллебранда (VWF), Фактором FV (FV), Фактором X (FX), Фактором XI, Фактором XII (FXII), тромбином (FII), белком C, белком S, tPA, PAI-1, тканевым фактором (ТФ) и протеазой ADAMTS 13, которые подразумеваются данным изобретением. Используемый в

данном документе термин «белок коагуляции крови» относится к любому Фактору IX (FIX), Фактору VIII (FVIII), Фактору VIIa (FVIIa), Фактору фон Виллебранда (VWF), Фактору FV (FV), Фактору X (FX), Фактору XII (FXII), тромбину (FII), белку C, белку S, tPA, PAI-1, тканевому фактору (ТФ) и протеазе ADAMTS 13, которые проявляют биологическую активность, которая ассоциирована с такой активностью отдельного нативного белка коагуляции крови.

**[0068]** Каскад коагуляции крови разделяют на три отдельных сегмента: внутренний, внешний и общий механизмы (Schenone et al., Curr Opin Hematol. 2004;11:272-7). В каскад вовлекается группа ферментов сериновых протеаз (зимогенов) и белковых кофакторов. Если требуется, неактивный зимогенный предшественник превращается в активную форму, которая впоследствии превращается в следующий фермент каскада.

**[0069]** Для внутреннего механизма требуются факторы свертывания VIII, IX, X, XI и XII. Инициация внутреннего механизма происходит если прекалликреин, кининоген большой молекулярной массы, фактор XI (FXI) и фактор XII (FXII) взаимодействуют с отрицательно заряженной поверхостью. Также требуются секретируемые тромбоцитами ионы кальция и фосфолипиды.

**[0070]** Внешний механизм инициируется, если повреждается сосудистый просвет кровеносных сосудов. Выделяется гликопротеиновый тканевый фактор мембран и потом связывается с циркулирующим фактором VII (FVII) и с малым существующим количеством активной формы FVIIa. Данное связывание облегчает полное превращение FVII в FVIIa и, впоследствии, в присутствии кальция и фосфолипидов, превращение фактора IX (FIX) в фактор IXa (FIXa) и фактора X (FX) в фактор Xa (FXa). Связывание FVIIa с тканевым фактором усиливает протеолитическую активность путем перемещения сайтов связывания FVII на субстрат (FIX и FX) в более близкое соседство и путем индуцирования конформационнного изменения, которое усиливает ферментную активность FVIIa.

**[0071]** Активация FX является общей точкой этих двух механизмов. Вместе с фосфолипидом и кальцием факторы Va (FVa) и Xa превращают протромбин в тромбин (комплекс протромбиназы), который потом расщепляет фибриноген с образованием мономеров

фибрина. Эти мономеры полимеризуются с образованием фибриновых нитей. Фактор XIIIa (FXIIIa) ковалентно связывает эти нити дгуг с другом с образованием жесткой сетки.

**[0072]** Превращение FVII в FVIIa также катализируется рядом протеаз, включая тромбин, FIXa, FXa, фактор XIa (FXIa) и фактор XIIa (FXIIa). Для ингибирования ранней фазы каскада ингибитор механизма действия тканевого фактора взаимодействует с продуктом комплекса FVIIa/тканевый фактор/Fxa.

Фактор VIIa

**[0073]** FVII (также известный как стабильный фактор или проконвертин) является гликопротеином зависимой от витамина К сериновой протеазы с ключевой ролью для гомеостаза и коагуляции (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002;3:287-99).

**[0074]** FVII синтезируется в печени и секретируется в виде одноцепочечного гликопротеина массой 48 кДа. FVII несет как все гликопротеины зависимых от витамина К сериновых протеаз структуру сходного белкового домена, содержащую аминоконцевой домен гамма-карбоксиглютаминовой кислоты (Gla) с 9-12 остатками, отвечающими за взаимодействие белка с липидными мембранами, карбоксиконцевой домен сериновой протеазы (каталитический домен) и два домена, подобные эпидермальному фактору роста, содержащие связывающий ион кальция сайт, который опосредует взаимодействие с тканевым фактором. Гамма-глутамилкарбоксилаза катализирует карбоксилирование остатков Gla на аминоконцевой части молекулы. Эта карбоксилаза для проявления своей активности зависима от восстановленной формы витамина К, который окисляется до эпоксидной формы. Эпоксидредуктаза витамина К необходима для обратного превращения эпоксидной формы витамина К в его восстановленную форму.

**[0075]** Основная часть FVII циркулирует в плазме в форме зимогена и активация этой формы приводит к расщеплению пептидной связи между аргинином 152 и изолейцином 153. Активированный в результате этого FVIIa состоит из легкой цепи NH2-части (20 кДа) и тяжелой цепи COOH-концевой части (30 кДа) связанных посредством одной дисульфидной связи (Cys 135 к Cys 262). Легкая

цепь содержит мембраносвязывающий домен Gla, в то время как тяжелая цепь содержит каталитический домен.

**[0076]** Концентрация в плазме FVII составляющая около 0,5 мг/мл определяется генетическими и внешними факторами (Pinotti et al., Blood. 2000;95:3423-8). Разные генотипы FVII могут приводить к отличиям в средних значениях концентраций FVII в несколько раз. Концентрации FVII в плазме повышаются во время беременности у здоровых женщин и также увеличиваются с возрастом и более высокие у женщин и у людей с гипертриглицеридемией. FVII имеет самый короткий период полувыведения из всех прокоагулянтных факторов (3-6 ч). Средняя концентрация в плазме FVIIa у здоровых индивидов равна 3,6 нг/мл и период полувыведения FVIIa при циркуляции по сравнению с другими факторами коагуляции относительно длительный (2,5 ч).

**[0077]** Наследственная недостаточность FVII является редким аутосомно-рецессивным нарушением, сопровождающимся повышенной кровоточивостьюс оцененной частотой распространения равной 1 случай на 500000 человек в общей популяции (Acharya et al., J Thromb Haemost. 2004;2248-56). Приобретенная недостаточность FVII от действия ингибиторов также встречается очень редко. Сообщали также о случаях недостаточности, происходивших в связи с применением лекарств таких как цефалоспорины, пенициллины и пероральные антикоагулянты. Более того, сообщалось о приобретенной недостаточности FVII, которая происходила спонтанно или совмесно с другими состояниями, такими как миелома, сепсис, апластическая анемия, при лечении с помощью интерлейкина-2 и антитимоцитарного глобулина.

**[0078]** Эталонные полинуклеотидные и полипептидные последовательности включают, например, №№ доступа GenBank J02933 для геномной последовательности, M13232 для кДНК (Hagen et al. PNAS 1986; 83: 2412-6) и P08709 для полипептидной последовательности (включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). Было описано множество видов полиморфизма FVII, например, см. статью Sabater-Lleal et al. (Hum Genet. 2006; 118:741-51) (включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки).

Фактор IX

**[0079]** FIX является зависимым от витамина К белком плазмы, который принимает участие во внутреннем механизме коагуляции крови путем превращения FX в его активную форму в присутствии ионов кальция, фосфолипидов и FVIIIa. Доминирующая каталитическая способность FIX такая как у сериновой протеазы, обладающей специфичностью к конкретной связи аргинина-изолейцина в молекуле FX. Активация FIX происходит с помощью FXIa, который вызывает удаление пептида активации из FIX, что приводит к получению активированной молекулы FIX, содержащей две цепи, удерживаемые одной или большим количеством дисульфидных связей. Дефекты FIX являются причиной рецессивной гемофилии В, сцепленной с хромосомой Х.

**[0080]** Гемофилия А и В являются наследственными заболеваниями, характеризующиеся недостаточностью, соответственно, полипептидов FVIII и FIX. Основная причина такой недостаточности часто является результатом мутаций генов FVIII и FIX, оба из которых расположены на хромосоме Х. Традиционное лечение гемофилии часто включает внутривенное введение объединенной плазмы или частично очищенных белков коагуляции от здоровых индивидов. Эти препараты могут быть контаминированы патогенными агентами или вирусами, такими как инфекционные прионы, ВИЧ, парвовирус, гепатит А и гепатит С. Поэтому существует острая необходимость в лекарственных средствах, для которых не требуется использование сыворотки человека.

**[0081]** Уровень снижения активности FIX прямо пропорциональный тяжести гемофилии В. Существующее лечение гемофилии В включает замещение недостающего белка полученным из плазмы или рекомбинантным FIX (так называемое FIX-заместительное или замещающее лечение или терапия).

**[0082]** Полинуклеотидные и полипептидные последовательности FIX могут быть найдены, например, под № доступа UniProtKB/Swiss-Prot P00740, пат. США № 6531298 и на Фигуре 1 (SEQ ID NO: 1).

Фактор VIII

**[0083]** Фактор коагуляции VIII (FVIII) циркулирует в плазме в очень низкой концентрации и нековалентно связан с фактором фон

Виллебранда (VWF). При гемостазе FVIII отделяется от VWF и действует как кофактор для активированного фактора IX (FIXa)-опосредованной активации FX путем увеличения скорости активации в присутствии кальция и фосфолипидов или клеточных мембран.

**[0084]** FVIII синтезируется в виде одноцепочечного предшественника массой приблизительно 270-330 кДа с доменной структурой A1-A2-B-A3-C1-C2. Выделенный из плазмы (например, « полученный из плазмы» или «плазматический»), FVIII состоит из тяжелой цепи (A1-A2-B) и легкой цепи (A3-C1-C2). Молекулярная масса легкой цепи равна 80 кДа, тогда как из-за протеолиза домена B масса тяжелой цепи находится в диапазоне 90-220 кДа.

**[0085]** FVIII также синтезируется как рекомбинантный белок для терапевтического применения при нарушениях, сопровождающихся повышенной кровоточивостью. Были разработаны различные анализы in vitro для определения потенциальной эффективности рекомбинантных FVIII (rFVIII) как лекарственных препаратов. Эти анализы имитируют действие эндогенного FVIII in vivo. Как определено при анализах in vitro, обработка тромбином FVIII in vitro приводит к быстрому увеличению и последующему снижению его прокоагулирующей активности. Эта активация и инактивация совпадают со специфическим ограниченным протеолизом обоих тяжелой и легкой цепей, что изменяет доступность разных связывающих эпитопов FVIII, например, допуская диссоциацию FVIII от VWF и связывание с фосфолипидной поверхностью или изменяя связывающую способность с определенными моноклональными антителами.

**[0086]** Недостаток или дисфункцию FVIII связывают с наиболее частым нарушением, сопровождающимся повышенной кровоточивостью - гемофилией A. Методом выбора лечения гемофилии A является заместительная терапия полученным из плазмы или концентратами rFVIII. Пациенты с тяжелой гемофилией A с уровнями FVIII ниже 1% обычно находятся на профилактическом лечении с целью поддержания уровня FVIII между введением доз препаратов выше 1%. Принимая во внимание средние периоды полувыведения разных препаратов FVIII при циркуляции, этот результат обычно можно достичь введением FVIII два-три раза в неделю.

**[0087]** Эталонные полинуклеотидные и полипептидные последовательности включают, например, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, Nature, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., Structure of human Factor VIII, Nature, 312(5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29;11-29 (2002).

Фактор фон Виллебранда

**[0088]** Фактор фон Виллебранда (VWF) представляет собой гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде множества мультимеров в диапазоне размеров от около 500 до 20000 кДа. Мультимерные формы VWF состоят из полипептидных субъединиц массой 250 кДа, связанных вместе дисульфидными связями. VWF опосредует начальную адгезию тромбоцитов на субэндотелии поврежденных стенок сосудов. Гемостатическое действие проявляют только мультимеры большего размера. Предполагается, что эндотелиальные клетки секретируют большие полимерные формы VWF, а те формы VWF, которые имеют низкую молекулярную массу (VWF с низкой молекулярной массой) получаются при протеолитическом расщеплении. Мультимеры, обладающие большими молекулярными массами, накапливаются в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток и высвобождаются при стимуляции.

**[0089]** VWF синтезируется эндотелиальными клетками и мегакариоцитами в виде препро-VWF, который в значительной степени состоит из повторяющихся доменов. После отщепления сигнального пептида про-VWF димеризуется при участии дисульфидных связей С-концевого участка. Эти димеры служат протомерами для мультимеризации, которая регулируется дисульфидными связями между свободными концевыми участками. После сборки мультимеров следует протеолитическое удаление пропептидной последовательности (Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

**[0090]** Первичный продукт трансляции, найденный в клонированной кДНК VWF, представлен полипептидом-предшественником из 2813 остатков (препро-VWF). Препро-VWF

состоит из сигнального пептида из 22 аминокислот и пропептида из 741 аминокислоты, дополняющий зрелый белок VWF, состоящий из 2050 аминокислот (Ruggeri Z.A. and Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993).

**[0091]** Дефекты VWF являются причиной болезни Виллебранда (VWD), которая характеризуется более или менее выраженным клиническим проявлением кровотечений. VWD 3 типа является наиболее тяжелой формой болезни, при которой VWF полностью отсутствует, а VWD 1 типа относится к количественной потере VWF и ее клиническое провление может быть очень легким. VWD 2 типа относится к количественной нехватке VWF и может иметь такое же тяжелое течение, как VWD 3 типа. VWD 2 типа обладает многими подформами, некоторые ассоциируются с потерей или снижением количества мультимеров с высокой молекулярной массой. Болезнь Виллебранда типа 2a (VWD-2A) характеризуется потерей как промежуточных так и больших мультимеров. VWD-2B характеризуется потерей мультимеров с самой большой молекулярной массой. В этой области известны другие заболевания и нарушения, связанные с VWF.

**[0092]** Полинуклеотидные и аминокислотные последовательности препро-VWF доступны, соответственно, под №№ доступа GenBank NM_000552 и NP_000543.

**[0093]** Другие белки коагуляции крови, соответствующие настоящему изобретению, описаны в этой области, например, в статье Mann KG, Thromb Haemost, 1999;82:165-74.

**A. Полипептиды**

**[0094]** В одном аспекте изобретения исходным веществом настоящего изобретения является белок или полипептид. В данном документе считается, что термин терапевтический белок относится к любой молекуле терапевтического белка, которая проявляет биологическую активность, связанную с этим терапевтическим белком. В одном варианте реализации изобретения молекула терапевтического белка является полноразмерным белком.

**[0095]** Рассматриваемые молекулы терапевтических белков включают: полноразмерные белки, предшественники полноразмерных белков, биологически активные субъединицы или фрагменты

полноразмерных белков, а также биологически активные производные и варианты любой из этих форм терапевтических белков. Таким образом, терапевтический белок включает те белки, которые: (1) имеют аминокислотную последовательность, которая обладает более чем около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% или больше идентичности аминокислотной последовательности на участке из по меньшей мере около 25, около 50, около 100, около 200, около 300, около 400 или более аминокислот к полипептиду, кодированному эталонной нуклеиновой кислотой или аминокислотной последовательностью, описанной в данном документе; и/или (2) специфично связываются с антителами, например, поликлональными или моноклональными антителами, синтезируемым против иммуногена, содержащего эталонную аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, ее иммуногенный фрагмент и/или ее консервативно модифицированный вариант.

**[0096]** Согласно настоящему изобретению термин «рекомбинантный терапевтический белок» включает любой терапевтический белок, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В определенных вариантах реализации изобретения это термин охватывает белки, которые описаны в данном документе.

**[0097]** В данном документе считается, что «эндогенный терапевтический белок» включает терапевтический белок, который происходит из организма предполагающего получение лечения млекопитающего. Этот термин также включает терапевтический белок, транскрибируемый с трансгена или любой другой чужеродной ДНК, представленной в указанном млекопитающем. В данном документе считается, что «экзогенный терапевтический белок» включает белок коагуляции крови, который не происходит из организма предполагающего получение лечения млекопитающего.

**[0098]** В данном документе считается, что термин «полученный из плазмы белок коагуляции крови» или «плазматический» белок, включает все формы этого белка, найденные в крови, полученной из

организма млекопитающего, обладающие свойством участия в механизме коагуляции.

**[0099]** В данном документе считается, что термин «биологически активное производное» или «биологически активный вариант» включает любое производное или вариант молекулы, имеющей практически такие же функциональные и/или биологические свойства указанной молекулы, такие как свойства связывания, и/или такую же структурную основу, как пептидный остов или основная полимерная единица.

**[00100]** Термин «аналог», также как «вариант» и «производное», представляет практически подобное по структуре соединение и обладающее такой же биологической активностью,что и встречающаяся в природе молекула, хотя в определенных случаях несколько отличающееся от нее,. К примеру, вариант полипептида относится к полипептиду, разделяющему практически подобную структуру и обладающему такой же биологической активностью, как и эталонный полипептид. Варианты или аналоги в композиции их аминокислотных последовательностей по сравнению с встречающимся в природе полипептидом, от которого происходит этот аналог, основаны на одной или более мутациях, включая: (i) делецию одного или большего количества аминокислотных остатков на одном или более концах полипептида и/или одном или более внутренних участках встречающейся в природе последовательности полипептида (например, фрагментов), (ii) инсерцию или добавление одной или более аминокислот на одном и более концах (обычно «добавление» или «слияние») полипептида и/или одного или более внутренних участков (обычно «инсерция») встречающейся в природе последовательности полипептида или (iii) замену одной или более аминокислот другими аминокислотами в последовательности встречающего в природе полипептида. В качестве примера, «производное» представляет тип аналога и относится к полипептиду, разделяющему такую же или в основном подобную структуру эталонного полипептида, который модифицировали, например, химически.

**[00101]** Вариант полипептида является типом аналога полипептида и включает варианты инсерций, в которых один или

более аминокислотных остатков добавлены к аминокислотной последовательности терапевтического белка данного изобретения. Инсерции могут располагаться на одном или на обоих концах белка и/или могут быть расположены в пределах внутренних участков аминокислотной последовательности терапевтического белка. Варианты инсерций с дополнительными остатками на любом или на обоих концах включают к примеру, белки слияния и белки, содержащие аминокислотные маркеры или другие аминокислотные метки. В одном аспекте изобретения молекула белка коагуляции крови необязательно содержит N-концевой Met, особенно, когда молекула экспрессируется рекомбинантно в бактериальной клетке, такой как E. coli.

**[00102]** В вариантах с делециями один или более аминокислотных остатков в полипептиде терапевтического белка, который описан в данном документе, удалены. Делеции могут быть реализованы на одном или обоих концах полипептида терапевтического белка и/или с удалением одного или более остатков в пределах аминокислотной последовательности терапевтического белка. Поэтому, варианты с делециями включают фрагменты последовательности полипептида терапевтического белка.

**[00103]** В вариантах с заменами один или более аминокислотных остатков полипептида терапевтического белка удалены и замещены альтернативными остатками. В одном аспекте изобретения замены являются консервативными по природе, и консервативные замены такого вида хорошо известны в этой области знаний. Альтернативно, данное изобретение охватывает замены, которые также являются неконсервативными. Типичные консервативные замены описаны в издании Lehninger, [Biochemistry, 2-е издание; Worth Publishers, Inc., New York (1975), стр.71-77] и изложены непосредственно ниже.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЗАМЕНЫ

| **СВОЙСТВО БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ** | **АМИНОКИСЛОТА** |
|---|---|
| Неполярные (гидрофобные): | |
| A. Алифатические | A L I V P |
| B. Ароматические | F W |

| | |
|---|---|
| C. Содержащие серу | M |
| D. Пограничные | G |
| Незаряженные полярные: | |
| A. Гидроксил | S T Y |
| B. Амиды | N Q |
| C. Сульфгидрил | C |
| D. Пограничные | G |
| Положительно заряженные (основные) | K R H |
| Отрицательно заряженные (кислые) | D E |

**[00104]** Кроме того, типичные консервативные замены изложены непосредственно ниже.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЗАМЕНЫ II

| **ОРИГИНАЛЬНЫЙ ОСТАТОК** | **ТИПИЧНАЯ ЗАМЕНА** |
|---|---|
| Ala (A) | Val, Leu, Ile |
| Arg (R) | Lys, Gln, Asn |
| Asn (N) | Gln, His, Lys, Arg |
| Asp (D) | Glu |
| Cys (C) | Ser |
| Gln (Q) | Asn |
| Glu (E) | Asp |
| His (H) | Asn, Gln, Lys, Arg |
| Ile (I) | Leu, Val, Met, Ala, Phe, |
| Leu (L) | Ile, Val, Met, Ala, Phe |
| Lys (K) | Arg, Gln, Asn |
| Met (M) | Leu, Phe, Ile |
| Phe (F) | Leu, Val, Ile, Ala |
| Pro (P) | Gly |
| Ser (S) | Thr |
| Thr (T) | Ser |
| Trp (W) | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp, Phe, Thr, Ser |
| Val (V) | Ile, Leu, Met, Phe, Ala |

**B. Полинуклеотид**

**[00105]** Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтический белок данного изобретения включают, к примеру и без ограничения: гены, пре-мРНК, мРНК, кДНК, полиморфные варианты, аллельные, синтетические и встречающиеся в природе мутанты.

**[00106]** Полинуклеотиды, кодирующие терапевтический белок данного изобретения также включают, без ограничения такие, которые: (1) специфически гибридизуются в жестких условиях гибридизации с нуклеиновой кислотой, кодирующей эталонную аминокислотную последовательность как описано в данном документе, и ее консервативно модифицированные варианты; (2) имеют последовательность нуклеиновой кислоты, которая обладает более чем около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичности нуклеотидной последовательности на участке из по меньшей мере около 25, около 50, около 100, около 150, около 200, около 250, около 500, около 1000 или более нуклеотидов (вплоть до полноразмерной последовательности из 1218 нуклеотидов зрелого белка) к эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Типичные «жесткие условия гибридизации» включают гибридизацию при 42°C в 50% формамиде, 5X SSC (цитратно-солевой раствор), 20 мМ Na•PO4, pH 6,8 и промывку в 1X SSC при 55°C в течение 30 минут. Само собой разумеется, что основываясь на длине и содержании нуклеотидов GC последовательностей, которые должны гибридизироваться, может проводиться вариация этих типичных условий. Для определения подходящих условий гибридизации предназначены стандартные формулы в этой области. См. книгу Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 9.47-9.51.

