

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043751**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.20**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/64** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201991871**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.02.08**

---

**(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ РЕЛАКСИНА, СОДЕРЖАЩИЕ  
ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЙ ЭНХАНСЕР, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 62/456,161; 62/627,411

**(32)** 2017.02.08; 2018.02.07

**(33)** US

**(43)** 2020.01.28

**(86)** PCT/US2018/017436

**(87)** WO 2018/148419 2018.08.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Дубовчик Джин М., Гудмундссон  
Олафур С., Хань Сяоцзюнь,  
Лоуренс Р. Майкл, Липовсек Даса,  
Мэдсен Корт С., Мапелли Клаудио,  
Морин Пол Е., Маерс Майкл С. (US)**

**(74)** Представитель:  
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Глухарёва А.О. (RU)**

**(56)** US-A1-2013237481  
US-A1-2012046229

XIAOYING CHEN ET AL. "Fusion protein linkers: Property, design and functionality", *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 1 September 2012 (2012-09-01), XP055062583, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039 Items 5.3 and 5.5

RAKTIM KUMAR GHOSH ET AL. "Serelaxin in acute heart failure: Most recent update on clinical and preclinical evidence", *CARDIOVASCULAR THERAPEUTICS*, vol. 35, no. 1, 13 December 2016, (2016-12-13), pages 55-63, XP055464311, ISSN: 1755-5914, DOI: 10.1111/1755-5922.12231, the whole document

HOSSAIN M.A. ET AL. "The Minimal Active Structure of Human Relaxin-2", *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 286, no. 43, 28 October 2011, (2011-10-28), pages 37555-37565, XP055060937, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.282194, abstract

---

**(57)** Изобретение в целом относится к модифицированным полипептидам релаксина, таким как модифицированные полипептиды релаксина 2 человека, содержащие не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая связана с фармакокинетическим энхансером, и терапевтическому применению таких полипептидов, например, для лечения сердечно-сосудистых состояний (таких как сердечная недостаточность) и/или состояний, связанных с фиброзом.

---

**B1**

**043751**

**043751 B1**

### **Раскрытие родственных заявок**

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США 62/627411, поданной 7 февраля 2018 года, и предварительной заявки США 62/456161, поданной 8 февраля 2017 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **Раскрытие последовательностей**

Данная заявка включает в качестве части ее раскрытия перечень биологических последовательностей, содержащихся в файле под названием "46561o2413.txt", размером 150746 байт, созданном 8 февраля 2018 года, который включен в настоящий документ путем ссылки во всей своей полноте.

### **Предпосылки создания изобретения**

Изобретение в целом относится к модифицированным полипептидам релаксина, таким как модифицированные полипептиды релаксина 2 человека, содержащие фармакокинетический энхансер, и терапевтическому применению таких полипептидов, например, для лечения сердечно-сосудистых состояний (таких как сердечная недостаточность) и/или состояний, связанных с фиброзом. В иллюстративных вариантах осуществления фармакокинетический энхансер связан с не кодируемой в природных условиях аминокислотой, которая может быть рибосомально встроена в полипептид релаксина.

Сердечная недостаточность (HF) представляет собой огромное бремя для современной системы здравоохранения с предполагаемой распространенностью в США 5,8 миллионов и более 23 миллионов человек во всем мире (Roger et al., 2012. *Circulation*, 125(1): e2-e220). Симптомы сердечной недостаточности являются результатом неадекватного сердечного выброса и могут быть изнурительными в зависимости от стадии прогрессирования заболевания. Основные симптомы и признаки сердечной недостаточности включают: 1) одышку (затрудненное дыхание), возникающую в результате отека легких из-за неэффективного прямого оттока из левого желудочка и повышенного давления в легочном капиллярном русле; 2) отек нижних конечностей возникает, когда правый желудочек не способен приспособиться к системному венозному возврату; и 3) утомляемость из-за неспособности сердечной недостаточности поддерживать достаточный сердечный выброс для удовлетворения метаболических потребностей организма (Kemp & Conte, 2012. *Cardiovascular Pathology*, 21:365-371).

Многие сопутствующие заболевания, факторы риска и патологические изменения могут в конечном итоге привести к сердечной недостаточности (Jessup & Brozena, 2003. *N Engl J Med*, 348(20): 2007-2018). Повреждающие события, которые, как считается, связаны с патофизиологией сердечной недостаточности, варьируются от очень острого, такого как инфаркт миокарда, до более хронического повреждения, такого как пожизненная гипертензия. Уровень смертности остается высоким: ~ 50% людей с СН умирают в течение 5 лет после постановки диагноза (Roger et al., 2012. *Circulation*, 125(1): e2-e220; Roger et al., 2004. *Jama*, 292(3): 344-50). Сердечная недостаточность очевидным образом представляет значительную неудовлетворенную медицинскую потребность.