**[00107]** «Встречающуюся в природе» последовательность полинуклеотида или полипептида обычно получают из организма млекопитающего, включая, но не ограничиваясь: приматом, например, человеком; грызуном, например, крысой, мышью, хомяком; коровой, свиньей, лошадью, овцой и любым млекопитающим. Нуклеиновые кислоты и белки этого изобретения могут быть рекомбинантными молекулами (например, гетерологическими и

кодирующими последовательность дикого типа или ее вариант или не встречающимися в природе).

**C. Получение терапевтических белков**

**[00108]** Получение терапевтических белков включает любой способ, известный в этой области: (i) получение рекомбинантной ДНК методом генетической инженерии, (ii) введение рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки с помощью, к примеру и без ограничения, трансфекции, электропорации или микроинъекции, (iii) культивирование указанных трансформированных клеток, (iv) экспрессия терапевтического белка, например конститутивно или при индукции, и (v) выделение указанного белка коагуляции крови, например из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток для того, чтобы получить очищенный терапевтический белок.

**[00109]** В других аспектах изобретения терапевтический белок получают экспрессией в подходящей прокариотической или эукариотической системе хозяина, способной продуцировать фармакологически приемлемую молекулу белка коагуляции крови. Примерами эукариотических клеток являются клетки млекопитающих такие как: CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep и HepG2.

**[00110]** Для получения терапевтического белка используется большое разнообразие векторов и они выбираются из эукариотических и прокариотических векторов экспрессии. Примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды такие как и без ограничения: pRSET, pET и pBAD, в которых промоторы, используемые в векторах прокариотической экспрессии, включают один или более таких и без ограничения: lac, trc, trp, recA или araBAD. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) для экспрессии в дрожжах, векторы такие как и без ограничения pAO, pPIC, pYES или pMET, используя промоторы такие как и без ограничения AOX1, GAP, GAL1 или AUG1; (ii) для экспрессии в клетках насекомых, векторы такие как и без ограничения pMT, pAc5, pIB, pMIB или pBAC, используя промоторы такие как и без ограничения PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 или polh, и (iii) для экспрессии в клетках млекопитающих, векторы такие как и без ограничения pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 или

pBPV, и векторы, полученные из, в одном аспекте изобретения, вирусных систем таких как и без ограничения вируса осповакцины, аденоассоциированные вирусы, герпес-вирусы или ретровирусы, используя промоторы такие как и без ограничения CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β-актин.

**D. Введение**

**[00111]** В одном варианте реализации конъюгированный терапевтический белок настоящего изобретения может вводиться с помощью инъекции, такой как внутривенная, внутримышечная или внутрибрюшинная инъекция.

**[00112]** Для введения композиции, содержащей конъюгированный терапевтический белок настоящего избретения человеку или подопытному животному, в одном аспекте композиция содержит один и более фармацевтически приемлемых носителей. Термины «фармацевтически» или «фармакологически приемлемый» относятся к молекулярным объектам и композициям, которые стабильны, ингибируют деградацию белков, такую как аггрегация и расщепление препаратов, и, кроме того, не вызывают аллергических или других нежелательных реакций при введении путями, широко известными в этой области, как описано ниже. «Фармацевтически приемлемые носители» включают любые и все применяемые в клинической практике растворители, диспергирующие среды, покрытия, противомикробные и противогрибковые агенты, изотонические вещества и агенты, замедляющие абсорбцию и им подобные, включая агенты, раскрытые выше.

**[00113]** В данном документе считается, что термин «эффективное количество» обозначает дозу, подходящую для лечения заболевания или нарушения, или облегчения симптома заболевания или нарушения. В одном варианте реализации термин «эффективное количество» обозначает дозу, подходящую для лечения млекопитающего, страдающего нарушением, сопровождающимся повышенной кровоточивостью, описанным в данном документе.

**[00114]** Такие композиции могут вводиться перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или с помощью внутричерепной

инъекции. Термин «парентеральный», как используется в данном документе, включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интрацистернальную инъекцию или процедуру инфузии. Также это подразумевает введение внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекцией и/или хирургическим имплантированием в конкретное место. Обычно, композиции преимущественно свободны от пирогенов, а также от других примесей, которые могут быть опасными для реципиента.

**[00115]** Однократное или многократные введения композиций могут проводиться на уровне доз и по схеме, выбранными лечащим врачом. Для предупреждения или лечения заболевания, подходящая доза будет зависеть от типа заболевания, требующего лечения, как описано выше, тяжести и течения заболевания, от того, применяется ли это лекарство с профилактическими или терапевтическими целями, предыдущего лечения, истории болезни пациента и реакции на это лекарство и, усмотрения штатного врача.

**[00116]** Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество конъюгированного терапевтического белка, как определено в данном документе. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, растворитель, соль, буферное или вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция может применяться для лечения определенных выше нарушений, сопровождающихся повышенной кровоточивостью. Фармацевтическая композиция данного изобретения может быть раствором или лиофилизованным препаратом. Растворы этой фармацевтической композиции могут быть подвергнуты любому подходящему процессу лиофилизации.

**[00117]** В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, которые содержат композицию данного изобретения, упакованную способом, который облегчает ее использование для введения субъектам. В одном варианте реализации изобретения такой набор включает вещество или композицию, описанные в данном документе (например, композиция,

содержащая конъюгированный терапевтический белок), упакованные в контейнер, такой как закрытый флакон или сосуд с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или помещенной в упаковку, которая описывает применение вещества или композиции при практической реализации этого способа изобретения. В одном варианте реализации изобретения этот набор содержит первый контейнер с композицией, содержащей конъюгированный терапевтический белок и второй контейнер с физиологически приемлемым восстанавливающим раствором для композиции в первом контейнере. В одном аспекте изобретения вещество или композиция упакованы в форме одноразовой дозы. Набор может дополнительно включать устройство, пригодное для введения композиции в соответствии со специфическим путем введения. Предпочтительно, чтобы набор содержал этикетку, которая описывает применение терапевтического белка или пептидной композиции.

**ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИМЕРЫ**

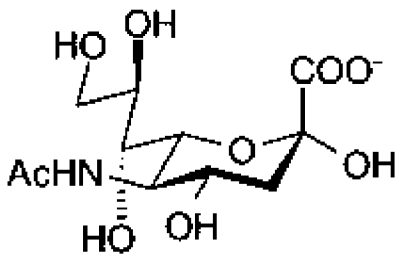
**[00118]** В одном аспекте изобретения предложена производная молекула терапевтического белка (например, конъюгированный терапевтический белок), связывающаяся с водорастворимым полимером включающим, но не ограничивающимся: полиэтиленгликолем (ПЭГ), разветленным ПЭГ, полисиаловой кислотой (ПСК), гидроксиалкилкрахмалом (ГАК), гидроксилэтилкрахмалом (ГЭК), углеводом, полисахаридами, пуллуланом, хитозаном, гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатом, дерматансульфатом, крахмалом, декстраном, карбоксиметилдекстраном, полиалкиленоксидом (ПАО), полиалкиленгликолем (ПАГ), полипропиленгликолем (ППГ), полиоксазолином, полиакрилоилморфолином, поливиниловым спиртом (ПВС), поликарбоксилатом, поливинилпирролидоном, полифосфазеном, полиоксазолином, сополимером полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимером полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформалем) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмония фосфатом (МФК). В одном варианте реализации изобретения водорастворимый полимер состоит из молекул сиаловой кислоты, имеющий молекулярную массу в диапазоне 350-120000, 500-100000, 1000-80000, 1500-60000, 2000-

45000 Да, 3000-35000 Да и 5000-25000 Да. Связывание водорастворимого полимера может быть проведено прямым связыванием с белком или посредством линкерных молекул. Одним из примеров химического линкера является ГМФМ (гидразид 4-[4-N-малеимидофенил]масляной кислоты ), содержащий углевод-селективный гидразид и сульфгидрильно реакционно-способную малеинимидную группу (Chamow et al., J Biol Chem 1992;267:15916-22). Другие типичные и предпочтительные линкеры описаны ниже.

**[00119]** В одном варианте реализации производное сохраняет полную функциональную активность препаратов нативного терапевтического белка и обеспечивает пролонгированный период полувыведения in vivo по сравнению с препаратами нативного терапевтического белка. В другом варианте реализации производное сохраняет по меньшей мере 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44. 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56,57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 процентов (%) биологической активности по отношению к нативному белку коагуляции крови. В родственном аспекте изобретения биологическое действие производного и нативного белка коагуляции крови определяют по степени хромогенной активности к величине антигенности фактора коагуляции крови (фактор коагуляции крови:Хрм: фактор коагуляции крови:Аг). В еще одном варианте реализации изобретения период полувыведения конструкции снижен или увеличен в 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или в 10 раз по отношению к периоду полувыведения in vivo нативного терапевтического белка.

**A. Сиаловая кислота и ПСК**

**[00120]** ПСК состоят из полимеров (обычно гомополимеров) N-ацетилнейраминовой кислоты. Вторичная аминогруппа обычно несет ацетильную группу, но вместо нее может нести гликолильную группу. Возможные заместители гидроксильных групп включают ацетильную, лактильную, этильную, сульфатную и фосфатную группы.




N- Ацетилнейраминовая кислота
Neu5Ac

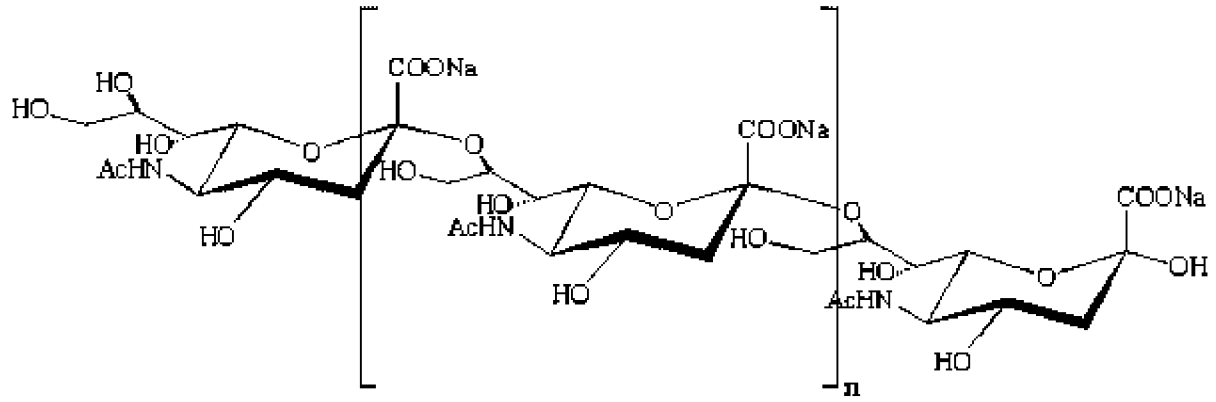
**[00121]** Структура сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты)

**[00122]** ПСК и мПСК обычно включают линейные полимеры, состоящие в основном из фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты связанных 2,8- или 2,9- гликозидными связями или их комбинациями (например, чередующимися 2,8- и 2,9- связями). В частности, для ПСК и мПСК предпочтительными являются гликозидные связи $\alpha$-2,8. Такие ПСК и мПСК удобно получают из коломиновых кислот, которые называются в данном документе как «КК» и «мКК». Обычные ПСК и мПСК содержат по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 5, предпочтительнее по меньшей мере 10 и предпочтительнее всего по меньшей мере 20 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. Таким образом, они могут содержать от 2 до 300 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты, предпочтительно от 5 до 200 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты или предпочтительнее всего от 10 до 100 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. ПСК и мПСК преимущественно в основном свободны от компонентов сахаров отличных от N-ацетилнейраминовой кислоты. Поэтому ПСК и КК предпочтительно содержат по меньшей мере 90%, предпочтительнее по меньшей мере 95% и предпочтительнее всего по меньшей мере 98% фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты.

**[00123]** Когда ПСК и КК содержат фрагменты отличные от N-ацетилнейраминовой кислоты (как, например, в мПСК и мКК), то они преимущественно расположены на одном или обоих концах полимерной цепи. Такие «другие» фрагменты могут, к примеру, быть фрагментами полученными из концевых фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты при окислении или восстановлении.

**[00124]** Например, в публикации WO-A-0187922 описываются такие мПСК и мКК, в которых невосстанавливающий остаток концевой N-ацетилнейраминовой кислоты превращают в альдегидную группу при реакции с перйодатом натрия. Кроме того, в публикации WO 2005/016974 описываются такие мПСК и мКК, в которых восстанавливающий остаток концевой N-ацетилнейраминовой кислоты подвергают восстановлению до уменьшенного открытого кольца на восстанавливающем остатке концевой N-ацетилнейраминовой кислоты, при этом образуется вицинальная диольная группа, с последующим окислением для превращения вицинальной диольной группы в альдегидную группу.

**[00125]** Богатые сиаловой кислотой гликопротеины связывают селектин в организме человека и других организмах. Они играют важную роль в организме человека при инфекциях гриппа. Например, сиаловая кислота может скрывать маннозные антигены от маннозосвязывающего лектина на поверхности клеток-хозяев или бактерий. Это предупреждает активацию комплемента. Сиаловые кислоты также скрывают предпоследний остаток галактозы, тем самым предупреждая быстрое выведение этого гликопротеина рецептором галактозы паренхимальных клеток печени.




**[00126]** Структура коломиновой кислоты (гомополимер N-ацетилнейраминовой кислоты).

**[00127]** Коломиновые кислоты (подкласс ПСК) представляют собой гомополимеры N-ацетилнейраминовой кислоты (НАНК) с $\alpha$ (2→8) кетозидной связью и синтезируются, в частности, отдельными штаммами Escherichia coli, несущими антиген K1. Коломиновые кислоты обладают многими физиологическими функциями. Они важны в

качестве сырья для производства лекарственных и косметических средств.

**[00128]** Сравнительные исследования in vivo с полисиалированной и немодифицированной аспарагиназой выявили, что полисиалирование увеличивает период полувыведения данного фермента (Fernandes and Gregoriadis, Biochimica Biophysica Acta 1341: 26-34, 1997).

**[00129]** В данном документе считается, что термин «фрагменты сиаловых кислот» включает мономеры мономеры и полимеры сиаловой кислоты («полисахариды»), которые растворимы в водном растворе или суспензии и обладают небольшим или не обладают вредным воздействием, таким как побочные эффекты, у млекопитающих при введении конъюгата ПСК-белок коагуляции крови в фармацевтически эффективном количестве. Эти полимеры характеризуются, в одном аспекте, как содержащие 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500 остатков сиаловых кислот. В определенных аспектах различные остатки сиаловых кислот соединяются в цепь.

**[00130]** В одном варианте реализации изобретения часть сиаловой кислоты полисахаридного соединения является сильно гидрофильной и в другом варианте реализации целое соединение является сильно гидрофильным. Гидрофильность сообщается, главным образом, выступающими карбоксильными группами остатков сиаловой кислоты, а также гидроксильными группами. Остаток сахарида может содержать другие функциональные группы такие как: аминная, гидроксильная или сульфатная группы или их комбинации. Эти группы могут присутствовать на встречающихся в природе соединениях сахаридов или вводиться в производные полисахаридные соединения.

**[00131]** Встречающийся в природе полимер ПСК доступен в виде полидисперсного препарата, демонстрирующего широкое распределение размеров молекул (например, Sigma C-5762) и высокую полидисперсность (ПД). Благодаря тому, что полисахариды обычно синтезируются в бактериях, несущих неотъемлемый риск совместно выделяемых эндотоксинов, очистка длинных полимерных цепей сиаловой кислоты может повысить вероятность увеличенного

содержания эндотоксинов. Короткие молекулы ПСК с 1-4 остатками сиаловой кислоты также могут быть получены синтетическим путем (Kang SH et al., Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK and Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46), при этом минимизируется риск получения высоких концентраций эндотоксинов. Несмотря на это, в данное времы могут производиться препараты ПСК с узким распределением размеров молекул и низкой полидисперсностью, которые также свободны от эндотоксинов. Полисахаридные соединения специального применения для данного изобретения, в одном аспекте, синтезируются бактериями. Некоторые из этих встречающихся в природе полисахаридов известны как гликолипиды. В одном варианте реализации полисахаридные соединения практически свободны от концевых остатков галактозы.

**B. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) и пэгилирование**

**[00132]** В определенных аспектах изобретения терапевтические белки конъюгированы с водорастворимым полимером с помощью любого из многообразных химических методов (Roberts JM et al., Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). Например, в одном варианте реализации изобретения терапевтический белок модифицируется конъюгацией ПЭГ со свободными аминогруппами белка с использованием N-гидроксисукцинимидных (NHS) сложных эфиров. В другом варианте реализации изобретения водорастворимый полимер, к примеру ПЭГ, связывается со свободными SH-группами, с использованием методов малеинимидной химии или с помощью связывания ПЭГ-гидразидов или ПЭГ-аминов с остатками углеводов терапевтических белков после предварительного окисления.

**[00133]** Конъюгация в одном аспекте изобретения проводится прямым связыванием (или связыванием через линкерные системы) водорастворимого полимера с терапевтическим белком с образованием стабильных связей. Дополнительно в определенных аспектах настоящего изобретения используются способные к разрушению, высвобождению и гидролизу линкерные системы (Tsubery et al. J Biol Chem 2004;279:38118-24/Greenwald et al., J Med Chem 1999;42:3657-67/Zhao et al., Bioconj Chem 2006;17:341-51/WO2006/138572A2/US7259224B2/US7060259B2).

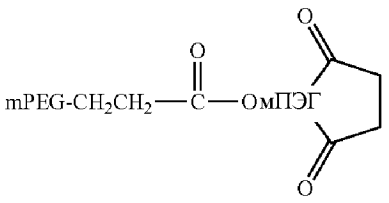
**[00134]** В одном варианте реализации изобретения терапевтический белок модифицируют по лизиновым остаткам путем использования производных полиэтиленгликоля, содержащих активный N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), такой как сукцинимидилсукцинат, сукцинимидилглутарат или сукцинимидилпропионат. Эти производные реагируют с лизиновыми остатками терапевтического белка в мягких условиях с образованием стабильной амидной связи. В одном варианте реализации изобретения длина цепи производного ПЭГ равна 5000 Да. Другие производные ПЭГ с длиной цепей 500-2000 Да, 2000-5000 Да, больше чем 5000 вплоть до 10000 Да, или больше чем 10000 вплоть до 20000 Да, или больше чем 20000 вплоть до 150000 Да используются в разных вариантах реализации, включая линейные и разветвленные структуры.

**[00135]** Альтернативные способы для ПЭГилирования аминогрупп являются, без ограничения, такими как химическая конъюгация с карбонатами ПЭГ с образованием уретановых связей или реакция с альдегидами и кетонами методом восстановительного аминирования с образованием вторичных амидных связей.

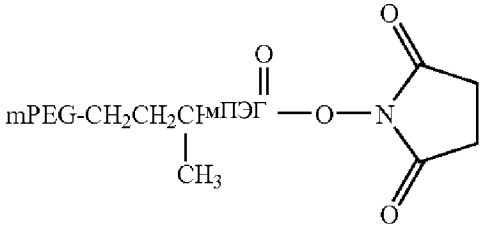
**[00136]** В одном варианте реализации настоящего изобретения молекула терапевтического белка химически модифицируется с применением производных ПЭГ, которые коммерчески доступны. Эти призводные ПЭГ в альтернативных аспектах изобретения имеют линейные или разветвленные структуры. Примеры ПЭГ-производных, содержащих группы NHS, перечислены ниже.

**[00137]** Следующие производные ПЭГ являются неограничивающими примерами коммерчески доступных производных компании Nektar Therapeutics (Huntsville, Ala.; см. каталог реагентов www.nektar.com/PEG; прайс-лист Nektar Advanced PEGylation, 2005-2006):

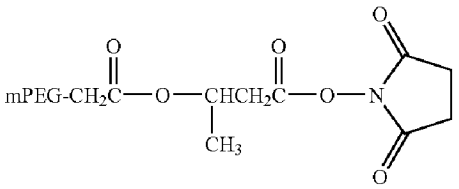
мПЭГ-сукцинимидилпропионат (мПЭГ-СПК)




мПЭГ-сукцинимидил-α-метилбутаноат (мПЭГ-СМБ)

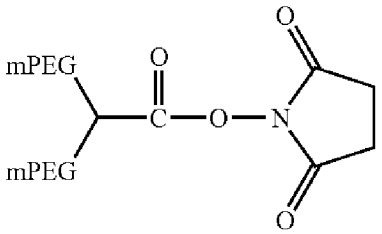



мПЭГ-КМ-ГМК-NHS (КМ=карбоксиметил; ГМК=гидроксимасляная кислота)




Структура разветвленных производных ПЭГ (Nektar Therapeutics):

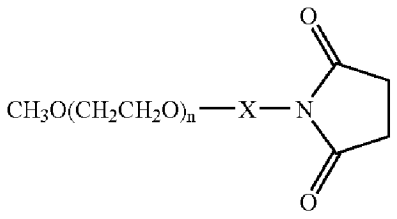
Разветвленный ПЭГ-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ2-NHS)



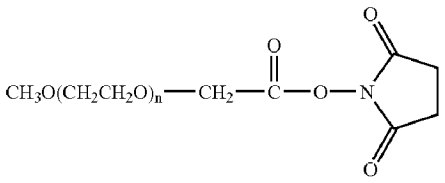

**[00138]** Этот реагент с разветвленной структурой более подробно описан автором Kozlowski et al. (BioDrugs 2001;5:419-29).

**[00139]** Другие неограничивающие примеры производных ПЭГ коммерчески доступны в компании NOF Corporation (Tokyo, Japan; см. сайт www.nof.co.jp/english: Каталог 2005)

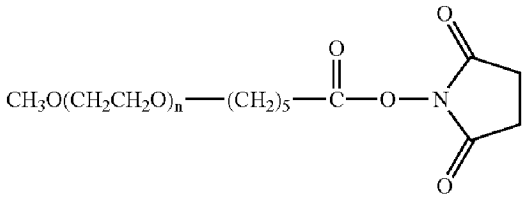
Общая структура линейных производных ПЭГ (NOF Corp.):



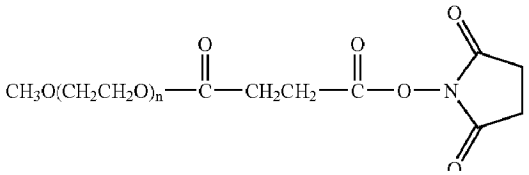
X=карбоксиметил



X=карбоксипентил

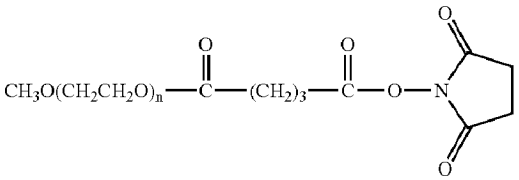


x=сукцинат



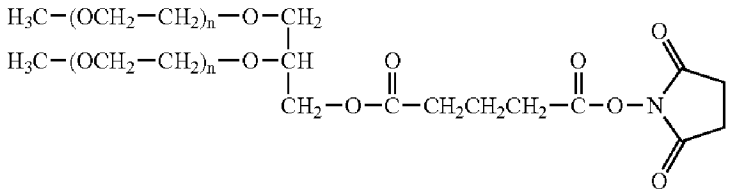
mPEG Succinimidyl st мПЭГ сукцинимидилсукцинат

x=глутарат

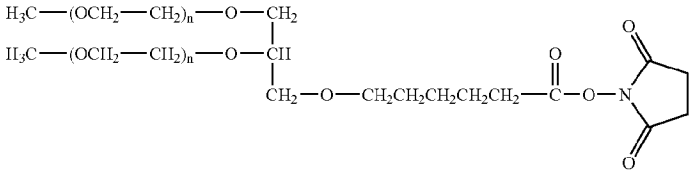


mPEG Su мПЭГ сукцинимидилглутарат

Структуры разветвленных ПЭГ-производных (NOF Corp.): 2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-(1,5-диоксо-5-сукцинимидилокси, пентилокси)пропан



2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-(сукцинимидилкарбоксипентилокси)пропан



**[00140]** Эти производные пропана представляют глицериновый остов со схемой замещения 1,2. В настоящем изобретении также предусмотрены разветвленные производные ПЭГ основанные на структурах глицерина с замещением 1,3 или другими разветвленными структурами, описанными в патенте США 2003/0143596A1.

**[00141]** Также предусмотрены производные ПЭГ со способными к деградации (например, способные к гидролизу) линкерами, описанные в публикациях Tsubery et al. (J Biol Chem 2004;279:38118-24) и Shechter et al. (WO04089280A3).

**[00142]** Удивительно, что ПЭГилированный терапевтический белок этого изобретения проявляет функциональную активность, сочетающую пролонгированный период полувыведения in vivo. Кроме того, ПЭГилированный rFVIII, FVIIa, FIX или другой фактор коагуляции крови по-видимому более устойчивый к инактивации тромбином.

**C. Гидроксиалкилкрахмал (ГАК) и гидроксилэтилкрахмал (ГЭК)**

**[00143]** В разных вариантах реализации настоящего изобретения молекулу терапевтического белка химически модифицируют, используя гидроксиалкилкрахмал (ГАК) или гидроксилэтилкрахмал (ГЭК) или их производные.

**[00144]** ГЭК является производным встречающегося в природе амилопектина и расщепляется в организме альфа-амилазой. ГЭК представляет собой замещенное производное углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в

концентрации вплоть до 95% по массе. ГЭК проявляет полезные биологические свойства и применяется как агент замещения объема крови и при гемодилюционной терапии в клинике (Sommermeyer et al., 1987, Krankenhauspharmazie, 8 (8), 271-278; и Weidler et al., 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res. g 419 494-498).

**[00145]** Амилопектин состоит из фрагментов глюкозы, причем в основной цепи присутствуют альфа-1,4-гликозидные связи, а в местах разветвлений найдены альфа-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы в основном определены типом гликозидных связей. Благодаря изгибу альфа-1,4-гликозидной связи получаются спиральные структуры с около шестью мономерами глюкозы на один виток. Физико-химические, а также биохимические свойства этого полимера могут быть модифицированы с помощью замещения. Введение гидроксиэтильной группы может быть достигнуто посредством щелочного гидроксиэтилирования. Подбором условий реакции можно использовать разную реакционную способность соответствующей гидроксигруппы в незамещенном мономере глюкозы в отношении гидроксиэтилирования. Понимая этот факт, специалист способен влиять на схему замещения в ограниченном масштабе.

**[00146]** ГАК относится к производному крахмала, в котором есть замещение по меньшей мере одной гидроксиалкильной группой. Поэтому, термин гидроксиалкилкрахмал не ограничен соединениями, в которых концевые углеводные фрагменты содержат гидроксиалкильные группы R1, R2 и/илиr R3, но также относится к соединениям, в которых по меньшей мере где-либо присутствует одна гидроксигруппа или в концевом углеводном фрагменте и/или в остальной части молекулы крахмала, ГАК' является крахмалом, замещенным гидроксиалкильной группой R1, R2 или R3.

**[00147]** Алкильная группа может быть линейной или разветвленной алкильной группой, которая может быть подходящим образом замещена. Гидроксиалкильная группа предпочтительно содержит 1-10 атомов углерода, предпочтительнее от 1 до 6 атомов углерода, предпочтительнее от 1 до 4 атомов углерода и даже предпочтительнее 2-4 атома углерода. Термин «гидроксиалкилкрахмал» поэтому преимущественно включает

гидроксиэтилкрахмал, гидроксипропилкрахмал и гидроксибутилкрахмал, причем гидроксиэтилкрахмал и гидроксипропилкрахмал особенно предпочтительны.

**[00148]** Гидроксиалкилкрахмал, содержащий две или более разных гидроксиалкильных групп, также охватывается настоящим изобретением. По меньшей мере одна гидроксиалкильная группа, находящаяся в ГАК, может содержать две или более гидроксигрупп. Согласно одному варианту реализации изобретения по меньшей мере одна гидроксиалкильная группа, находящаяся в ГАК, содержит одну гидроксигруппу.

**[00149]** Термин ГАК также включает производные, в которых алкильная группа является моно- или полизамещенной. В одном варианте реализации алкильная группа замещена галогеном, в частности фтором, или арильной группой, при условии, что ГАК сохраняет растворимость в воде. Более того, концевая гидроксигруппа гидроксиалкильной группы может быть превращена в сложный или простой эфир. Производные ГАК описаны в публикации WO/2004/024776, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

**D. Способы присоединения**

**[00150]** Терапевтический белок может быть ковалентно связан с полисахаридными соединениями с помощью любой из разнообразных методик, известных специалистам в этой области. В различных аспектах данного изобретения фрагменты сиаловых кислот связывают с терапевтическим белком, например, FIX, FVIII, FVIIa или VWF, к примеру способом, описанным в патенте США № 4356170, который включен в данный документ посредством ссылки.

**[00151]** Другие техники для связывания ПСК с полипептидами также известны и предусмотрены данным изобретением. К примеру, в публикации патента США № 2007/0282096 описано конъюгирование аминного или гидразидного производного, например, ПСК, с белками. Кроме того, в публикации патента США 2007/0191597 описаны производные ПСК, содержащие на восстанавливающем конце альдегидную группу для проведения реакции с субстратами (например, белками). Содержание этих ссылок полностью включено в данный документ посредством ссылки.

**[00152]** Различные способы раскрыты от столбца 7, строки 15 до столбца 8, строки 5 патента США № 5846951 (содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки). Типичные методики включают связывание через пептидную связь между карбоксильной группой на одной или другой молекуле белка коагуляции крови или полисахарида и аминогруппой белка коагуляции крови или полисахарида, или сложноэфирную связь между карбоксильной группой белка коагуляции крови или полисахарида и гидроксильной группой терапевтического белка или полисахарида. Другая связь, с помощью которой терапевтический белок ковалентно связывается с полисахаридным соединением, осуществляется посредством основания Шиффа между свободной аминогруппой белка коагуляции крови, реагирующего с альдегидной группой, образованной на невосстанавливающем конце полисахарида при окислении перйодатом (Jennings HJ and Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011-8; Fernandes AI and Gregoriadis G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341;26-34). Полученное основание Шиффа в одном аспекте изобретения стабилизируют специфическим восстановлением $NaCNBH_3$ с образованием вторичного амина. Альтернативным подходом является образование концевых свободных аминогрупп в молекуле ПСК методом восстановительного аминирования с помощью $NH_4Cl$ после предварительного окисления. Для связывания двух аминных или двух гидроксильных групп могут применяться бифункциональные реагенты. К примеру, молекула ПСК, содержащая аминогруппу соединяется с аминогруппами белка с такими реагентами как БС3 (бис(сульфосукцинимидил)суберат/ Pierce, Rockford, IL). Например для связывания амина и тиольных групп дополнительно используются гетеробифункциональные перекрестносвязывающие реагенты как сульфо-ЭМКС (N-ε-малеимидокапроилокси)сульфосукцинимидный сложный эфир/ Pierce).

**[00153]** В другом подходе получают гидразид ПСК и связывают его с углеводным фрагментом белка после предварительного окисления и образования альдегидных связей.

**[00154]** Выше описано, что свободная аминогруппа терапевтического белка реагирует с 1-карбоксильной группой

остатка сиаловой кислоты с образованием пептидильной связи или эфирная связь образуется между 1-карбоксильной группой кислоты и гидроксильной или другой подходящей активной группой белка коагуляции крови. Альтернативно, карбоксильная группа образует пептидную связь с деацетилированной 5-аминогруппой или альдегидная группа молекулы терапевтического белка образует основание Шиффа с N-деацетилированной 5-аминогруппой остатка сиаловой кислоты.

**[00155]** Альтернативно, полисахаридное соединение связывают нековалентным способом с терапевтическим белком. Например, полисахаридное соединение и фармацевтически активное соединение в одном аспекте изобретения связывают с помощью гидрофобных взаимодействий. Другие нековалентные связи включают электростатические взаимодействия с противоположно заряженными ионами, притягивающимися друг с другом.

**[00156]** В разных вариантах реализации изобретения терапевтический белок связан или ассоциирован с полисахаридным соединением в стехиометрических количествах (например, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 и т.д.). В разных вариантах реализации 1-6, 7-12 или 13-20 полисахаридов связывают с белком коагуляции крови. В еще одних вариантах реализации изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более полисахаридов связаны с белком коагуляции крови.

**[00157]** В разных вариантах реализации изобретения терапевтический белок модифицируют для введения сайтов гликозилирования (т.е. сайты отличные от нативных сайтов гликозилирования). Такие модификации могут быть выполнены с использованием стандартных молекулярно-биологических методик, известных в этой области. Более того, терапевтический белок перед конъюгацией с водорастворимым полимером с помощью одного или большего количества углеводных фрагентов может быть гликозилированный in vivo или in vitro. Эти гликозилированные сайты могут служить мишенями для конъюгации белков с водорастворимыми полимерами (патентная публикация США № 20090028822, патентная публикация США № 2009/0093399, патентная

публикация США № 2009/0081188, патентная публикация США № 2007/0254836, патентная публикация США № 2006/0111279 и статья DeFrees S. et al., Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43). К примеру, белок, который не является природногликозилированным in vivo (например, белок, который не является гликопротеином) может быть гликозилирован как описано выше.

**E. Аминоокси связывание**

**[00158]** В одном варианте реализации изобретения реакция гидроксиламина или производных гидроксиламина с альдегидами (например, с углеводным фрагментом после окисления перйодатом натрия) с образованием оксимной группы применяется для получения конъюгатов белка коагуляции крови. К примеру, гликопротеин (например, терапевтический белок согласно настоящему изобретению) вначале окисленный окисляющим агентом таким как перйодат натрия ($NaIO_4$) (Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10 и Van Lenten L и Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). Окисление перйодатом гликопротеинов основано на классической реакции Малапрада, описанной в 1928 году, окисление вицинальных диолов перйодатом с образованием активной альдегидной группы (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). Дополнительные примеры такого окисляющего агента являются: тетраацетат свинца (Pb(OAc)4), ацетат марганца (MnO(Ac)3), ацетат кобальта (Co(OAc)2), ацетат таллия (TlOAc), сульфат церия (Ce(SO4)2) (патент США 4367309) или перрутенат калия (KRuO4) (Marko et al., J Am Chem Soc 1997,119, 12661-2). Под термином «окисляющий агент» подразумевается соединение-мягкий окислитель, который способен окислять вицинальные диолы в углеводах, благодаря чему образуются активные альдегидные группы при реакции в физиологических условиях.

**[00159]** Второй стадией является связывание полимера, содержащего аминооксигруппу, с окисленным углеводным фрагментом с образованием оксимной связи. В одном варианте реализации изобретения эта стадия может выполняться в присутствии каталитических количеств нуклеофильного катализатора анилина или производных анилина (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem.

2008; Zeng Y et al., Nature Methods 2009;6:207-9). Анилиновый катализ значительно ускоряет оксимное лигирование, что позволяет использовать очень низкие концентрации реагентов. В другом варианте реализации изобретения оксимная связь стабилизируется восстановлением $NaCNBH_3$ с образованием алкоксиаминной связи (Фигура 2). Дополнительные катализаторы описаны ниже.

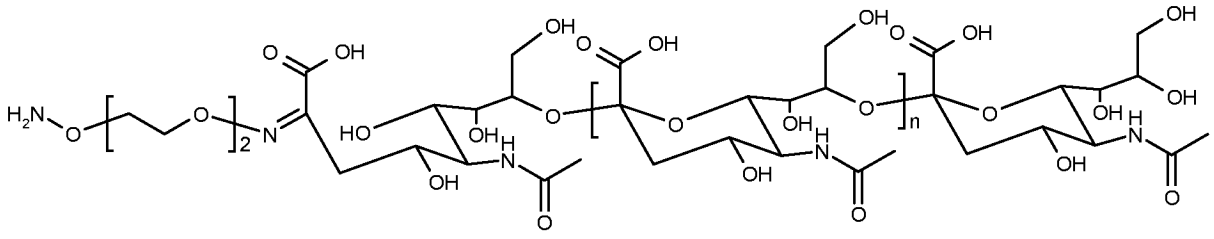
**[00160]** Дополнительная информация по аминоокси технологии может быть найдена по следующим ссылкам, содержание каждой из которых включено в данных документ полностью: EP 1681303A1 (соединенный с ГАК эритропоэтин); WO 2005/014024 (конъюгаты полимера и белка, связанные оксимной связывающей группой); WO96/40662 (содержащие аминоокси линкер соединения и их применение в конъюгатах); WO 2008/025856 (модифицированные белки); Peri F et al., Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A et al., Vaccine 2006, 24(6), 716-29; и Heredia KL et al., Macromoecules 2007, 40(14), 4772-9.

**[00161]** Настоящим раскрытием изобретения предусмотрены многочисленные способы связывания водорастворимого полимера с аминоокси линкером. К примеру, в данном документе описывается связывание линкера с восстанавливающим или невосстанавливающим концом водорастворимого примера, такого как ПСК. Сайт связывания (например, восстанавливающий или невосстанавливающий конец) определяется одним или большим количеством условий (например, время и температура) процесса связывания, а также состоянием (например, нативное или окисленное) водорастворимого полимера. В одном варианте реализации окисленный водорастворимый полимер, такой как ПСК, связывается своим невосстанавливающим концом с аминоокси линкером путем проведения реакции связывания при пониженной температуре (например, между 2-8°C). В другом варианте реализации нативный (например, неокисленный) водорастворимый полимер, такой как ПСК, связывается своим невосстанавливающим концом с аминоокси линкером путем проведения реакции связывания при повышенной температуре (например, между 22-37°C). Вышеупомянутые варианты реализации более подробно описаны ниже и в Примерах.

**[00162]** В данном документе описано, что реакция окисленной ПСК с диаминоокси линкером демонстрирует две реакции: «быструю реакцию» альдегидной группы на невосстанавливающем конце и «медленную реакцию» на восстанавливающем конце. Если нативная ПСК (которая не окислена и не содержит активной альдегидной группы) реагирует с восстанавливающим концом при комнатной температуре, могут образовываться производные ПСК. Таким образом, в разных вариантах реализации изобретения для минимизации нежелательной побочной реакции на восстанавливающем конце водорастворимого полимера, такого как ПСК, получение реагента ПСК-аминоокси линкера выполняется при температуре между 2-8°C.

**[00163]** В еще одном варианте реализации настоящего раскрытия предложена дериватизация нативной ПСК на восстанавливающем конце. В данном документе считается, что нативная ПСК (которая не окисляется $NaIO_4$ и поэтому не содержащая свободной альдегидной группы на своем невосстанавливающем конце) реагирует с диаминоокси линкером при комнатной температуре и может быть достигнута дериватизация ПСК на ее восстанавливающем конце. Это связывание происходит при раскрытии кольца на восстанавливающем конце и последующем образовании оксима (данная побочная реакция описана выше и является причиной наличия побочного продукта в реагенте аминоокси-ПСК). Эта реакция может проходить с нативной ПСК, приводя к получению степени модификации вплоть до приблизительно 70%.

**[00164]** В качестве основного продукта методом 13C-ЯМР спектроскопии была определена следующая структура:



.

Эта реакция может быть перенесена на другие углеводы, подобные декстрану и крахмалу или другим полисахаридам, содержащие восстанавливающие концевые группы. Также предусмотрено использование нуклеофильного катализатора, подобного м-толуидину

или анилину. Таким образом, в данном документе предложено приготовление реагентов аминоокси-ПСК с использованием нативной ПСК (т.е. без предварительного окисления), которые потом могут применяться для химической модификации терапевтических белков.

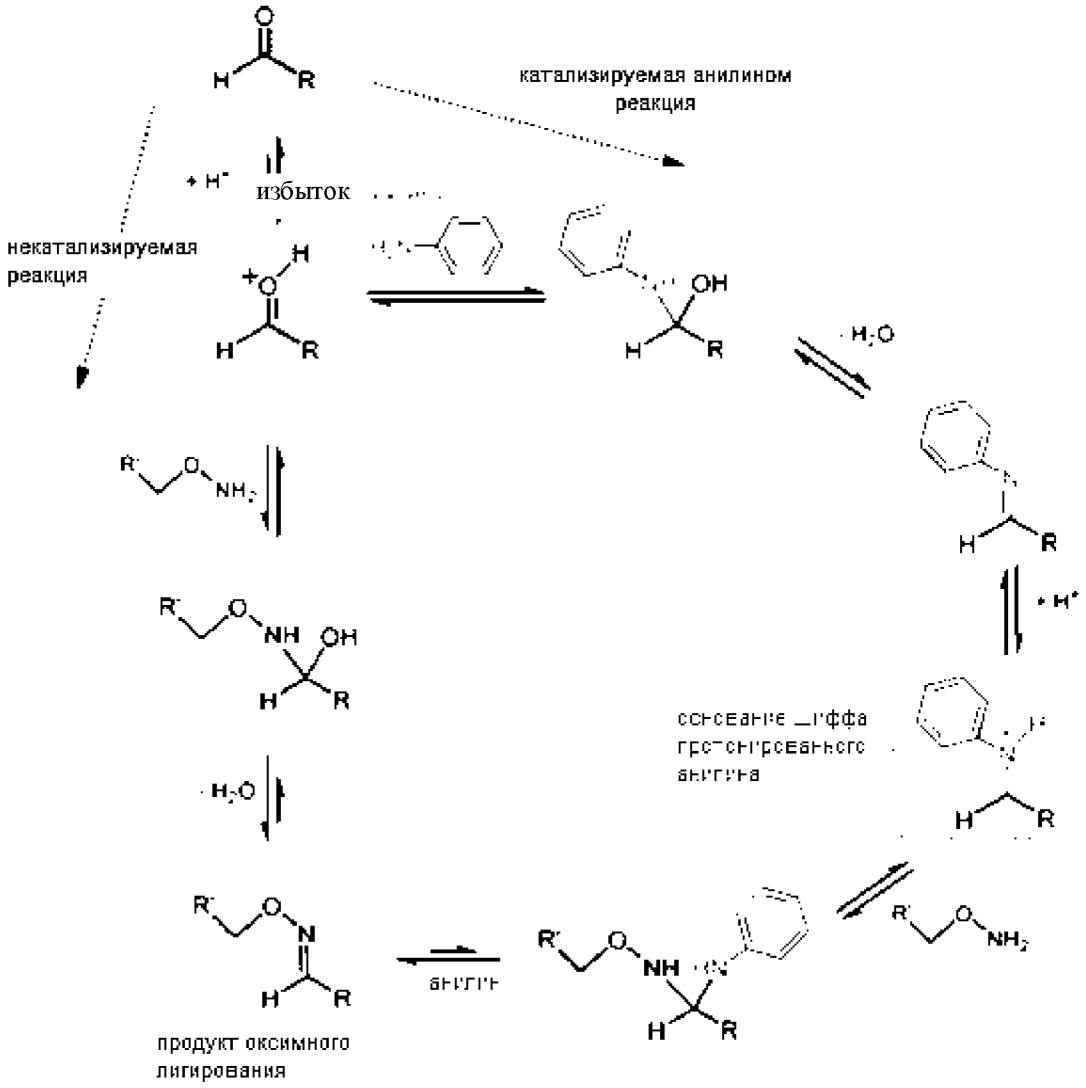
**[00165]** Поэтому, в разных вариантах настоящего раскрытия изобретения представлены способы, в которых описаны условия связывания (например, температура инкубации 2-8°C) диаминоокси линкера с водорастворимым полимером, таким как окисленная ПСК, благоприятные для связывания с любым невосстанавливающим концом или, в одном альтернативном варианте, в котором условия связывания (например, комнатная температура инкубации) диаминоокси линкера с водорастворимым полимером, таким как нативная неокисленная ПСК, благоприятные для связывания с любым восстанавливающим концом.