Человеческий гормон релаксин 2 (также называемый релаксин H2) представляет собой 6-кДа пептид, состоящий из 53 аминокислот, который, как известно, отвечает за ремоделирование репродуктивного тракта до родов, тем самым облегчая процесс рождения. Несмотря на то, что преимущественно релаксин является гормоном беременности, он был обнаружен у не беременных женщин, а также у мужчин. Человеческий релаксин является членом семейства инсулиновых пептидов, которое включает инсулин, ряд инсулиноподобных пептидов (INSL3-6) и инсулиноподобные факторы роста (IGFI и IGFIИ) (Van Der Westhuizen et al., 2007. *Curr Drug Targets*, 8(1): 91-104). Все эти гетеродимерные пептиды структурно связаны с каждой из двух пептидных цепей (А и В), которые соединены двумя дисульфидными связями, и с А-цепью, содержащей одну внутримолекулярную дисульфидную связь. Рецептор релаксина 2 (H2), называемый пептидным рецептором семейства релаксина 1 (Relaxin Family Peptide Receptor 1 (RXFP1)), является консервативным для мыши и человека с 85% идентичностью аминокислот и по существу повсеместно экспрессируется у людей и у других видов (Halls et al., 2007. *Br J Pharmacol*, 150(6): 677-91).

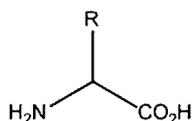
Во время человеческой беременности для удовлетворения потребностей в питательных веществах, налагаемых плодом, женский организм подвергается значительному ~30% снижению системного сосудистого сопротивления (SVR) и сопутствующему ~50% увеличению сердечного выброса (Jeyabalan, 2010: *Renal and Electrolyte Disorders*. Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Clapp and Capeless, 1997. *Am J Cardiol*, 80(11): 1469-73). Дополнительные сосудистые адаптации включают ~30% увеличение общей податливости сосудистой стенки, что является важным для поддержания эффективного желудочково-артериального сопряжения, а также ~50% увеличения как почечного кровотока (RBF), так и скорости клубочковой фильтрации (GFR), важной для выведения конечных продуктов обмена веществ (Jeyabalan, 2010: *Renal and Electrolyte Disorders*. Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Poppas et al., 1997. *Circulation*, 95(10): p. 2407-15). Доклинические исследования на грызунах, а также клинические исследования, проведенные на различных пациентах, свидетельствуют о том, что релаксин принимает участие, по меньшей мере в некоторой степени, в опосредовании этих адаптивных физиологических изменений (Conrad, 2011. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(2), R267-275; Teichman et al., 2009. *Heart Fail Rev*, 14(4), 321-329.). Многие из этих адаптивных реакций, вероятно, будут полезны для пациентов с HF, так как чрезмерный фиброз, слабая податливость сосудистой стенки и слабая почечная функция, все являются характеристиками, общими для пациентов с сердечной недостаточностью (Mohammed et al., 2015).

Circulation, 131(6), 550-559), (Wohlfahrt et al., 2015. Eur J Heart Fail, 77(1), 27-34; Dammon et al., 2011. Prog Cardiovasc Dis, 54(2), 144-153). Поскольку, согласно оценкам, 30% пациентов с HF страдают почечной недостаточностью от умеренной до тяжелой (Triposkiadis and Skoularigis, 2012. Curr Heart Fail Rep, (4):354-62), агент, такой как релаксин, благодаря улучшению сосудистого потока и обработки электролитом, может быть особенно полезным для пациентов с HF.

Пептид релаксина имеет короткий фармакокинетический период полувыведения: Серелаксин (Sere-laxin), рекомбинантный человеческий пептид релаксина, который был разработан для лечения сердечной недостаточности, имеет короткий фармакокинетический период полувыведения в первой фазе, составляющий 5-15 минут, и требуется 48-часовая непрерывная внутривенная инфузия для терапевтической пользы (REASANZ (serelaxin) Briefing Document Prepared by Novartis for FDA Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting. February 26, 2014). Для хронических заболеваний, таких как сердечная недостаточность, молекула релаксина с улучшенным фармакокинетическим профилем обеспечивает возможность альтернативных путей введения лекарственного средства, помимо непрерывной внутривенной инфузии, которая, вероятно, будет более подходящей в качестве терапевтического средства для пациентов, страдающих хроническими заболеваниями.

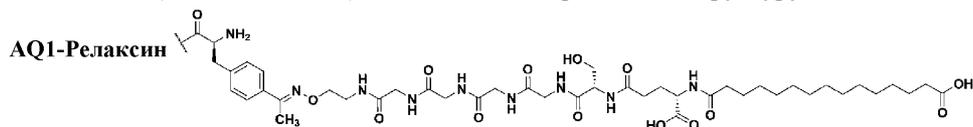
#### Краткое описание изобретения

В настоящем документе обеспечены модифицированные полипептиды релаксина, содержащие не кодируемую в природных условиях аминокислоту, при этом (а) полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в положении, выбранном из группы, состоящей из: остатка 1 А-цепи, остатка 2 А-цепи, остатка 5 А-цепи, остатка 13 А-цепи, остатка 18 А-цепи, остатка 5 В-цепи, остатка 7 В-цепи и остатка 25 В-цепи, и необязательно имеющий до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок и/или делеций в указанной А-цепи релаксина и/или указанной В-цепи релаксина; (b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота имеет следующую структуру:



где R группа представляет собой любой заместитель, отличный от боковой цепи, обнаруженной в аланине, аргинине, аспарагине, аспарагиновой кислоте, цистеине, глутамине, глутаминовой кислоте, глицине, гистидине, изолейцине, лейцине, лизине, метионине, фенилаланине, пролине, серине, треонине, триптофане, тирозине или валине; и (с) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с фармакокинетическим энхансером, содержащим пептидный компонент из 2-30 аминокислот и фрагмент, увеличивающий период полувыведения.