**[00166]** В разных вариантах реализации изобретения водорастворимый полимер, который согласно аминоокси технологии, описанной в данном документе, связан с окисленным углеводным компонентом терапевтического белка (например, FVIII, FVIIa или FIX), включает, но не ограничивается: полиэтиленгликолем (ПЭГ), разветленным ПЭГ, полисиаловой кислотой (ПСК), углеводом, полисахаридами, пуллуланом, хитозаном, гиалуроновой кислотой, хондроитин сульфатом, дерматан сульфатом, крахмалом, декстраном, карбоксиметилдекстраном, полиалкиленоксидом (ПАО), полиалкиленгликолем (ПАГ), полипропиленгликолем (ППГ), полиоксазолином, полиакрилоилморфолином, поливиниловым спиртом (ПВС), поликарбоксилатом, поливинилпирролидоном, полифосфазеном, полиоксазолином, сополимером полиэтилена-ангидрида малеиновой кислоты, сополимером полистирола-ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтилен-гидроксиметилформалем) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмония фосфатом (МФК).

**НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ**

**[00167]** Как описано в данном документе, конъюгация водорастворимых полимеров с терапевтическими белками может катализироваться анилином. Анилин сильно катализирует водные реакции альдегидов и кетонов с аминами с образованием стабильных

иминов, таких как гидразоны и оксимы. На следующей диаграмме сравниваются некатализируемая и катализируемая анилином реакция оксимного лигирования (Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50):




**[00168]** Однако, принимая во внимание многочисленные риски для здоровья, связанные с анилином, желательно использование альтернативных катализаторов. В настоящем изобретении предложены производные анилина в качестве альтернативных катализаторов оксимного лигирования. Такие производные анилина включают, но не ограничиваются, о-аминобензойной кислотой, м-аминобензойной кислотой, п-аминобензойной кислотой, сульфаниловой кислотой, о-аминобензамидом, о-толуидином, м-толуидином, п-толуидином, о-анизидином, м-анизидином и п-анизидином.

**[00169]** В одном варианте реализации изобретения м-толуидин (известный как мета-толуидин, м-метиланилин, 3-метиланилин или 3-амино-1-метилбензол) применяют для катализа реакций

конъюгации, описанных в данном документе. М-толуидин и анилин обладают подобными физическими свойствами и, особенно, одинаковым значением pKa (м-толуидин: pKa 4,73, анилин: pKa 4,63).

**[00170]** Нулеофильные катализаторы этого изобретения пригодны для оксимного лигирования (например, используя аминоокси связывание) или образования гидразонов (например, используя методы химии гидразидов). В разных вариантах реализации изобретения предложен нуклеофильный катализатор для реакции конъюгации в концентрации 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 11; 12, 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 25; 30; 35; 40; 45 или 50 мМ. В одном варианте реализации изобретения предложен нуклеофильный катализатор в концентрации между 1 и 10 мМ. В разных вариантах реализации изобретения диапазон pH реакции конъюгации находится в пределах 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 и 7,5. В одном варианте реализации изобретения значение pH находится между 5,5 и 6,5.

**ОЧИСТКА КОНЪЮГИРОВАННЫХ БЕЛКОВ**

**[00171]** В разных вариантах реализации изобретения требуется очистка белка, который инкубировали с окисляющим агентом и/или терапевтическим белком, который был конъюгирован с водорастворимым полимером в соотвествии с настоящем ракрытием. В этой области известны многочисленные методики очистки, которые включают, без ограничения, хроматографические методы такие как ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобными взаимодействиями, эксклюзионная хроматография и аффинная хроматография или их комбинации, методы фильтрации (например, УФ/ДФ) и методы осаждения, а также методики диализа и любые комбинации вышеупомянутых методов (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology том 463 (под ред. Burgess RR and Deutscher MP), 2e изд., Academic Press 2009).

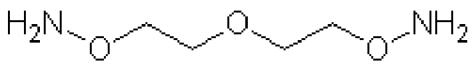
**[00172]** Следующие примеры не предназначены для ограничения, а являются лишь примерами отдельных вариантов реализации этого изобретения.

**ПРИМЕРЫ**

**Пример 1**

Получение гомобифункционального линкера $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$

**[00173]** Гомобифункциональный линкер $NH_2[OCH_2CH_2]_2ONH_2$

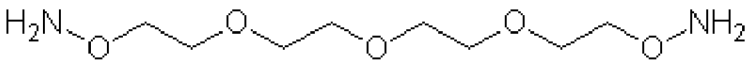


**[00174]** (3-окса-пентан-1,5-диоксиамин), содержащий две активные аминоокси группы, был синтезирован согласно статье Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) в двухстадийной органической реакции с применением модифицированного синтеза Габриэля из первичных аминов (Фигура 3). На первой стадии одна молекула 2,2-хлордиэтилового эфира реагировала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в диметилформамиде (ДМФ). Требуемый гомобифункциональный продукт был приготовлен из полученного промежуточного продукта путем гидразинолиза в этаноле.

**Пример 2**

Получение гомобифункционального линкера $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$

**[00175]** Гомобифункциональный линкер $NH_2[OCH_2CH_2]_4ONH_2$

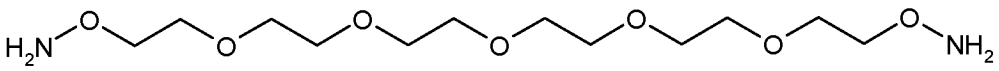


**[00176]** (3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиамин), содержащий две активные аминоокси группы, был синтезирован согласно статье Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) в двухстадийной органической реакции с применением модифицированного синтеза Габриэля из первичных аминов (Фигура 3). На первой стадии одна молекула бис-(2-(2-хлорэтокси)этил)-эфира реагировала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в ДМФ. Требуемый гомобифункциональный продукт был приготовлен из полученного промежуточного продукта путем гидразинолиза в этаноле.

**Пример 3**

Получение гомобифункционального линкера $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$

**[00177]** Гомобифункциональный линкер $NH_2[OCH_2CH_2]_6ONH_2$



**[00178]** (3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиамин), содержащий две активные аминоокси группы, был синтезирован согласно статье Boturyn et al. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) в двухстадийной органической реакции с применением модифицированного синтеза Габриэля из первичных аминов. На первой стадии одна молекула дихлорида гексаэтиленгликоля реагировала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в ДМФ. Требуемый гомобифункциональный продукт был приготовлен из полученного промежуточного продукта путем гидразинолиза в этаноле.

**Пример 4**

Подробный синтез реагента аминоокси-ПСК

**[00179]** 3-окса-пентан-1,5-диоксиамин был синтезирован согласно статье Botyryn et al (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) в двухстадийном органическом синетзе как изложено в Примере 1.

Стадия 1:

**[00180]** К раствору эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксиимида (59,0 г; 1,00 экв.) в 700 мл безводного N,N-диметилформамида добавили безводный $K_2CO_3$ (45,51 г; 1,00 экв.) и 2,2-дихлордиэтиловый эфир (15,84 мл; 0,41 экв.). Реакционную смесь перемешали в течение 22 ч при 50°C. Смесь выпарили при пониженном давлении до сухого состояния. Остаток суспендировали в 2 л дихлорметана и два раза экстрагировали насыщенным водным раствором NaCl (каждый раз по 1 л). Слой с дихлорметаном высушили над $Na_2SO_4$ и потом выпарили при пониженном давлении до сухого состояния и высушили в высоком вакууме, что привело к получению 64,5 г 3-оксапентан-1,5-диокси-эндо-2',3'-дикарбоксидиимиденорборнена в виде бело-желтого твердого вещества (промежуточный продукт 1).

Стадия 2:

**[00181]** К раствору промежуточного продукта 1 (64,25 г; 1,00 экв.) в 800 мл безводного этанола добавили 31,0 мл гидрата гидразина (4,26 экв.). Потом реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течении 2 часов. Смесь сконцентрировали до половины исходного объема путем испарения растворителя под

пониженным давлением. Появившийся осадок отфильтровали. Оставшийся этанольный слой выпарили под пониженным давлением до сухого состояния. Остаток, содержащий неочищенный продукт 3-окса-пентан-1,5-диоксиамин высушили под вакуумом с выходом 46,3 г. Далее неочищенный продукт очистили методом колоночной хроматографии (Силикагель 60; изократическое элюирование смесью дихлорметана/метанола, 9/1) с получением 11,7 г чистого конечного продукта 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина.

**Пример 5**

Получение аминоокси-ПСК

**[00182]** 1000 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 16 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0. Потом к реакционной смеси добавили 170 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 2 часов при КТ добавили 78,5 мг цианборогидрида натрия, и реакцию оставили протекать в течении 18 часов на ночь. Потом реакционную смесь подвергли процедуре ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с отсекающим порогом 5 кДа, сделанной из регенерируемой целлюлозы (50 $см^2$, Millipore).

**Пример 6**

Получение аминоокси-ПСК с применением стадии хроматографической очистки

**[00183]** 1290 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 25 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (Буферный раствор А). Потом к реакционной смеси добавили 209 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 1 часа при КТ добавили 101 мг цианборогидрида натрия, и реакцию оставили протекать в течении 3 часов. Потом смесь подвергли стадии неспецифической анионообменной хроматографии с применением геля для хроматографии Fractogel EMD DEAE 650-M (размер колонки: XK26/135). Реакционную смесь разбавили 110 мл Буферного раствора А и нанесли на ДЭАЭ-колонку предварительно уравновешенную Буферным раствором А при скорости потока 1 см/мин. Потом колонку промыли 20 объемами колонки (ОК) Буферного раствора В (20 мМ

Гэпэс, pH 6,0) для удаления свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и цианида при скорости потока 2 см/мин. Реагент аминоокси-ПСК потом элюировали со ступенчатым градиентом, содержащим 67% Буферного раствора B и 43% Буферного раствора C (20 мМ Гэпэс, 1M NaCl, pH 7,5). Элюат сконцентрировали с помощью УФ/ДФ с применением мембраны с порогом 5 кДа, сделанной из полиэфирсульфона (50 $см^2$, Millipore). Конечную стадию диафильтрации провели против Буферного раствора D (20 мМ Гэпэс, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследовали аналитическими методами путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего количества аминоокси групп (анализ с ТНБС) для определения степени модификации. Более того была определена полидисперсность, а также содержание свободных 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и цианида.

**Пример 7**

Получение аминоокси-ПСК без стадии восстановления

**[00184]** 573 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 11,3 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (Буферный раствор A). Потом к реакционной смеси добавили 94 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 5 часов при КТ смесь подвергли стадии неспецифической анионообменной хроматографии с применением геля для хроматографии Fractogel EMD DEAE 650-M (размер колонки: XK16/105). Реакционную смесь разбавили 50 мл Буферного раствора A и нанесли на ДЭАЭ-колонку предварительно уравновешенную Буферным раствором A при скорости потока 1 см/мин. Потом колонку промыли 20 ОК Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, pH 6,0) для удаления свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и цианида при скорости потока 2 см/мин. Реагент аминоокси-ПСК элюировали со ступенчатым градиентом, содержащим 67% Буферного раствора B и 43% Буферного раствора C (20 мМ Гэпэс, 1M NaCl, pH 7,5). Элюат сконцентрировали с помощью УФ/ДФ с применением мембраны с порогом 5 кДа, сделанной из полиэфирсульфона (50 $см^2$, Millipore). Конечную стадию диафильтрации провели против Буферного раствора D (20 мМ Гэпэс, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследовали аналитическими

методами путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего количества аминоокси групп (анализ с ТНБС) для определения степени модификации. Более того, была определена полидисперсность, а также содержание свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина.

**Пример 8**

Получение аминоокси-ПСК без стадии восстановления в присутствии нуклеофильного катализатора м-толуидина

**[00185]** 573 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворяют в 9 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (Буферный раствор A). Потом в реакционную смесь вносят 94 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина. Далее к этой реакционной смеси добавляют 2,3 мл 50 мМ маточного раствора м-толуидина. Потом, после встряхивания в течение 2 часов при КТ, смесь подвергают стадии неспецифической анионообменной хроматографии с применением геля для хроматографии Fractogel EMD DEAE 650-M (размер колонки: XK16/105). Реакционную смесь разбавляют 50 мл Буферного раствора A и наносят на ДЭАЭ-колонку предваритильно уравновешенную Буферным раствором A при скорости потока 1 см/мин. Потом колонку промывают 20 ОК Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, pH 6,0) для удаления свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и цианида при скорости потока 2 см/мин. Реагент аминоокси-ПСК элюируют ступенчатым градиентом, содержащим 67% Буферного раствора B и 43% Буферного раствора C (20 мМ Гэпэс, 1M NaCl, pH 7,5). Элюат концентрируют с помощью УФ/ДФ с применением мембраны с порогом 5 кДа, сделанной из полиэфирсульфона (50 $см^2$, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против Буферного раствора D (20 мМ Гэпэс, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего количества аминоокси групп (анализ с ТНБС) для определения степени модификации. Более того определяют полидисперсность, а также содержание свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина.

**Пример 9**

Получение реагента аминоокси-ПСК

**[00186]** Реагент аминоокси-ПСК был приготовлен в соответствии с примерами 4-8. После диафильтрации продукт был заморожен при -80°C и лиофилизирован. После лиофилизации реагент растворили в подходящем объеме воды и использовали для получения конъюгатов ПСК-белок с помощью модификации углеводов.

**Пример 10**

Оценка эффективности разных альтернативных нуклеофильных катализаторов

**[00187]** rFIX инкубировали с перйодатом натрия и реагентом аминоокси-ПСК в стандартизированных условиях (1 мг/мл rFIX в 20 мМ L-гистидине, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,0, 5-кратным молярным избытком реагента аминоокси-ПСК, 100 мкМ $NaIO_4$), используя разные нуклеофильные катализаторы (анилин, м-толуидин, о-анизидин, м-анизидин, о-аминобензойная кислота, м-аминобензойная кислота, п-аминобензойная кислота, п-аминобензамид, сульфаниловая кислота/стандартная концентрация: 10 мМ). Реакция проводилась в течение 2 часов в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и реакцию остановили в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением водного раствора цистеина до конечной концентрации 1 мМ.

**[00188]** Эффективность связывания определили методом ДСН-ПААГ-ЄЛЕКТРОФОРЕЗ, используя минисистему X-cell компании Invitrogen. В образцы внесли добавки буферного раствора с додецилсульфатом лития (ДСЛ) и провели их денатурацию в течение 10 мин при 70°C. Потом образцы нанесли на 3-8% гель с ТРИС-ацетатом и провели анализ при напряжении 150 В в течение 60 мин. Потом гели окрасили с помощью Кумасси.

**[00189]** Дополнительно образцы исследовали с использованием системы для ЭХ-ВЭЖХ, системы для ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованной колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77).

**[00190]** Образцы по 50 мкл ввели без разведения и элюировали в изократических условиях профильтрованным через фильтр с порами 0,22 мкм раствором из 20 мМ $NaH_2PO_4$, 50 мМ $Na_2SO_4$ с pH 6,1 при

скорости потока 0,5 мл/мин. Профиль элюции записывали при 280 нм.

**[00191]** Результаты анализа собраны на Фигурах 5A-C и 6 (ДСН ПААГ-электрофорез) и в табл. 2 (результаты ЭХ-ВЭЖХ). Таким образом продемонстрировано каталитическое действие различных веществ. Показано, что использование м-толуидина приводит к результатам, эквивалентным результатам, полученным с анилином.

**Таблица 2**

| **Нуклеофильные катализаторы** | **ди-ПСК-связанный rFIX** | **моно-ПСК-связанный rFIX** | **Свободный rFIX** |
|---|---|---|---|
| Без катализатора | 4,5% | 24,9% | 70,6% |
| 10 мМ анилин | 47,7% | 33,6% | 18,7% |
| 10 мМ м-толуидин | 31,4% | 40,8% | 27,8% |
| 10 мМ о-аминобензойная кислота | 30,9% | 38,5% | 30,6% |
| 10 мМ м-аминобензойная кислота | 27,6% | 38,0% | 34,4% |
| 10 мМ п-аминобензойная кислота | 18,1% | 39,3% | 42,6% |
| 10 мМ о-аминобензамид | 15,9% | 38,4% | 45,7% |
| 10 мМ сульфаниловая кислота | 11,8% | 35,8% | 52,4% |

**Пример 11**

Полисиалирование rFIX с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00192]** 12,3 мг rFIX растворили в 6,1 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавили 254 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании, и остановили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 6,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергли УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00193]** Концентрат (8,8 мл), содержащий окисленный rFIX, смешали с 2,46 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и

инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавили реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубировали в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00194]** Свободный rFIX удалили с помощью анионообменной хроматографии (AOX). Реакционную смесь разбавили 15 мл Буферного раствора A (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) и нанесли на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором A. Колонку потом элюировали Буферным раствором B (50 мМ Гэпэс, 1 M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFIX элюируется при проводимости раствора в пределах 12-25 мСм/см, а конъюгат - в пределах 27-45 мСм/см. Далее повысили проводимость содержащих конъюгат фракций до 190 мСм/см буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9) и нанесли на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный реагент аминоокси-ПСК вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции сконцентрировали с помощью УФ/ДФ, используя центрифужное фильтрационное устройство Vivaspin 15R 10 кДа. Конечную стадию диафильтрации провели против гистидинового буферного раствора, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ $CaCl_2$. Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и хромогенной активности FIX. Определили, что конъюгат ПСК-rFIX показал удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного rFIX.

**Способ 2:**

**[00195]** 12,3 мг rFIX растворяют в L-гистидиновом буферном растворе, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$) для получения конечной концентрации белка 1 мг rFIX/мл. Добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до достижения конечной концентрации 100 мкМ и реакционную смесь инкубируют в течение 1

часа в темноте при 4°C, осторожном перемешивании и pH 6,0, останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина (или других останавливающих реагентов) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00196]** Полученный концентрат (8,8 мл), содержащий окисленный rFIX, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубировали (при pH 6,0 в течение 2,5 часов при комнатной температуре; от 0,5 часа до 18 часов при +4°C) в темноте при осторожном перемешивании.

**[00197]** Свободный rFIX удаляют с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавляют подходящим количеством Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) для коррекции проводимости растворов и pH перед нанесением на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFIX элюируют ступенчатым градиентом, используя 25% Буферного раствора В, что приводит к проводимости полученной фракции и конъюгата в пределах 12-25 мСм/см при использовании ступенчатого градиента с 50% Буферного раствора В, что приводит к проводимости фракции конъюгата в пределах 27-45 мСм/см. Далее повышают проводимость содержащей конъюгат фракции до 190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9 или при использовании антихаотропных солей, например, сульфата аммония, ацетата аммония и т.п.) и фракции наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT или сравнимый носитель для ХГВ) предварительно уравновешенную Буферным

раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный реагент аминоокси-ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против L-гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl2. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и хромогенной и свертывающей активности FIX. Для конъюгата ПСК-rFIX определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного rFIX.

**Метод 3:**

**[00198]** 25,4 мг rFIX растворили в 18,7 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавили 531 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 5,07 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и остановили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 25 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00199]** Свободный rFIX удалили с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавили 20 мл Буферного раствора A (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) и нанесли на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором A. Потом колонку элюировали Буферным раствором B (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFIX элюировали при проводимости раствора в пределах 12-25 мСм/см, а конъюгат - в пределах 27-45 мСм/см. Далее повысили проводимость содержащих конъюгат фракций до 190 мСм/см Буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9) и нанесли на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно

уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный реагент аминоокси-ПСК вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрировали с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации провели против гистидинового буферного раствора, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ $CaCl_2$. Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и хромогенной активности FIX. Для конъюгата ПСК-rFIX определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного rFIX. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного FIX. Конъюгат состоял из 57% монополисиалированного, 31% диполисиалированного и 12% триполисиалированного продукта.

**Способ 4:**

**[00200]** 25,4 мг rFIX растворили в L-гистидиновом буферном растворе, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$) для получения конечной концентрации белка 2 мг rFIX/мл. Далее в течение 15 минут добавили 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавили реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и остановили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00201]** Свободный rFIX удалили с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Реакционную смесь разбавили подходящим количеством Буферного раствора A (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) для коррекции проводимости растворов и значения pH перед нанесением на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором A. Потом колонку элюировали Буферным раствором B (50 мМ Гэпэс, 1 M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFIX элюировали ступенчатым градиентом, используя 25% Буферного раствора B, что приводит к проводимости полученной фракции и конъюгата в пределах 12-25 мСм/см при использовании ступенчатого градиента с 50% Буферного раствора B, что приводит к проводимости фракции конъюгата в пределах 27-45 мСм/см. Далее повысили проводимость содержащей конъюгат фракции до 190 мСм/см Буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5 M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9; с использованием антихаотропных солей, например, ацетата аммония) и фракции нанесли на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT или сравнимый носитель для ХГВ), предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 M NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный реагент аминоокси-ПСК вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрировали с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации провели против L-гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ $CaCl_2$. Препарат исследовали аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и хромогенной и свертывающей активности FIX. Для конъюгата ПСК-rFIX определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного rFIX. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что

полученный препарат не содержит свободного FIX. Конъюгат состоял из 57% монополисиалированного, 31% диполисиалированного и 12% триполисиалированного продукта.

**Пример 12**

Полисиалирование rFVIII с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00202]** В реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) перенесли 50 мг rFVIII и разбавили его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавили $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Провели окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию остановили цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Полученный раствор перенесли на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновесили 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный rFVIII элюировали Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1M NaCl, pH 7,0). Собрали фракции, содержащие rFVIII. Определили содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), скорректировали его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и скорректировали pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl. Потом добавили 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания провели в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании и при комнатной температуре. Избыток реагента аминоокси-ПСК удалили с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси повысили до 130 мСм/см добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь нанесли на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновещенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюировали

50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-rFVIII фракции собрали и подвергли УФ/ДФ с использованием мембраны на 30 КДа, сделанной из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, Millipore). Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и хромогенной активности FVIII. Определили, что конъюгат ПСК-rFVIII показал удельную активность > 70% по сравнению с активностью нативного rFVIII.

**Способ 2:**

**[00203]** 58 мг рекомбинантного фактора VIII (rFVIII), полученного в процессе производства ADVATE в буферном растворе Гэпэс (50 мМ ГЭПЭС, ~350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,1% полисорбата 80, pH 7,4), растворяют в реакционном буферном растворе (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) для достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00204]** Окисленный rFVIII дополнительно очищают методом анионообменной хроматографии на носителе EMD TMAE (M) (Merck). Полученную смесь разбавляют Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Этот раствор наносят на колонку для ИОХ (толщина слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл, используя скорость потока 1,5 см/мин. Далее колонку промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Потом окисленный rFVIII элюируют смесью 50:50 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B, с последующей стадией пост-элюирования 5

ОК Буферного раствора B. Стадии элюирования проводятся с использованием скорости потока 1,0 см/мин.

**[00205]** Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFVIII, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00206]** Полученный конъюгат ПСК-rFVIII очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозу FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00207]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00208]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата ПСК-rFVIII в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ

Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПСК-rFVIII отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирают в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIII от основного продукта.

**[00209]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 30 кДа (88 $см^2$, Millipore).

**[00210]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследовали аналитическими методами путем измерения общего белка, хромогенной активности FVIII и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином). Для данного конъюгата рассчитаны удельная активность > 50% и степень ПСК > 5,0.

**Метод 3:**

**[00211]** В реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) перенесли 50 мг rFVIII и разбавили его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавили 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания провели в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании и при комнатной температуре. Далее реакцию остановили цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси повысили до 130 мСм/см добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь нанесли на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюировали раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-

rFVIII фракции собрали и подвергли УФ/ДФ с использованием мембраны на 30 кДа, сделанной из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, Millipore). Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и хромогенной активности FVIII. Для конъюгата ПСК-rFVIII определили удельную активность ≥ 70% по сравнению с активностью нативного rFVIII.

**Способ 4:**

**[00212]** 50 мг рекомбинантного фактора VIII (rFVIII), полученного в процессе производства ADVATE в 50 мМ буферном растворе Гэпэс (50 мМ ГЭПЭС, ~350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,1% полисорбата 80, pH 7,4), растворили в реакционном буферном растворе (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) для достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора скорректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00213]** Далее добавили реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке к этому раствору rFVIII при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавили водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. В заключение, добавили 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00214]** Реакционную смесь инкубировали в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавили добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00215]** Полученный конъюгат ПСК-rFVIII очистили методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00216]** В реакционную смесь внесли ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешали с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора скорректировали до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь нанесли на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00217]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли провели вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом провели элюирование очищенного конъюгата rFVIII в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПСК-rFVIII отслеживали при 280 нм УФ, а элюат, содержавший конъюгат, собрали в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования провели с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIII от основного продукта.

**[00218]** В заключение, очищенный конъюгат сконцентрировали с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 30 кДа (88 $см^2$, Millipore).

**[00219]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследовали аналитическими методами путем измерения общего белка, хромогенной активности FVIII и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

Данные анализа (среднее из 6 последовательных серий):

Технологический выход (метод Брэдфорда): 58,9%

Технологический выход (хром. акт. FVIII): 46,4%

Удельная активность: (хром. акт. FVIII/мг белка): 4148 МЕ/мг

Удельная активность (% исходного вещества): 79,9%

Степень содержания ПСК (моль/моль): 8,1

**Пример 13**

ПЭГилирование rFVIII с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00220]** rFVIII ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 14,7 мг rFVIII растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют 296 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергли УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00221]** Концентрат (10,9 мл), содержащий окисленный rFVIII, смешивают с 2,94 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубировали в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00222]** Наконец, конъюгат ПЭГ-rFVIII очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный

конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану на 30 кДа (50 см2, Millipore). Полученный препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и хромогенной активности FVIII. Предполагается, что конъюгат ПЭГ-rFVIII продемонстрирует удельную активность > 70% по сравнению с определенной активностью нативного rFVIII.

**Способ 2:**

**[00223]** rFVIII ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную навеску или концентрацию rFVIII растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00224]** Окисленный rFVIII дополнительно очищают методом анионообменной хроматографии на носителе EMD TMAE (M) (Merck). Полученную смесь разбавляют Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Этот раствор наносят на колонку для ИОХ (толщина слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл, используя скорость потока 1,5 см/мин. Далее колонку промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Потом окисленный rFVIII элюируют смесью 50:50 (мас./мас.) Буферного раствора A и

Буферного раствора B, с последующей стадией пост-элюирования 5 ОК Буферного раствора B. Стадии элюирования проводятся с использованием скорости потока 1,0 см/мин.

**[00225]** Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFVIII, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00226]** Полученный конъюгат ПЭГ-rFVIII очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00227]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00228]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата rFVIII в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида

кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПЭГ-rFVIII отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирают в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIII от основного продукта.

**[00229]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 30 кДа (Millipore).

**[00230]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Метод 3:**

**[00231]** rFVIII ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 7,84 мг rFVIII, растворенного в 6 мл буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) смешивают с 314 мкл водного раствора перйодата натрия (10 мМ) и 1,57 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00232]** Наконец, конъюгат ПЭГ-rFVIII очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом

подвергают УФ/ДФ, используя мембрану на 30 кДа (88 $см^2$, Millipore). Аналитическое исследование полученного конъюгата с помощью хромогенного анализа FVIII и определения общего белка (метод Брэдфорда) показывает удельную активность > 60% по сравнению с исходным веществом rFVIII.

**Способ 4:**

**[00233]** rFVIII ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску rFVIII переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг rFVIII /мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00234]** Свободный rFVIII удаляют с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Реакционную смесь разбавили подходящим количеством Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) для коррекции проводимости растворов и значения pH перед нанесением на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюировали Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFVIII элюировали ступенчатым градиентом, используя 25% Буферного раствора В, что привело к проводимости полученной

фракции и конъюгате в пределах 12-25 мСм/см при использовании ступенчатого градиента с 50% Буферного раствора B, что приводит к проводимости фракции конъюгата в пределах 27-45 мСм/см. Далее повышают проводимость содержащей конъюгат фракции Буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9, при использовании антихаотропных солей, например, ацетата аммония, сульфата аммония и т.п.) и фракции наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT или сравнимый носитель для ХГВ) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный ПЭГ-реагент вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00235]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 14**

Полисиалирование rFVIIa с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00236]** Исходную концентрацию или навеску рекамбинантного фактора VIIa (rFVIIa) переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 50 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного

раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00237]** Окисленный rFVIIa дополнительно очищают методом анионообменной хроматографии на носителе EMD TMAE (M) (Merck). Полученную смесь разбавляют Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Этот раствор наносят на колонку для ИОХ (толщина слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл, используя скорость потока 1,5 см/мин. Далее колонку промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Потом окисленный rFVIIa элюируют смесью 50:50 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B, с последующей стадией пост-элюирования 5 ОК Буферного раствора B. Стадии элюирования проводятся ч использованием скорости потока 1,0 см/мин.

**[00238]** Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFVIIa, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00239]** Полученный конъюгат ПСК-rFVIIa очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00240]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н.

водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00241]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата rFVIIa в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПСК-rFVIIa отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирают в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIIa от основного продукта.

**[00242]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (например, ПОММ 10 кДа, 88 $см^2$, Millipore).

**[00243]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 2:**

**[00244]** Исходную навеску или концентрацию rFVIIa растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH

раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH.

**[00245]** Далее к этому раствору rFVIIa добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 150 мкМ.

**[00246]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00247]** Полученный конъюгат ПСК-rFVIIa очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00248]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00249]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего

потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата rFVIIa в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПСК-rFVIIa отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирали в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIIa от основного продукта.

**[00250]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы ( Millipore).

**[00251]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 15**

ПЭГилирование rFIX с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00252]** rFIX ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную навеску или концентрацию rFIX растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ.

Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 M) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00253]** Окисленный rFVIII дополнительно очищают методом анионообменной хроматографии на носителе EMD TMAE (M) (Merck). Полученную смесь разбавляют Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Этот раствор наносят на колонку для ИОХ (толщина слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл, используя скорость потока 1,5 см/мин. Далее колонку промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, 1,0 M NaCl, pH 7,0). Потом окисленный rFIX элюируют смесью 50:50 (мас./мас.) Буферного раствора A и Буферного раствора B, с последующей стадией пост-элюирования 5 ОК Буферного раствора B. Стадии элюирования проводятся ч использованием скорости потока 1,0 см/мин.

**[00254]** Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFIX, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00255]** Полученный конъюгат ПЭГ-rFIX очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00256]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом

буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00257]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата rFIX в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПЭГ-rFIX отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирают в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFIX от основного продукта.

**[00258]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 10 кДа (88 см2, Millipore).

**[00259]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00260]** rFIX ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan).

Исходную концентрацию или навеску rFIX переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг rFIX /мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00261]** Свободный rFIX удаляют с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Реакционную смесь разбавили подходящим количеством Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, pH 7,5) для коррекции проводимости растворов и значения pH перед нанесением на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюировали Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5). Свободный rFIX элюировали ступенчатым градиентом, используя 25% Буферного раствора В, что приводит к проводимости полученной фракции и конъюгате в пределах 12-25 мСм/см при использовании ступенчатого градиента с 50% Буферного раствора В, что приводит к проводимости фракции конъюгата в пределах 27-45 мСм/см. Далее повышают проводимость содержащей конъюгат фракции Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9, при использовании антихаотропных солей, например, ацетата аммония и т.п.) и фракции наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT или сравнимый носитель для ХГВ), предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный реагент аминоокси-ПЭГ вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК.

Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00262]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 16**

ПЭГилирование rFVIIa с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00263]** rFVIIa ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную навеску или концентрацию rFVIIa растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 50 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00264]** Окисленный rFVIIa дополнительно очищают методом анионообменной хроматографии на носителе EMD TMAE (M) (Merck). Полученную смесь разбавляют Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl2, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Этот раствор наносят на колонку для ИОХ (толщина слоя: 5,4 см) с

объемом колонки 10 мл, используя скорость потока 1,5 см/мин. Далее колонку промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (мас./мас.) Буферного раствора А и Буферного раствора В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Потом окисленный rFVIIa элюируют смесью 50:50 (мас./мас.) Буферного раствора А и Буферного раствора В, с последующей стадией пост-элюирования 5 ОК Буферного раствора В. Стадии элюирования проводятся ч использованием скорости потока 1,0 см/мин.

**[00265]** Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFVIIa, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании.

**[00266]** Полученный конъюгат ПЭГ-rFVIIa очищают методом хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (ХГВ), используя смолу низкого замещения фенилсефарозы FF (GE Healthcare), упакованную в колонку, произведенную GE Healthcare с толщиной слоя (h) 15 см и конечным объемом колонки (ОК) 81 мл.

**[00267]** В реакционную смесь вносят ацетат аммония добавлением 50 мМ буферного раствора Гэпэс, содержащего 350 мМ хлорида натрия, 8 М ацетата аммония, 5 мМ хлорид кальция, pH 6,9. Два объема реакционной смеси перемешивают с 1 объемом буферной системы, содержащей ацетат аммония, а значение pH раствора корректируют до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора NaOH. Эту смесь наносят на колонку для ХГВ при скорости потока 1 см/мин с последующей стадией промывки, используя > 3 ОК уравновешивающего буферного раствора (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 2,5 М ацетата аммония, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9).

**[00268]** Для удаления побочных продуктов реакции и антихаотропной соли проводят вторую стадию промывки > 5 ОК промывочного буферного раствора 1 (50 мМ Гэпэс, 3 М хлорида

натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) в режиме восходящего потока при скорости потока 2 см/мин. Потом проводят элюирование очищенного конъюгата rFVIIa в режиме нисходящего потока, используя ступенчатый градиент из 40% промывочного буферного раствора 2 (50 мМ Гэпэс, 1,5 М хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9) и 60% элюирующего буферного раствора (20 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5) при скорости потока 1 см/мин. Процесс элюирования конъюгата ПЭГ-rFVIIa отслеживают при 280 нм УФ, а элюат, содержащий конъюгат, собирают в объеме < 4 ОК. Стадию пост-элюирования проводят с > 3 ОК элюирующего буферного раствора в таких же условиях для отделения побочного и/или немодифицированного rFVIIa от основного продукта.

**[00269]** В заключение, очищенный конъюгат концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 10 кДа (Millipore).

**[00270]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00271]** rFVIIa ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску rFVIIa переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг rFVIIa /мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После

коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00272]** Свободный rFVIIa удаляют с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Реакционную смесь разбавили подходящим количеством Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5) для коррекции проводимости растворов и значения pH перед нанесением на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюировали Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, 5 мМ CaCl2, pH 7,5). Свободный rFVIIa элюировали ступенчатым градиентом, используя 25% Буферного раствора В, что привело к проводимости полученной фракции и конъюгате в пределах 12-25 мСм/см при использовании ступенчатого градиента с 50% Буферного раствора В, что приводит к проводимости фракции конъюгата в пределах 27-45 мСм/см. Далее повышают проводимость содержащей конъюгат фракции Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9, при использовании антихаотропных солей, например, ацетата аммония) и фракции наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT или сравнимый носитель для ХГВ), предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, pH 6,9). Свободный ПЭГ-реагент вымыли Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюировали 100% Буферным раствором Е (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00273]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 17**

Полисиалирование rFIX в присутствии о-аминобензойной кислоты

**Способ 1:**

**[00274]** 8,2 мг rFIX растворяют в 4,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют 82 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании, и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 4 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 6 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00275]** Концентрат (6,5 мл), содержащий окисленный rFIX, смешивают с 1,64 мл водного раствора о-аминобензойной кислоты (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубировали в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00276]** Дальнейшую очистку конъюгата проводят как описано в данном документе.

**Способ 2:**

**[00277]** Приготовили раствор 1 мг rFIX в 0,65 мл буферного раствора фосфата натрия, pH 6,0, содержащий 5-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше). Потом в качестве нуклеофильного катализатора добавили 333 мкл водного раствора о-аминобензойной кислоты (30 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Далее добавили 20 мкл водного раствора $NaIO_4$ (5 мМ) до обеспечения конечной концентрации 100 мкМ. Процесс связывания проводили в течение 2 часов в темноте при осторожном перемешивании при комнатной температуре и остановили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 мкл водного раствора цистеина (1 М). Дальнейшую очистку конъюгата проводят как описано в данном документе.

**Пример 18**

Полисиалирование ЭПО с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00278]** Исходную концентрацию эритропоэтина (ЭПО) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00279]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ЭПО элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ЭПО. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00280]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток реагента аминоокси-ПСК удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М

ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ЭПО фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (ПОММ 10 кДа, 50 $см^2$, Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00281]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом.

**[00282]** 10 мг ЭПО растворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ), и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании, и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00283]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный ЭПО, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00284]** Свободный ЭПО удаляют с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 7,5) и наносят на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным

раствором B, а конъюгат - 50% Буферным раствором B. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5 M NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 M NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-ЭПО определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

**Способ 2:**

**[00285]** ЭПО переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 M) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00286]** Окисленный ЭПО дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ЭПО фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00287]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ЭПО, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00288]** Полученный конъюгат ПСК-ЭПО дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ЭПО фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00289]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00290]** Эритропоэтин (ЭПО) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO4 (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной

смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ЭПО фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (ПОММ 10 кДа, 88 $см^2$, Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00291]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. 10 мг ЭПО растворяют в 8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00292]** Свободный ЭПО удаляют с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 7,5) и наносят на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare,

Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-ЭПО определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

**Способ 4:**

**[00293]** ЭПО растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00294]** Далее к этому раствору ЭПО добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00295]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения

конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00296]** Полученный конъюгат ПСК-ЭПО очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ЭПО фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (ПОММ 10 кДа, 88 $см^2$, Millipore).

**[00297]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 19**

Полисиалирование Ang-2 с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00298]** Исходную концентрацию (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00299]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и побочных продуктов или, в качестве альтернативы,переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный Ang-2 элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие Ang-2. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и корректируют его

до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00300]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-Ang-2 фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00301]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00302]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00303]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим

добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-Ang-2 фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00304]** Ang-2 переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00305]** Окисленный Ang-2 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный Ang-2 фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00306]** К элюату, содержащему очищенный окисленный Ang-2, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T)

T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00307]** Полученный конъюгат ПСК-Ang-2 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии.

**[00308]** Содержащие конъюгат ПСК-Ang-2 фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00309]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00310]** Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-Ang-2 фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из

регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00311]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Ang-2 фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00312]** Ang-2 растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00313]** Далее к этому раствору Ang-2 добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00314]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00315]** Полученный конъюгат ПСК-Ang-2 очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Ang-2 фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00316]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 20**

Полисиалирование ФРЭС с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00317]** Исходную концентрацию фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00318]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается

Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ФРЭС элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ФРЭС. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М NaOH.

**[00319]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ФРЭС фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуютаналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00320]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом

реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00321]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00322]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРЭС фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00323]** ФРЭС переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00324]** Окисленный ФРЭС дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФРЭС фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00325]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРЭС, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-

кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00326]** Полученный конъюгат ПСК-ФРЭС дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ФРЭС фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00327]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00328]** Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную

раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФРЭС фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00329]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРЭС фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00330]** ФРЭС растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00331]** Далее к этому раствору ФРЭС добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00332]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00333]** Полученный конъюгат ПСК-ФРЭС очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРЭС фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00334]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 21**

Полисиалирование ЭФР с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00335]** Исходную концентрацию эпидермального фактора роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при

осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00336]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ЭФР элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ЭФР. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00337]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ЭФР фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00338]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Эпидермальный фактор

роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00339]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00340]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ЭФР фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00341]** ЭФР переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С

до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00342]** Окисленный ЭФР дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ЭФР фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00343]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ЭФР, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00344]** Полученный конъюгат ПСК-ЭФР дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ЭФР фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00345]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00346]** Эпидермальный фактор роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании

при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ЭФР фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00347]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00348]** ЭФР растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00349]** Далее к этому раствору ЭФР добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00350]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00351]** Полученный конъюгат ЭФР очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ЭФР фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00352]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 22**

Полисиалирование ФРН с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00353]** Исходную концентрацию фактора роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс,

350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00354]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный ФРН элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ФРН. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00355]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ФРН фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препаратисследуют аналитическими методами путем измерения общего

белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00356]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00357]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00358]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРН фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00359]** ФРН переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом

реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00360]** Окисленный ФРН дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФРН фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00361]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00362]** Полученный конъюгат ПСК-ФРН дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ФРН фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00363]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00364]** Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная

концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФРН фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00365]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ, и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Потом содержащие ПСК-ФРН фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00366]** ФРН растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00367]** Далее к этому раствору ФРН добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00368]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00369]** Полученный конъюгат ФРН очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРН фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00370]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 23**

Полисиалирование ГРЧ с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00371]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00372]** Исходную концентрацию гормона роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00373]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный ГРЧ элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ГРЧ. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00374]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT),

предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ГРЧ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00375]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. ГРЧ переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00376]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00377]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ГРЧ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения

общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00378]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00379]** ГРЧ переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00380]** Окисленный ГРЧ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ГРЧ фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00381]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ГРЧ, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00382]** Полученный конъюгат ПСК-ГРЧ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ГРЧ фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации

(УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00383]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00384]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00385]** Гормон роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ГРЧ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют

аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00386]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. ГРЧ переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Потом содержащие ПСК-ГРЧ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00387]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00388]** ГРЧ растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации

белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00389]** Далее к этому раствору ГРЧ добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00390]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00391]** Полученный конъюгат ГРЧ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ГРЧ фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00392]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 24**

Полисиалирование ФНО-альфа с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**[00393]** Исходную концентрацию фактора некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в

течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00394]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ФНО-альфа элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ФНО-альфа. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00395]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00396]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00397]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00398]** ФНО-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают

добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00399]** Окисленный ФНО-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФНО-альфа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00400]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФНО-альфа, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00401]** Полученный конъюгат ПСК-ФНО-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00402]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00403]** Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания

проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00404]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00405]** ФНО-альфа растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00406]** Далее к этому раствору ФНО-альфа добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00407]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00408]** Полученный конъюгат ФНО-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00409]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 25**

Полисиалирование инсулина с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00410]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. Исходную концентрацию инсулина переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00411]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный инсулин элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие инсулин. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют до pH 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00412]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М

ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-инсулин фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00413]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00414]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00415]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-инсулин фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и

биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00416]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00417]** Инсулин переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00418]** Окисленный инсулин дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный инсулин фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00419]** К элюату, содержащему очищенный окисленный инсулин, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00420]** Полученный конъюгат ПСК-инсулина дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-инсулина фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-

/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00421]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00422]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00423]** Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-инсулин фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод

Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00424]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00425]** Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-инсулин фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00426]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00427]** Инсулин растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора

корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00428]** Далее к этому раствору инсулина добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH2) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00429]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00430]** Полученный конъюгат инсулина очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-инсулин фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00431]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 26**

Полисиалирование интерферона-альфа с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00432]** Исходную концентрацию интерферона-альфа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору

добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00433]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный интерферон-альфа элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие интерферон-альфа. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00434]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и

биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00435]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Интерферон-альфа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00436]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00437]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00438]** Интерферон-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при

температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00439]** Окисленный интерферон-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный интерферон-альфа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00440]** К элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-гамма, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 0,6 в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00441]** Полученный конъюгат ПСК-интерферона-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-интерферона-альфа фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**Способ 3:**

**[00442]** Интерферон-альфа переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной

смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00443]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Интерферон-альфа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00444]** Интерферон-альфа растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ

хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00445]** Далее к этому раствору интерферона-альфа добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00446]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00447]** Полученный конъюгат интерферона-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00448]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 27**

Полисиалирование интерферона-гамма с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00449]** 10 мг интерферона-гамма растворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150

мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00450]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный интерферон-гамма, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00451]** Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором Е (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с

pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

**Способ 2:**

**[00452]** 10 мг интерферона-гамма растворяют в 8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00453]** Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают

Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

**Способ 3:**

**[00454]** 10 мг интерферона-гамма растворяют в 8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00455]** Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора A (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором A. Потом колонку элюируют Буферным раствором B (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором B, а

конъюгат - 50% Буферным раствором B. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором C (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

**Способ 4:**

**[00456]** Интерферон-гамма растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00457]** Далее к этому раствору интерферона-гамма добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения

конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00458]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00459]** Полученный конъюгат интерферона-гамма очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-интерферон-гамма фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00460]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 28**

Полисиалирование Г-КСФ с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00461]** Исходную концентрацию гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00462]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов

или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный Г-КСФ элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие Г-КСФ. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00463]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-Г-КСФ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00464]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при

КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00465]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Г-КСФ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00466]** Г-КСФ переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00467]** Окисленный Г-КСФ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный Г-КСФ фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00468]** К элюату, содержащему очищенный окисленный Г-КСФ, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00469]** Полученный конъюгат ПСК-Г-КСФ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-Г-КСФ фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00470]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00471]** Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH

6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-Г-КСФ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00472]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Г-КСФ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00473]** Г-КСФ растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора

корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00474]** Далее к этому раствору Г-КСФ добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00475]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00476]** Полученный конъюгат Г-КСФ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Г-КСФ фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00477]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 29**

Полисиалирование белка Хумира с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00478]** Исходную концентрацию белка Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ.

Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00479]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный белок Хумира элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие белок Хумира. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00480]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-белок Хумира фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00481]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00482]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии.Содержащие ПСК-белок Хумира фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00483]** Белок Хумира переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1

М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00484]** Окисленный белок Хумира дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный белок Хумира фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00485]** К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Хумира, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00486]** Полученный конъюгат ПСК-белок Хумира дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-белок Хумира фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00487]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00488]** Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в

темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-белок Хумира фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00489]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-белок Хумира фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00490]** Белок Хумира растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00491]** Далее к этому раствору белка Хумира добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00492]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00493]** Полученный конъюгат белка Хумира очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-белок Хумира фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00494]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 30**

Полисиалирование белка Пролиа с использованием аминоокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00495]** Исходную концентрацию белка Пролиа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют $NaIO_4$ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

**[00496]** После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравновешивается Буферным раствором A (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК Буферного раствора A. Окисленный белок Пролиа элюируют Буферным раствором B (20 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие белок Пролиа. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

**[00497]** Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминоокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Наконец, содержащие ПСК-белок Пролиа

фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00498]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. 10 мг белка Пролиа растворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00499]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный белок Пролиа, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00500]** Свободный белок Пролиа удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield,

СТ) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-белок Пролиа определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

**Способ 2:**

**[00501]** Белок Пролиа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00502]** Окисленный белок Пролиа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный белок

Пролиа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00503]** К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Пролиа, добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

**[00504]** Полученный конъюгат ПСК-белок Пролиа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие конъюгат белка Пролиа, собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00505]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Способ 3:**

**[00506]** Белок Пролиа переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и $NaIO_4$ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 часов в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего

ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-белок Пролиа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00507]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. 10 мг белка Пролиа растворяют в 8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00508]** Свободный белок Пролиа удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield,

СТ) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-белок Пролиа определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

**Способ 4:**

**[00509]** Белок **Пролиа** растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

**[00510]** Далее к этому раствору белка Пролиа добавляют реагент аминоокси-полисиаловую кислоту (ПСК-$ONH_2$) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

**[00511]** Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном

встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00512]** Полученный конъюгат белка Пролиа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-белок Пролиа фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

**[00513]** Конъюгаты, полученные с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка, биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области, и определением степени полисиалирования с помощью измерения содержания ПСК (анализ с резорцином).

**Пример 31**

Полисиалирование других терапевтических белков

**[00514]** Реакции полисиалирования, которые проводят в присутствии альтернативных нуклеофильных катализаторов подобных м-толуидину или о-аминобензойной кислоте как описано в данном документе, могут быть распространены на другие терапевтические белки. К примеру, в разных аспектах данного изобретения описанные выше в данном документе реакции полисиалирования или ПЭГилирования с ПСК-аминооксии или ПЭГ-аминооксии реагентами повторяют с терапевтическими белками, такими как те белки, которые описаны в данном документе.

**Пример 32**

ПЭГилирование ЭПО с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00515]** Эритропоэтин (ЭПО) ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭПО растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0

(20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00516]** После этого содержащий окисленный ЭПО концентрат смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00517]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00518]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. ЭПО ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг ЭПО растворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C

при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00519]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный ЭПО, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00520]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 7,5) и наносят на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПЭГ-ЭПО определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

**Способ 2:**

**[00521]** ЭПО ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan).

**[00522]** ЭПО переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00523]** Окисленный ЭПО дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ЭПО фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00524]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ЭПО, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00525]** Полученный конъюгат ПЭГ-ЭПО дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ЭПО, собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00526]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения

общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00527]** ЭПО ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭПО растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00528]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00529]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. ЭПО ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг ЭПО растворяют в ~8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют

реагент аминоокси-ПЭГс ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00530]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 7,5) и наносят на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПЭГ-ЭПО определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

**Способ 4:**

**[00531]** ЭПО ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ЭПО переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5

мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ЭПО/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00532]** Конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 $см^2$, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00533]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 33**

ПЭГилирование Ang-2 с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00534]** Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Ang-2 растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и

останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00535]** После этого концентрат, содержащий окисленный Ang-2, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00536]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00537]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Ang-2 растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением

центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00538]** После этого концентрат, содержащий окисленный Ang-2, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00539]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00540]** Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan).

**[00541]** Ang-2 переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00542]** Окисленный Ang-2 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный Ang-2 фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00543]** К элюату, содержащему очищенный окисленный Ang-2, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00544]** Полученный конъюгат ПЭГ-Ang-2 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-Ang-2 фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00545]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00546]** Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Ang-2 растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00547]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают методом ионообменной хроматографии на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00548]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Ang-2 растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00549]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и затем подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00550]** Ang-2 ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan).

Исходную концентрацию или навеску Ang-2 переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг Ang-2/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00551]** Конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00552]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**[00553]** Далее свободный Ang-2 удаляют с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ.

**Пример 34**

ПЭГилирование ФРЭС с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00554]** ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии

Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРЭС растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00555]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФРЭС, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00556]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭС очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00557]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРЭС растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ

$CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00558]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФРЭС, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00559]** В заключение, конъюгат ПЭГ-ФРЭС очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00560]** ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan).ФРЭС переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного

раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при Т=+22 +/- 2°С до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00561]** Окисленный ФРЭС дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФРЭС фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00562]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРЭС, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°С при осторожном встряхивании.

**[00563]** Полученный конъюгат ПЭГ-ФРЭС дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-ФРЭС фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00564]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00565]** ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРЭС растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при

осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00566]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭС очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00567]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРЭС растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00568]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭС очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00569]** ФРЭС ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ФРЭС переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ФРЭС/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00570]** Конъюгат ПЭГ-ФРЭС очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00571]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 35**

ПЭГилирование ЭФР с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00572]** ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси

группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭФР растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00573]** После этого концентрат, содержащий окисленный ЭФР, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00574]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭФР очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00575]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭФР растворяют в 7,0 мл гистидинового

буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00576]** После этого концентрат, содержащий окисленный ЭФР, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00577]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭФР очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00578]** ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭФР переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом

реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00579]** Окисленный ЭФР дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ЭФР фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00580]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00581]** Полученный конъюгат ПЭГ-ЭФР дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-ЭФР фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00582]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00583]** ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭФР растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь

инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00584]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭФР очищают методом ионообменной хроматографии на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00585]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭФР растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00586]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭФР очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00587]** ЭФР ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ЭФР переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ЭФР/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00588]** Конъюгат ПЭГ-ЭФР очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00589]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 36**

ПЭГилирование ФРН с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00590]** ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси

группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРН растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00591]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФРН, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00592]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00593]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРН растворяют в 7,0 мл гистидинового

буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00594]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФРН, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00595]** В заключение, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00596]** ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРН переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (Т) Т=+22 +/- 2°C. Потом

реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00597]** Окисленный ФРН дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФРН фракции элюата собирают и используют для реакции конъюгации.

**[00598]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00599]** Полученный конъюгат ПЭГ-ФРН дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-ФРН фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00600]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00601]** ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРН растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь

инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00602]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00603]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФРН растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00604]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00605]** ФРН ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ФРН переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ФРН/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00606]** Конъюгат ПЭГ-ФРН очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00607]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 37**

ПЭГилирование ГРЧ с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00608]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала

модифицируют для внедренияпо меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00609]** ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ГРЧ растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00610]** После этого концентрат, содержащий окисленный ГРЧ, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00611]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00612]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00613]** ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ГРЧ растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00614]** После этого концентрат, содержащий окисленный ГРЧ, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00615]** В заключение, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00616]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00617]** ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ГРЧ переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00618]** Окисленный ГРЧ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ГРЧ фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00619]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ГРЧ, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00620]** Полученный конъюгат ПЭГ-ГРЧ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-ФРН фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации

(УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00621]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00622]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00623]** ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ГРЧ растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00624]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают методом ионообменной хроматографии на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения

общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00625]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ГРЧ растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00626]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00627]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00628]** ГРЧ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси

группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ГРЧ переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ГРЧ/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00629]** Конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00630]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 38**

ПЭГилирование ФНО-альфа с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00631]** ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии

Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФНО-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00632]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФНО-альфа, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00633]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00634]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФНО-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150

мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00635]** После этого концентрат, содержащий окисленный ФНО-альфа, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00636]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00637]** ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФНО-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом

реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00638]** Окисленный ФНО-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный ФНО-альфа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00639]** К элюату, содержащему очищенный окисленный ФНО-альфа, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00640]** Полученный конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00641]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00642]** ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФНО-альфа растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь

инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00643]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00644]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ФНО-альфа растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00645]** Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00646]** ФНО-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску ФНО-альфа переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг ФНО-альфа/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00647]** Конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00648]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 39**

ПЭГилирование инсулина с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00649]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения

по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Инсулин растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00650]** После этого концентрат, содержащий окисленный инсулин, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00651]** Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулина очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00652]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе

описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Инсулин растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00653]** После этого концентрат, содержащий окисленный инсулин, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00654]** Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулина очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00655]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки

инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00656]** Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Инсулин переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00657]** Окисленный инсулин дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный инсулин фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00658]** К элюату, содержащему очищенный окисленный инсулин, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00659]** Полученный конъюгат ПЭГ-инсулина дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-инсулина фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00660]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00661]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00662]** Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Инсулин растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останввливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00663]** Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулина очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00664]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. В данном документе

описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами. Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Инсулин растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00665]** Наконец, конъюгат инсулина очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00666]** В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют in vitro в соответствии с известными в этой области способами.

**[00667]** Инсулин ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску инсулина переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения

конечной концентрации белка 2 мг инсулина/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00668]** Конъюгат ПЭГ-инсулина очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00669]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 40**

ПЭГилирование интерферона-альфа с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00670]** Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C

при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00671]** После этого концентрат, содержащий окисленный интерферон-альфа, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00672]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препаратисследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00673]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают

УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00674]** После этого концентрат, содержащий окисленный интерферон-альфа, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00675]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препаратисследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00676]** Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00677]** Окисленный интерферон-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный интерферон-альфа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00678]** К элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-альфа, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00679]** Полученный конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00680]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00681]** Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-альфа растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15

мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00682]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00683]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-альфа растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00684]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00685]** Интерферон-альфа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего

аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску интерферона-альфа переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг интерферона-альфа/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00686]** Конъюгат ПЭГ-интерферона-альфа очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00687]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 41**

ПЭГилирование интерферона-гамма с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00688]** Интерферон-гамма ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент

серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг интерферона-гамма растворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00689]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный интерферон-гамма, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00690]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-гамма очищают ионообменной хроматографией на SP-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПЭГ-интерферон-гамма определили удельную активность >

50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

**Способ 2:**

**[00691]** Интерферон-гамма ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Интерферон-гамма переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00692]** Окисленный интерферон-гамма дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный интерферон-гамма фракции элюата собирают и используют для реакции конъюгации.

**[00693]** К элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-гамма, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00694]** Полученный конъюгат ПЭГ-интерферона-гамма дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-интерферона-гамма фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**[00695]** Конъюгат, полученный с использованием этой методики, исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка и биологической активности в соотвествии с методами, известными в этой области.

**Способ 3:**

**[00696]** Интерферон-гамма ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг интерферон-гамма растворяют в ~8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПЭГс ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00697]** Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферона-гамма очищают ионообменной хроматографией на SP-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа,

сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с известными в этой области методами. Для конъюгата ПЭГ-интерферон-гамма определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

**Способ 4:**

**[00698]** Интерферон-гамма ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску интерферона-гамма переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг интерферона-гамма/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00699]** Конъюгат ПЭГ-интерферона-гамма очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции

элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00700]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 42**

ПЭГилирование Г-КСФ с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00701]** Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Г-КСФ растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00702]** После этого концентрат, содержащий окисленный Г-КСФ, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00703]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку,

уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препаратисследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00704]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Г-КСФ растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00705]** После этого концентрат, содержащий окисленный Г-КСФ, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00706]** В заключение, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси,

метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00707]** Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Г-КСФ переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00708]** Окисленный Г-КСФ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный Г-КСФ фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00709]** К элюату, содержащему очищенный окисленный Г-КСФ, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00710]** Полученный конъюгат ПЭГ-Г-КСФ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПЭГ-Г-КСФ фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из

регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**Способ 3:**

**[00711]** Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Г-КСФ растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00712]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00713]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Г-КСФ растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси

реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00714]** Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00715]** Г-КСФ ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску Г-КСФ переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг Г-КСФ/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00716]** Конъюгат Г-КСФ очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания

10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00717]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 43**

ПЭГилирование белка Хумира с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00718]** Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Хумира растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00719]** После этого концентрат, содержащий окисленный белок Хумира, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00720]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Хумира очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4,

содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00721]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Хумира растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00722]** После этого концентрат, содержащий окисленный белок Хумира, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00723]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Хумира очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси,

метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 2:**

**[00724]** Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Хумира переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00725]** Окисленный белок Хумира дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный белок Хумира фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00726]** К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Хумира, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00727]** Полученный конъюгат ПЭГ-белка Хумира дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-белка Хумира, собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из

регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**Способ 3:**

**[00728]** Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Хумира растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00729]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Хумира очищают методом ионообменной хроматографии на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00730]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом. Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Хумира растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют

аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00731]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Хумира очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции собирают и потом подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**Способ 4:**

**[00732]** Белок Хумира ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску белка Хумира переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг белка Хумира/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00733]** Конъюгат белка Хумира очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог

отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00734]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 44**

ПЭГилирование белка Пролиа с использованием реагента аминоокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

**Способ 1:**

**[00735]** Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Пролиа растворяют в 7,0 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$). Потом добавляют водный раствор перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00736]** После этого концентрат, содержащий окисленный белок Пролиа, смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00737]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Пролиа очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-сефарозе FF). К примеру, конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку, уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4,

содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану с подходящим порогом отсекания ММ. После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00738]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом. Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг rFIXрастворяют в 5 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 100 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и реакционную смесь инкубируют в течение 1 часа в темноте при 4°C при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Далее смесь подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка перйодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

**[00739]** Концентрат (приблиз. 7 мл), содержащий окисленный белок Пролиа, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Эту смесь инкубируют в течение 2,5 ч при КТ в темноте при осторожном перемешивании.

**[00740]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Пролиа очищают ионообменной хроматографией на SP-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором

B (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором B, а конъюгат - 50% Буферным раствором B. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПЭГ-белка Пролиа определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

**Способ 2:**

**[00741]** Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Белок Пролиа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0 +/- 0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 минут добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 +/- 5 мин при температуре (T) T=+22 +/- 2°C. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 минут при T=+22 +/- 2°C до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 +/- 5 мин.

**[00742]** Окисленный белок Пролиа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный белок Хумира фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

**[00743]** К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Пролиа, добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 минут добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 +/- 10 мин в темноте при температуре (T) T=+22 +/- 2°C при осторожном встряхивании.

**[00744]** Полученный конъюгат ПЭГ-белка Пролиа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-белка Пролиа, собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекания молекулярной массы (Millipore).

**Способ 3:**

**[00745]** Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). ЭПО растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0), смешивают с водным раствором перйодата натрия (10 мМ) и водным раствором м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют аминоокси реагент до получения 20-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

**[00746]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Пролиа очищают ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Конъюгат в концентрации 1,5 мг белка/мл геля наносят на колонку,

предварительно уравновешенную 50 мМ буферным раствором Гэпэс, pH 7,4, содержащим 5 мМ $CaCl_2$. Полученный конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс, содержащим 5 мМ $CaCl_2$ и 500 мМ хлоридом натрия, pH 7,4 и потом подвергают УФ/ДФ, используя мембрану. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

**[00747]** В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 3 выполняется следующим образом.

**[00748]** Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). 10 мг белка Пролиа растворяют в ~8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоокси-ПЭГс ММ 20 кДа (описан выше) до получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

**[00749]** Наконец, конъюгат ПЭГ-белка Пролиа очищают ионообменной хроматографией на SP-сефарозе FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ

NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПЭГ-белка Пролиа определили удельную активность > 50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описаных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

**Способ 4:**

**[00750]** Белок Пролиа ПЭГилируют путем использования линейного реагента ПЭГилирования массой 20 кДа, содержащего аминоокси группу. Примером этого типа реагента является реагент серии Sunbright ® CA от компании NOF (NOF Corp., Tokyo, Japan). Исходную концентрацию или навеску белка Хумира переносят или растворяют в буферном растворе Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 2 мг белка Пролиа/мл. Далее в течение 15 минут добавляют 5 мМ водный раствор перйодата натрия до получения конечной концентрации 100 мкМ с последующим добавлением 50 мМ водного раствора м-толуидина до достижения конечной концентрации 10 мМ в течение периода времени 30 минут. Потом добавляют реагент аминоокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до получения 20-кратного молярного избытка реагента. После коррекции pH до значения 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до получения конечной концентрации 10 мМ.

**[00751]** Конъюгат белка Пролиа очищают с помощью ионообменной хроматографии (ИОХ). Содержащие конъюгат фракции элюата концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см2, порог отсекания 10 кДа/Millipore). Заключительная стадия диафильтрации

выполняется против буферного раствора Гэпэс (50 мМ Гэпэс, 5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5).

**[00752]** Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (методики Брэдфорда и БХК) и биологической активности в соответствии с известными методами.

**Пример 45**

ПЭГилирование терапевтического белка с использованием разветвленного ПЭГ

**[00753]** ПЭГилирование терапевтического белка данного изобретения может быть распространено на разветвленный или линейный реагент ПЭГилирования, который получен из альдегида и подходящего линкера, содержащего активную аминооксигруппу.

**Пример 46**

Связывание диаминоокси линкера с нативной ПСК

**[00754]** В этом Примере описываются методики получения реагентов аминоокси-ПСК с использованием нативной ПСК (т.е. без предварительного окисления), которые потом могут применяться для химической модификации терапевтических белков.

**[00755]** a) Связывание при температуре окружающей среды

**[00756]** 52,2 мг нативной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 1,05 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0. Потом в реакционную смесь по каплям добавили 10,3 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина (линкерная молекула). Реакцию повели при инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

**[00757]** b) Связывание при повышенной температуре

**[00758]** 52,2 мг нативной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 1,05 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0. Потом в реакционную смесь по каплям добавили 10,3 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина (линкерная молекула). Реакцию повели при инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании. Потом температуру повысили до 32-37°C и реакционную смесь инкубировали в течение следующих 14 часов.

**[00759]** c) Связывание при повышенной температуре и увеличенном избытке линкера

**[00760]** 52,2 мг нативной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 1,05 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0. Потом в реакционную смесь по каплям добавили 10,3 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина (линкерная молекула). Реакцию повели при инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании. Потом в реакцию по каплям добавили 26,3 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина, температуру повысили до 32-37°C и реакционную смесь инкубировали в течение следующих 14 часов.

**[00761]** d) Очистка производных ПСК

**[00762]** После завершения инкубации реакционные смеси, полученные в пунктах a-c, очистили с помощью расширенного диализа. Для этого образцы реакционных смесей перенесли в кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (0-5-3 мл, ПОММ 3,5 кДа, рег. целлюлоза, Pierce) и диализировали против 10 мМ фосфатного буферного раствора pH 8,0 согласно следующей схемы:

**[00763]** 2 часа против 500 мл буферного раствора при комнатной температуре

**[00764]** 2 часа против 500 мл буферного раствора при комнатной температуре

**[00765]** 12 часов против 500 мл буферного раствора при 4°C

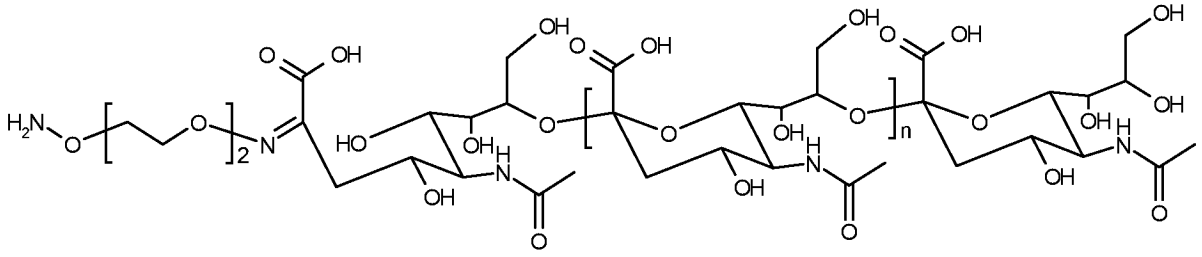
**[00766]** 1 ч против 50 мл «концентрирующего раствора для диализа Slide-A-Lyzer» при комнатной температуре для концентрирования до исходного объема образца.

**[00767]** Таким образом, получен очищенный аминоокси-ПСК реагент пригодный для использования в реакции конъюгации белков в соответствии, например, с Примерами 11, 12, 14 и 17-31, описанными выше. Подобным образом, любой из описанных в данном документе водорастворимых полимеров может быть связан с аминоокси линкером, как описано в этом Примере, и потом конъюгирован с белком, как изложено выше в Примерах.

**[00768]** Препарат исследовали аналитическими методами путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего количества

аминоокси групп (анализ с ТНБС) для определения степени модификации. Для препарата (a) была определена степень модификации (MD) равная 0,35, для препарата (b) MD=0,54 и для препарата (c)MD=0,58. Более того была измерена полидисперсность, а также содержание свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина. Для всех препаратов полидисперность была меньше чем 1,15, а содержание свободного линкера было меньше чем 0,15 мольных % концентрации ПСК.

**[00769]** Для модифицированной ПСК методом $^{13}C$-ЯМР спектроскопии на восстанавливающем конце была определена следующая структура.



**Пример 47**

Получение аминоокси-ПСК при 4°C с применением стадии хроматографической очистки

**[00770]** Во время подробного аналитического исследования реагента аминоокси-ПСК, полученного при комнатной температуре, при исследованиях ЯМР (см., например, предварительную заявку США № 61/647814, включенную в данный документ в полном объеме посредством ссылки) выявлено, что дериватизация окисленной ПСК диаминоокси линкером состоит из двух отличных реакций: быстрой реакции альдегидной группы на невосстанавливающем конце ПСК и медленной реакции альдегидной группы (в форме гемикеталя) на восстанавливающем конце ПСК. Последняя реакция может рассматриваться как нежелательная побочная реакция, которую необходимо избегать при получении реагента.

**[00771]** Поэтому процесс приготовления реагента аминоокси-ПСК оптимизировали как описано в данном Примере. Если процесс проводят при комнатной температуре, то в значительной степени может реагировать только восстанавливающий конец. Поэтому процесс скорректировали и провели при 2-8°C. При проведении всего

процесса (химической реакции и очистки реагента ПСК методом ИОХ) при 2-8°С, протекание побочной реакции на восстанавливающем конце ПСК было значительно снижено. Следовательно, изменение этого процесса приводит к получению реагента лучшего качества.

**[00772]** Методика

**[00773]** 1290 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной из Serum Institute of India (Pune, India), растворили в 25 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (Буферный раствор А). Потом к реакционной смеси добавили 209 мг 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и инкубировали в течение 1 ч при 2-8°С при осторожном помешивании в темноте.

**[00774]** После инкубации смесь подвергли стадии неспецифической анионообменной хроматографии с применением геля для хроматографии Fractogel EMD DEAE 650-M (размер колонки: XK26/135), которую провели в холодной комнате при температуре 2-8°С. Реакционную смесь разбавили 110 мл предварительно охлажденного Буферного раствора А и нанесли на ДЭАЭ-колонку, предварительно уравновешенную Буферным раствором А при скорости потока 1 см/мин. Потом колонку промыли 20 ОК Буферного раствора В (20 мМ Гэпэс, pH 6,0) для удаления свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина при скорости потока 2 см/мин. Реагент аминоокси-ПСК потом элюировали со ступенчатым градиентом, содержащим 67% Буферного раствора В и 43% Буферного раствора С (20 мМ Гэпэс, 1М NaCl, pH 7,5). Элюат сконцентрировали с помощью УФ/ДФ с применением мембраны с порогом 5 кДа, сделанной из полиэфирсульфона (50 см2, Millipore). Препарат исследовали аналитическими методами путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего количества аминоокси групп (анализ с ТНБС) для определения степени модификации. В конечном препарате концентрация ПСК составила 46,0 мг/мл, а степень модификации - 83,5%. Кроме того, определили значение полидисперсности равное 1,131. В дополнение была измерена концентрация свободного 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина равная 0,22 мкг/мл (0,07 мольных % ПСК).

**[00775]** Таким образом, получен очищенный аминоокси-ПСК реагент пригодный для использования в реакции конъюгации в соответствии с Примерами 11, 12, 14 и 17-31, описанными выше.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,**
**ПРЕДЛОЖЕННАЯ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированную полисиаловую кислоту (PSA), конъюгированную с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

a) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH от 5,0 до 8,0, при этом концентрация терапевтического белка находится в диапазоне от 0,3 мг/мл до 3,0 мг/мл;

b) вторую стадию, включающую осуществление контакта терапевтического белка с активированной PSA, взятой в избыточной концентрации, при этом избыточная концентрация находится в диапазоне от 1-молярного избытка до 300-молярного избытка, в условиях, включающих период времени от 0,5 часа до 24 часов; температуру от 2°C до 37°C; присутствие и отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

c) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации от 1 мМ до 50 мМ в условиях, включающих период времени от 0,1 минуты до 30 минут; температуру от 2°C до 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания.

d) четвертую стадию, включающую добавление окисляющего агента к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации от 50 мкМ до 1000 мкМ, где окисляющий агент выбран из группы, состоящей из: перйодата натрия ($NaIO_4$), тетраацетата свинца ($Pb(OAc)_4$) и перрутената калия (KRuO4);

e) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированной PSA, м-толуидином и окисляющим агентом в условиях, которые позволяют конъюгировать активированную PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период

времени от 0,5 часа до 24 часов, температура от 2 до 37 ° С; в присутствии или отсутствии света и наличии или отсутствии перемешивания, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминооксигруппой на PSA, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

f) шестую стадию, где конъюгирование PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением останавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из: L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, метабисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; причем останавливающий агент добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента от 1 мМ до 100 мМ, в условиях, включающих период времени от 5 минут до 120 минут; температуру от 2°С до 37°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

где указанный активированный PSA содержит PSA и активную аминооксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают период времени от 1 минуты до 24 часов; температуру от 2 до 8° С; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется PSA, содержащая активную аминооксигруппу; и

2) очистку активированной PSA, содержащей активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения, при температуре от 2 до 8 ° С.

2. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированную полисиаловую кислоту (PSA), конъюгированную с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

a) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH 6,0, при этом исходная концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

b) вторую стадию, включающую осуществление контакта терапевтического белка с активированной PSA, взятой в избыточной концентрации, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих период времени 15 минут и температуру 22°C; присутствие и отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

c) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих период времени 15 минут; температуру 22°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания.

d) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента перйодата натрия ($NaIO_4$) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ;

e) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированной PSA, м-толуидином и $NaIO_4$ в условиях, которые позволяют конъюгировать активированную PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени 2 часа, температуру 22 ° C; в присутствии или отсутствии света и наличии или отсутствии перемешивания, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется

между окисленной углеводной составляющей и активной аминооксигруппой на PSA, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

f) шестую стадию, где конъюгирование PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 минут; температуру от 22°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

где указанный активированный PSA содержит PSA и активную аминооксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают период времени от 1 минуты до 24 часов; температуру от 2 до 8° С; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется PSA, содержащая активную аминооксигруппу; и

2) очистку активированной PSA, содержащей активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения, при температуре от 2 до 8 ° С.

3. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированную полисиаловую кислоту (PSA), конъюгированную с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH от

5,0 до 8,0, при этом концентрация терапевтического белка находится в диапазоне от 0,3 мг/мл до 3,0 мг/мл;

b) вторую стадию, включающую осуществление контакта терапевтического белка с активированной PSA, взятой в избыточной концентрации, при этом избыточная концентрация находится в диапазоне от 1-молярного избытка до 300-молярного избытка, в условиях, включающих период времени от 0,5 часа до 24 часов; температуру от 2°C до 37°C; присутствие и отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

c) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации от 1 мМ до 50 мМ в условиях, включающих период времени от 0,1 минуты до 30 минут; температуру от 2°C до 37°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания.

d) четвертую стадию, включающую добавление окисляющего агента к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации от 50 мкМ до 1000 мкМ, где окисляющий агент выбран из группы, состоящей из: перйодата натрия ($NaIO_4$), тетраацетата свинца ($Pb(OAc)_4$) и перрутената калия (KRuO4);

e) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированной PSA, м-толуидином и окисляющим агентом в условиях, которые позволяют конъюгировать активированную PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени от 0,5 часа до 24 часов, температура от 2 до 37 ° C; в присутствии или отсутствии света и наличии или отсутствии перемешивания, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминооксигруппой на PSA, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

f) шестую стадию, где конъюгирование PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими

терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением останавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из: L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, метабисульфита натрия ($Na_2S_2O_5$), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; причем останавливающий агент добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента от 1 мМ до 100 мМ, в условиях, включающих период времени от 5 минут до 120 минут; температуру от 2°С до 37°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

где указанный активированный PSA содержит PSA и активную аминооксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при температуре 22°С в течение 2 часов; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется PSA, содержащая активную аминооксигруппу; и

2) очистку активированной PSA, содержащей активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения.

4. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированную полисиаловую кислоту (PSA), конъюгированную с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH 6,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

b) вторую стадию, включающую осуществление контакта терапевтического белка с активированной PSA, взятой в избыточной концентрации, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих период времени 15 минут; температуру 22°C; присутствие и отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

c) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих период времени 15 минут; температуру 22°C; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания.

d) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента перйодата натрия ($NaIO_4$) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ,;

e) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированной PSA, м-толуидином и $NaIO_4$ в условиях, которые позволяют конъюгировать активированную PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени от 2 часа, температуру 22° C; в присутствии или отсутствии света и наличии или отсутствии перемешивания, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминооксигруппой на PSA, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

f) шестую стадию, где конъюгирование PSA с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 минут;

температуру от 22°С; присутствие или отсутствие света и наличие или отсутствие перемешивания;

где указанный активированный PSA содержит PSA и активную аминооксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при температуре 22° С в течение 2 часов; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется PSA, содержащая активную аминооксигруппу; и

2) очистку активированной PSA, содержащей активную аминооксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения.

5. Способ по любому из п.п.1-4, где стадии от a) до f) проводят в одном сосуде.

6. Способ по любому из п.п.1-5, где терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из: Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (ТФ), протеазы ADAMTS 13, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЭПО, интерферона-альфа (ИФН-альфа), консенсусного интерферона, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбопоэтина (ТПО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3),

ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина A, активина B, активина C, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора IA костного морфогенетического белка, рецептора IB костного морфогенетического белка, рецептора II костного морфогенетического белка, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, белка крипто, криптического белка, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 1 нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2α нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2β нейтрофилов, эндотелиального клеточного фактора роста β, эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, аттрактанта нейтрофилов эпителиального происхождения, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21,

кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора α1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептора α2 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, связанного с ростом белка, связанного с ростом белка α, связанного с ростом белка β, связанного с ростом белка γ, связывающего гепарин эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, фактора роста, полученного из гепатомы, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, ингибирующего лейкемию фактора, рецептора α ингибирующего лейкемию фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропоэтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина M (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, цепи A тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, цепи B тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора α тромбоцитарного фактора роста, рецептора β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующего фактора роста предшественников B-клеток, фактора стволовых клеток (ФСК), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста α, трансформирующего фактора роста β, трансформирующего фактора роста β1, трансформирующего фактора роста β1.2, трансформирующего фактора роста β2, трансформирующего фактора роста β3, трансформирующего фактора роста β5, латентного трансформирующего фактора роста β1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста β, белка II, связывающего трансформирующий фактор роста β, белка III, связывающего трансформирующий фактор роста β, тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазмогена урокиназного типа, активирующего

белка фосфолипазы (PUP), инсулина, лектина рицина, пролактина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреостимулирующего гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α-галактозидазы, β-галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, Хумиры (адалимумаба), Пролиа (деносумаба), Энбрела (этанерсепта) и белка из Табл. 1 или их биологически активного фрагмента.

7. Способ по п.1 или 2, где раствор, содержащий окисленную PSA и активированный аминоокси-линкер, инкубируют при 4 ° С в течение 1 часа в отсутствие света при перемешивании.

8. Способ по п.7, в котором активированную PSA, содержащую активную аминооксигруппу, очищают с помощью анионообменной хроматографии при температуре 4°С.

9. Способ по п.8, в котором PSA окисляют путем инкубирования с $NaIO_4$.

10. Способ по п.3 или 4, в котором активированную PSA получают способом, включающим дополнительную стадию добавления дополнительного количества активированного аминоокси-линкера, содержащего активную аминооксигруппу, непосредственно перед повышением температуры.

11. Способ по любому из пп.3, 4 и 10, в котором активированную PSA, содержащую активную аминооксигруппу, очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) и хроматографии при температура 22°С.

12. Способ по п.11, в котором активированныую PSA, содержащую активную аминооксигруппу, дополнительно очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтации/диафильтрации (UF/DF) или хроматографии при 4°С.

13. Способ по п.6, в котором PSA состоит из 10-300 единиц сиаловой кислоты.

14. Способ по п.6, где терапевтический белок представляет собой FIX или его биологически активный фрагмент.

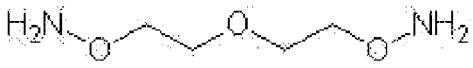
15. Способ по п.6, в котором терапевтический белок представляет собой FVIIa или его биологически активный фрагмент.

16. Способ по п.6, где терапевтическим белком является FVIII или его биологически активный фрагмент.

17. Способ по п.1 или 3, в котором окислителем является периодат натрия ($NaIO_4$).

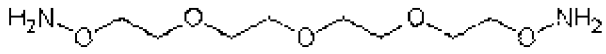
18. Способ по п.1 или 2, где актививрованный аминоокси-линкер выбирают из группы, состоящий из:

a) 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:



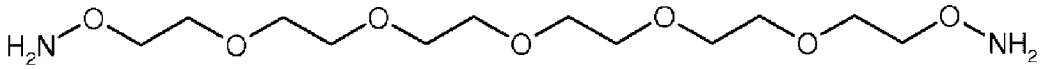
,

b) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминовый линкер формулы:



и

c) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминовый линкер формулы:



где PSA окисляют путем инкубирования с окислителем с образованием концевой альдегидной группы на невосстанавливающемся конце PSA.

19. Способ по п.18, в котором аминоокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиамин.

20. Способ по п.1 или 3, в котором м-толуидин присутствует в реакции конъюгирования в концентрации 10 мМ.

21. Способ по любому из пп.1-6, дополнительно включающий стадию очистки модифицированного терапевтического белка.

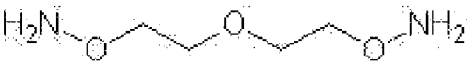
22. Способ по п.21, в котором модифицированный терапевтический белок очищают способом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.

23. Способ по п.21, в котором модифицированный терапевтический белок очищают с помощью хроматографии; где используется антихаотропная соль на стадии загрузки хроматографического носителя и на стадии отмывания хроматографического носителя; способ содержит одну или несколько стадий отмывания, на которых направление потока выбрано в восходящем направлении и при этом скорость потока находится от 0,2 см/мин и 6,7 см/мин; и одну и более стадий элюирования, на которых направление потока выбрано в нисходящем направлении и при этом скорость потока равна от 0,2 см/мин до 6,7 см/мин; дополнительно включающий концентрирование модифицированного терапевтического белка ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF).

24. Способ по п.1 или 2, в котором активированную PSA, содержащую PSA и активную аминооксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего окисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают период времени 1 час; температуру 4°C; при отсутствии света и при перемешивании; тем самым образуя PSA, содержащую активную аминооксигруппу; и

б) очистку активированной PSA, содержащей активную аминооксигруппу, с помощью анионообменной хроматографии, при температуре 4°C; где активированный аминоокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:

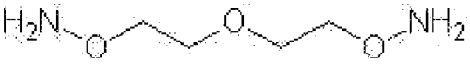


тем самым образуя оксимную связь между PSA и аминоокси-линкером.

25. Способ по п.3 или 4, в котором аактивированя PSA, содержащая PSA и активную аминооксигруппу, получают способом, включающим:

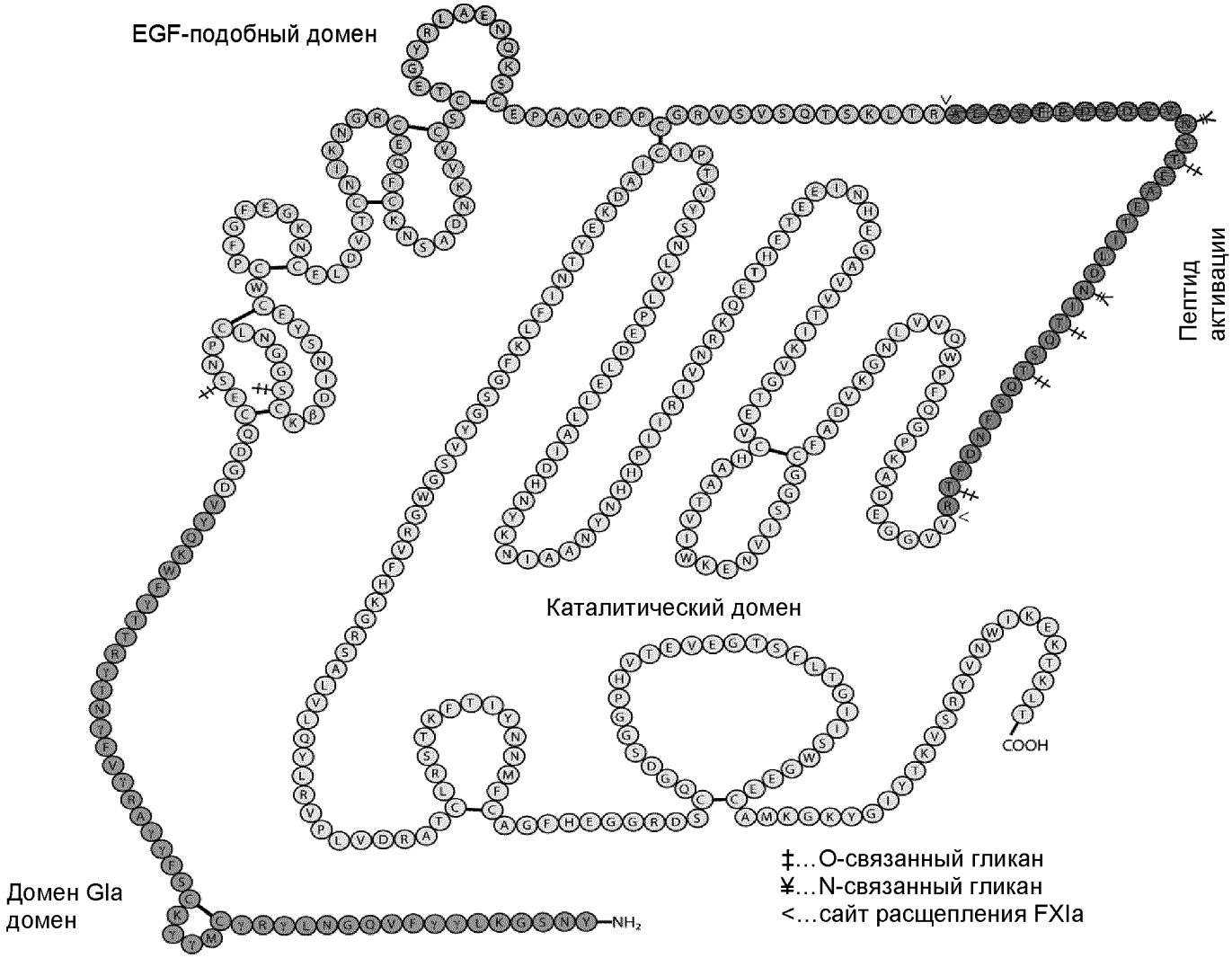
а) инкубирование раствора, содержащего неокисленную PSA, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминоокси-группу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между неокисленной PSA и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при 22°C в течение 2 ч при отсутствии света при перемешивании; где способ дополнительно включает стадию, на которой повышают температуру раствора до температуры от 32 до 37 ° C и инкубируют в течение дополнительных 12-24 часов; тем самым образуя PSA, содержащую активную аминооксигруппу; и

б) очистка PSA, содержащей активную аминооксигруппу, диализом при температуре 22°C; где активированный аминоокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:

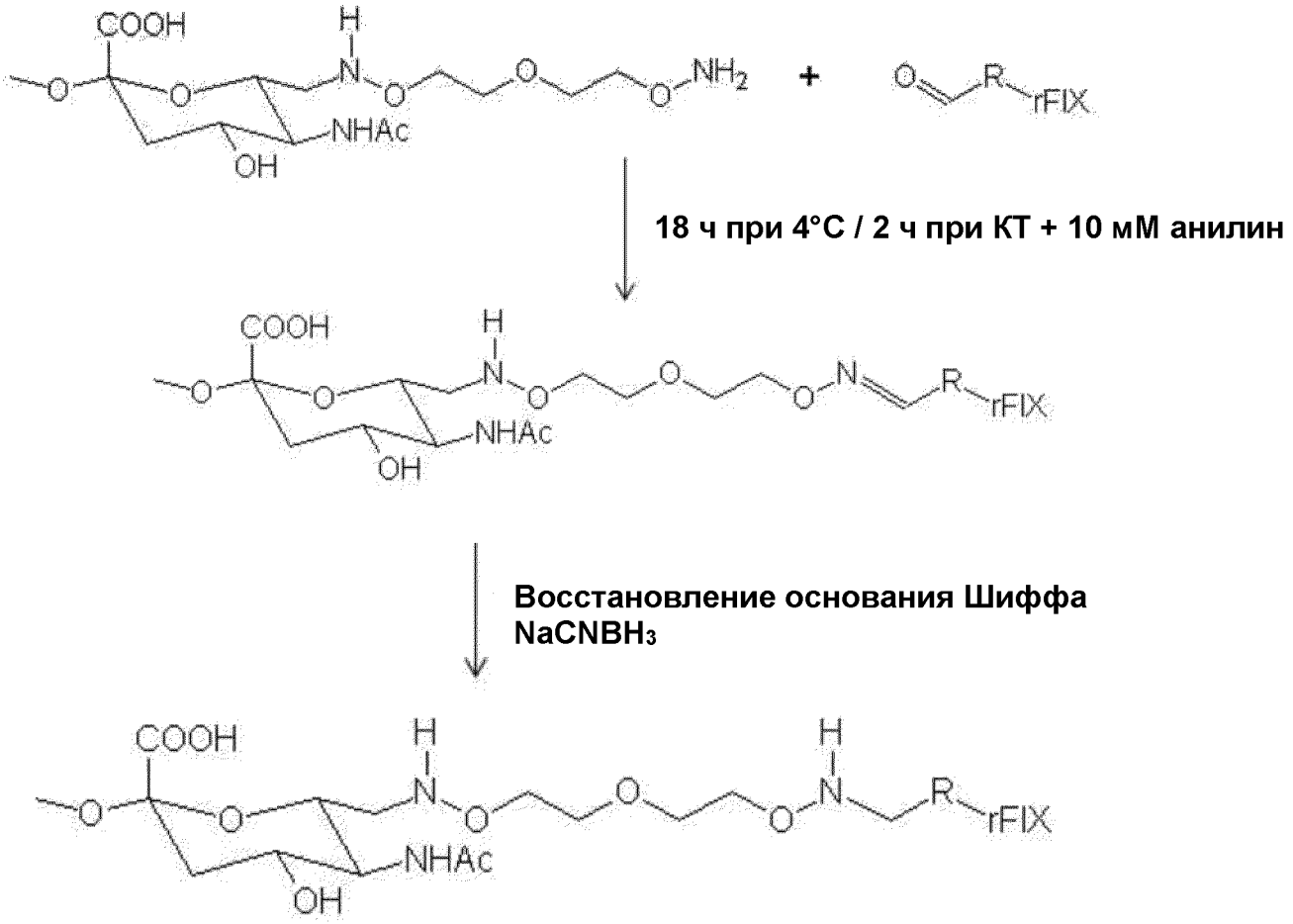


тем самым образуя оксимную связь между не окисленным PSA и аминоокси-линкером.

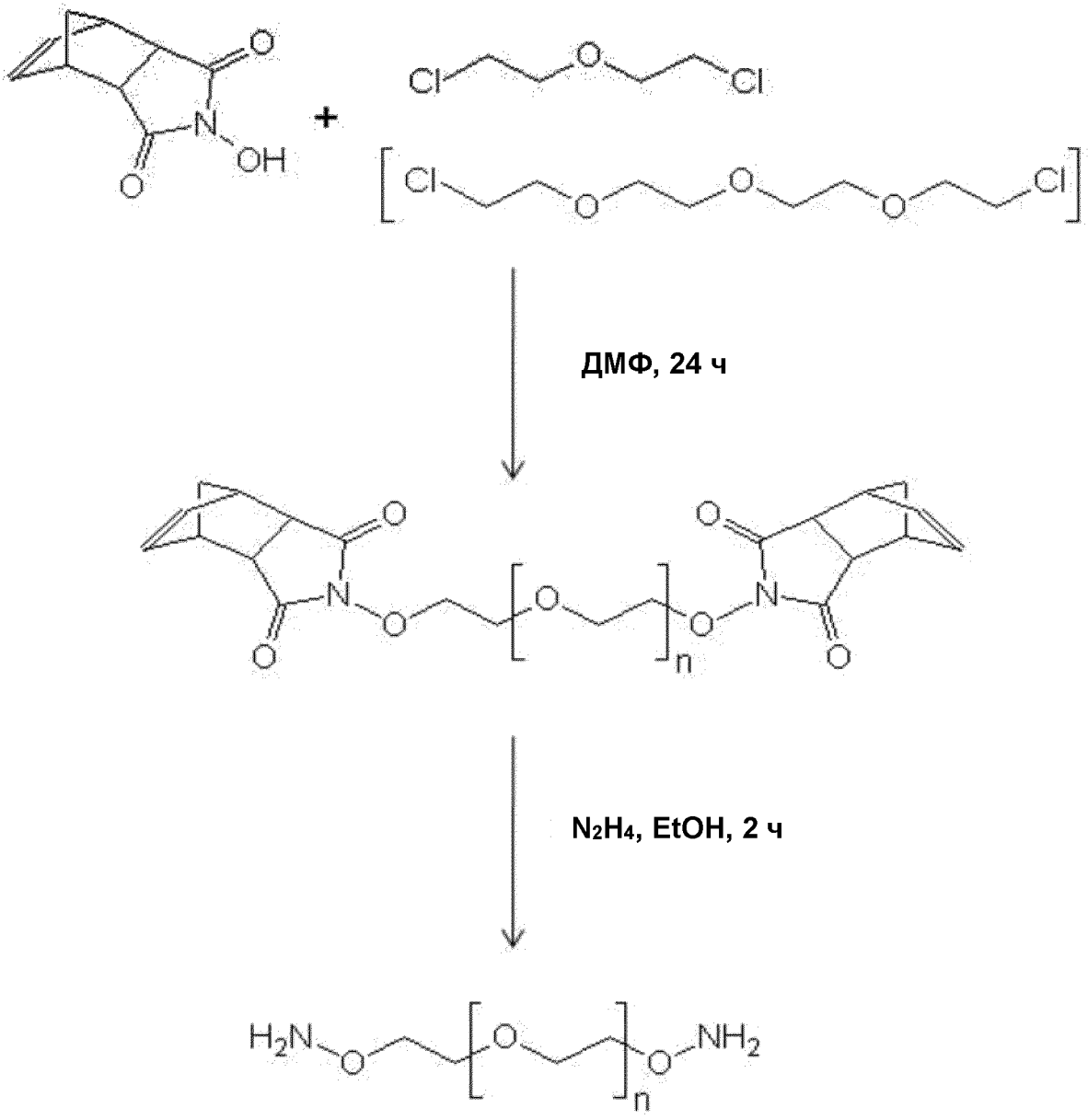
По доверенности


EGF-подобный домен
Пептид активации
Каталитический домен
COOH
Домен Gla домен
NH2
‡…O-связанный гликан
¥…N-связанный гликан
<…сайт расщепления FXIa

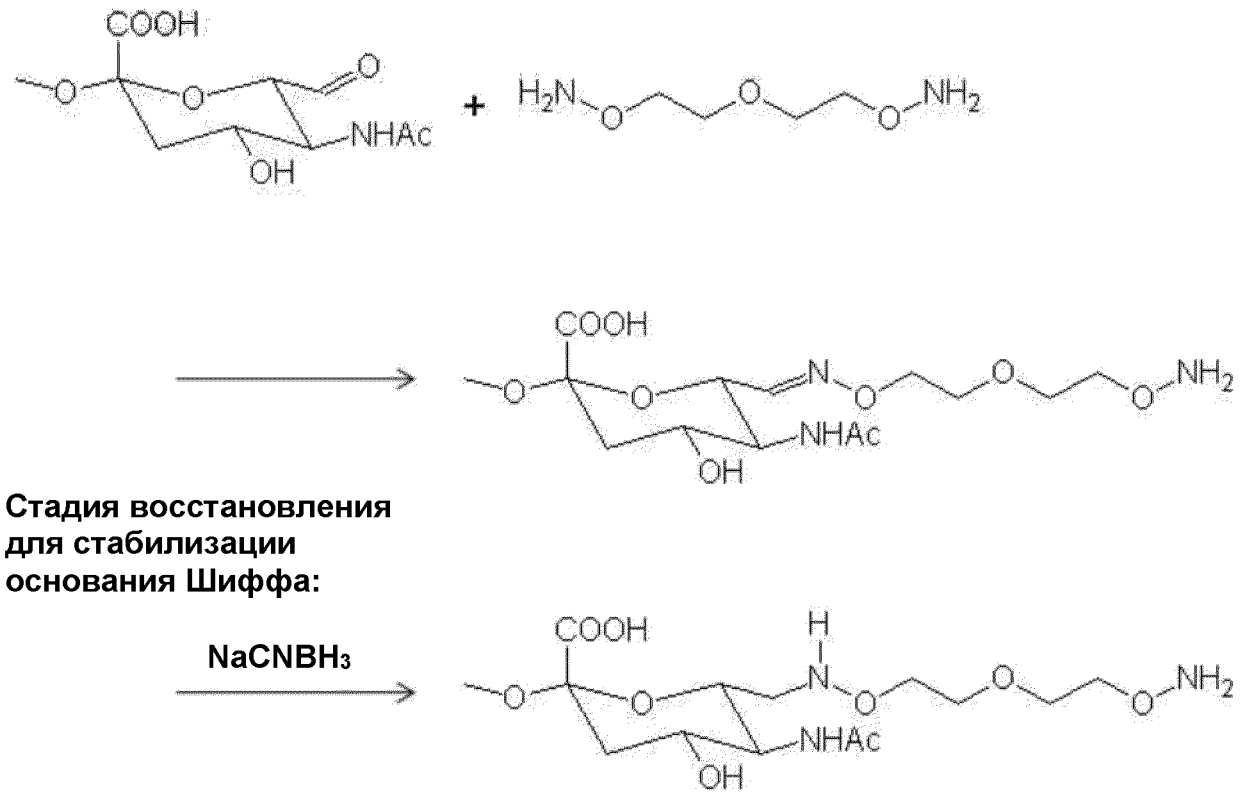
**ФИГУРА 1**


COOH
H
N
O
NH2
NHAc
OH
+
O
R
rFIX
18 ч при 4°C / 2 ч при КТ + 10 мМ анилин
N
Восстановление основания Шиффа
NaCNBH3

**ФИГУРА 2**

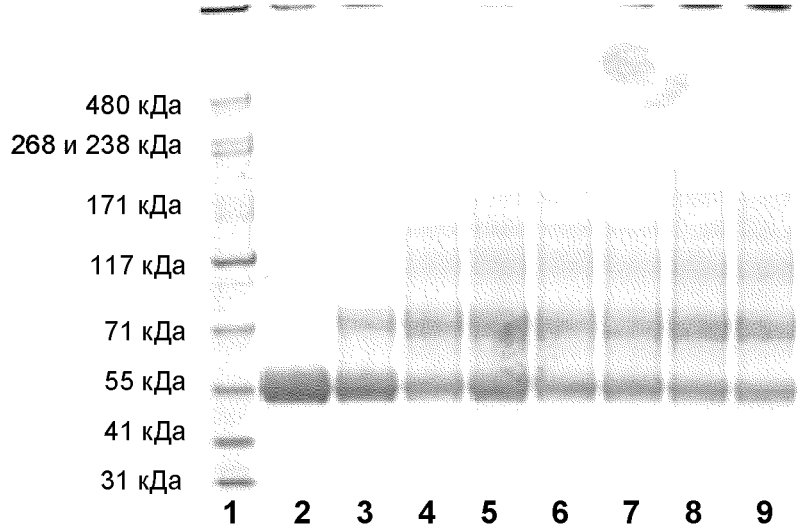



ФИГУРА 3


COOH
O
O
O
NHAc
OH
+
H2N
O
O
O
NH2
COOH
O
O
N
O
O
O
NHAc
OH
NH2
Стадия восстановления для стабилизации основания Шиффа:
NaCNBH3
COOH
H
O
O
N
O
O
O
NHAc
OH
NH2

**ФИГУРА 4**

A




3-8% гель NuPAGE Novex, Трис-ацетат, окрашивание Кумасси

Дорожка 1: Стандарт ММ HiMark

Дорожка 2: Стандарт rFIX

Дорожка 3: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 0 мМ катализатор, 5Х ПСК

Дорожка 4: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 2,5 мМ анилин, 5Х ПСК

Дорожка 5: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 5 мМ анилин, 5Х ПСК

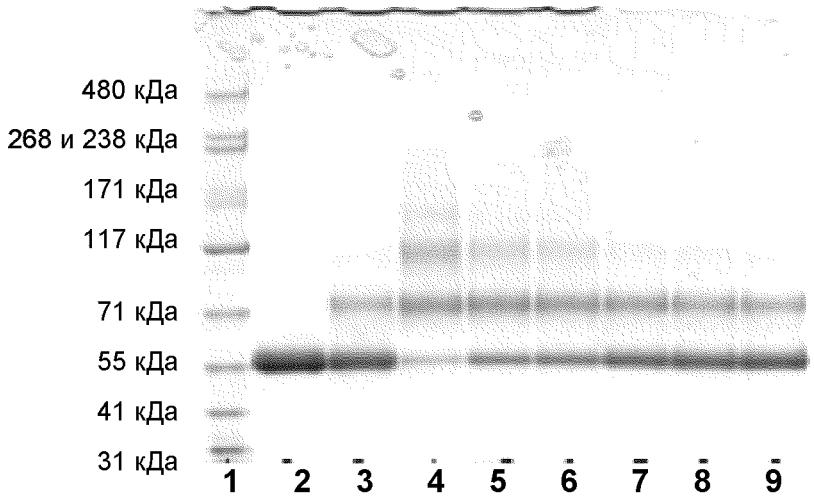
Дорожка 6: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ анилин, 5Х ПСК

Дорожка 7: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 2,5 мМ м-толуидин, 5Х ПСК

Дорожка 8: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 5 мМ м-толуидин, 5Х ПСК

Дорожка 9: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ м-толуидин, 5Х ПСК

B




3-8% гель NuPAGE Novex, Трис-ацетат, окрашивание Кумасси

Дорожка 1: Стандарт ММ HiMark

Дорожка 2: Стандарт rFIX

Дорожка 3: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 0 мМ катализатор, 5Х ПСК

Дорожка 4: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ анилин, 5Х ПСК

Дорожка 5: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ о-аминобензойная кислота, 5Х ПСК

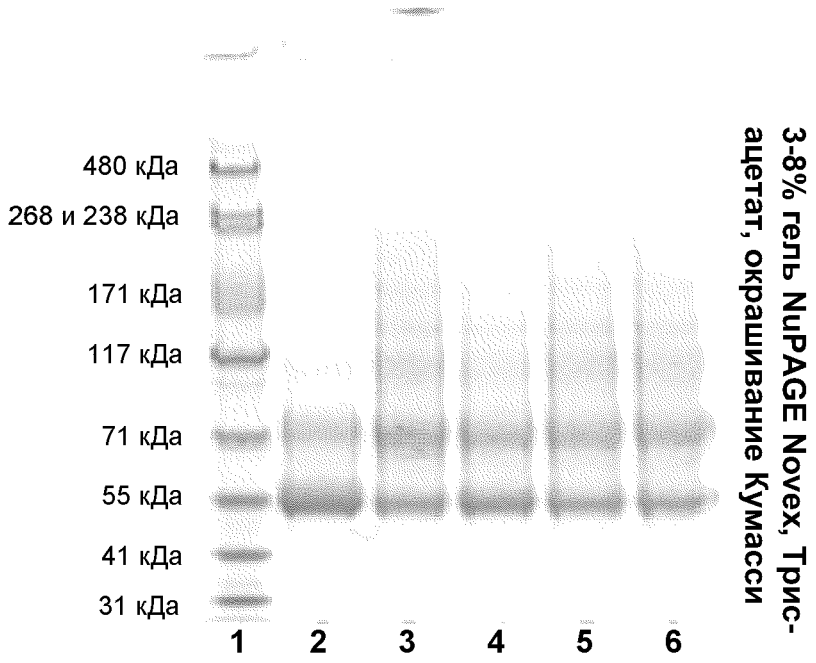
Дорожка 6: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ м-аминобензойная кислота, 5Х ПСК

Дорожка 7: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ п-аминобензойная кислота, 5Х ПСК

Дорожка 8: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ о-аминобензойная кислота, 5Х ПСК

Дорожка 9: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ сульфаниловая кислота, 5Х ПСК

**ФИГУРА 5**




Дорожка 1: Стандарт ММ HiMark

Дорожка 2: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 0 мМ катализатор, 5Х ПСК

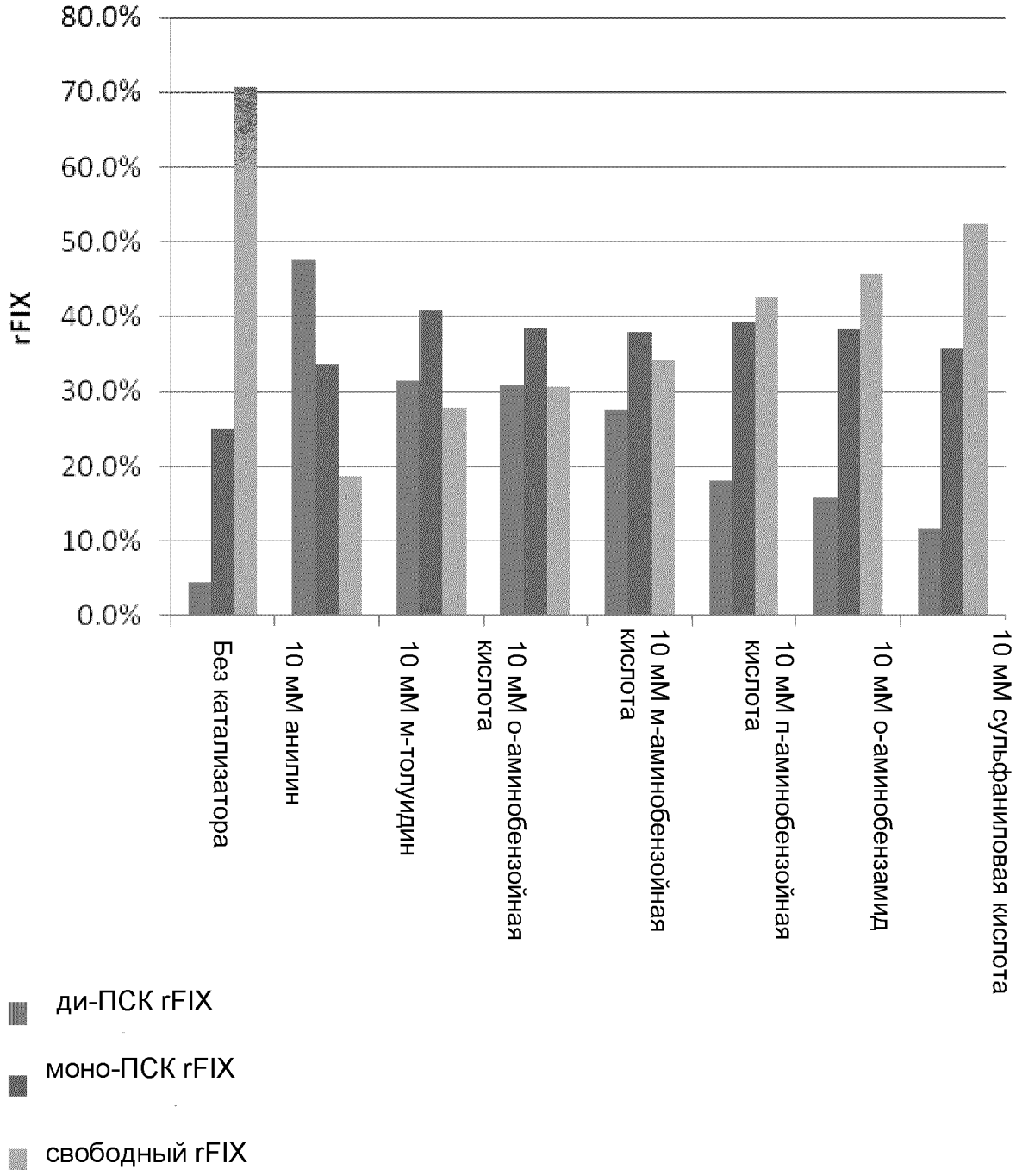
Дорожка 3: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ анилин, 5Х ПСК

Дорожка 4: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ о-анизидин, 5Х ПСК

Дорожка 5: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ м- анизидин, 5Х ПСК

Дорожка 6: rFIX + 100 мкМ NaIO4, 10 мМ м-толуидин, 5Х ПСК

**ФИГУРА 5**


80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
rFIX
Без катализатора
10 мМ анилин
10 мМ м-толуидин
10 мМ о-аминобензойная кислота
10 мМ м-аминобензойная кислота
10 мМ п-аминобензойная кислота
10 мМ о-аминобензамид
10 мМ сульфаниловая кислота
ди-ПСК rFIX
моно-ПСК rFIX
свободный rFIX

**ФИГУРА 6**

# ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202090685**

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

***C07H 3/02*** *(2006.01)*
***A61K 38/17*** *(2006.01)*
***A61K 47/50*** *(2006.01)*
***A61K 47/55*** *(2006.01)*
***A61K 47/62*** *(2006.01)*
***A61K 47/64*** *(2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07H 3/02, A61K 38/17, 38/18, 38/36, 47/50, 47/55, 47/62, 47/64

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

| Категория* | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей | Относится к пункту № |
|---|---|---|
| X | WO 2012/016131 A1 (BAXTER INTERNATIONAL INC. и др.) 02.02.2012, параграфы [0010], [0011], [0015]-[0037], [0042]-[0050], [00161]-[00164], примеры, формула | 1-25 |
| A | US 2011/0027350 A1 (LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED и др.) 03.02.2011, параграфы [0014], [0026]-[0028], [0067], примеры, формула | 1-25 |
| A | WO 2008/025856 A2 (NOVO NORDISK HEALTH CARE AG и др.) 06.03.2008, с. 6, строки 12-32, с. 7, строки 3-19, формула | 1-25 |
| A | RU 2391354 C1 (УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА РАН, РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ, ОТ ИМЕНИ КОТОРОЙ ВЫСТУПАЕТ ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И ИННОВАЦИЯМ) 10.06.2010, примеры | 1-25 |
| A | THYGESEN Mikkel B. et al. Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by Anilines. The Journal of Organic Chemistry, 2010, T. 75, Vol. 5, pp. 1752–1755, <doi: 10.1021/jo902425v> | 1-25 |

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **02/10/2020**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Д.Ю. Рогожин