Также, в настоящем документе представлен модифицированный полипептид релаксина, содержащий AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, который имеет структуру:



(Формула III),

где указанный AQ1-Релаксин содержит полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90%

идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, при этом модифицированный пара-ацетил-фенилаланин, показанный в формуле III, расположен на N-конце указанного полипептида А-цепи релаксина.

В настоящем документе также обеспечен модифицированный полипептид релаксина, содержащий AQ1-Relaxin-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, который имеет структуру Формулы III, описанной в настоящем документе, где AQ1-Релаксин содержит полипептид А-цепи релаксина с SEQ ID NO: 35 и полипептид В-цепи релаксина с SEQ ID NO: 6, при этом модифицированный пара-ацетил-фенилаланин, показанный в Формуле III, расположен на N-конце указанного полипептида А-цепи релаксина.

Также, в настоящем документе обеспечен модифицированный полипептид релаксина, имеющий структуру, показанную на фиг. 8.

Также, в настоящем документе обеспечен модифицированный полипептид релаксина, имеющий структуру, показанную на фиг. 9.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая

модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество модифицированного полипептида релаксина, как описано в настоящем документе, для лечения нарушения, связанного с релаксином, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ лечения заболевания, связанного с релаксином, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ лечения сердечнососудистого заболевания, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано здесь, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ лечения или ослабления симптома сердечной недостаточности, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано здесь, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ лечения заболевания, связанного с фиброзом, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано здесь, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ лечения или предотвращения почечной недостаточности, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано здесь, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ улучшения, стабилизации или восстановления почечной функции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано здесь, пациенту.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ изготовления модифицированного полипептида релаксина, как описано в настоящем документе, включающий: (а) обеспечение полипептида, содержащего указанную А-цепь релаксина и указанную В-цепь релаксина, при этом указанный полипептид содержит указанную не кодируемую в природных условиях аминокислоту; и (b) связывание указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты с указанным фармакокинетическим энхансером.

#### **Краткое описание нескольких видов чертежей**

Фиг. 1. Последовательность полипептида человеческого релаксина-2 без не кодируемой в природных условиях аминокислоты. Полипептиды А-цепи (SEQ ID NO: 4) и В-цепи (SEQ ID NO: 6) связаны дисульфидными связями, как показано на фиг. 5. Положение 1 в В-цепи модифицировано относительно В-цепи полипептида человеческого релаксина-2 (SEQ ID NO: 5) (подчеркнутое положение, аспарагиновая кислота замещена аланином, как показано), что, как наблюдалось, улучшает изготовление без значительного неблагоприятного воздействия на активность. В приведенных в настоящем документе рабочих примерах этот полипептид называется как "дикий тип" или WT-RLX.

Фиг. 2. Последовательность RLX-AQ1 ("AQ1"), полипептид человеческого релаксина-2 с не кодируемой в природных условиях аминокислотой, пара-ацетил-фенилаланином (pAcF, подчеркнуто), заменяющей положение 1 А-цепи. А-цепь (SEQ ID NO: 35) и В-цепь (SEQ ID NO: 6) связаны дисульфидными связями в положениях, показанных на фиг. 5.

Фиг. 3. Последовательность RLX-BM25/AN1 ("BM25/AN1"), полипептида человеческого релаксина-2 с не кодируемой в природных условиях аминокислотой, пара-ацетил-фенилаланином (pAcF, подчеркнуто), заменяющей положение 25 В-цепи, и, кроме того, положение 1 А-цепи содержит замену глутамина на аспарагин (подчеркнуто). А-цепь (SEQ ID NO: 36) и В-цепь (SEQ ID NO: 37) связаны дисульфидными связями в положениях, показанных на фиг. 5.

Фиг. 4. Схематическое изображение полипептида препро-релаксина для экспрессии RLX-AQ1. Полипептид препро-релаксина (SEQ ID NO: 38) экспрессируется в E.coli или другой системе экспрессии. Аминокислота, не кодируемая в природных условиях, такая как pAcF, может быть рибосомально встроена в полипептидную последовательность препро-релаксина, облегчая последующее связывание с фармакокинетическим энхансером ("ПК-экстендер"). Лидерная последовательность, специфическая в отношении экспрессии E.coli, обозначена серыми кружками. С-пептид (соединяющий пептид), происходящий из проинсулина с добавленными сайтами расщепления пептидов и заменой Lys на Gly, обозначен черными кружками. Лидерная последовательность и С-пептид удаляются ферментативным расщеплением (сайты расщепления указаны немечеными стрелками). Замена аланина в остатке 1 В-цепи ("B1") (присутствует в SEQ ID NO: 6) способствует удалению лидерной последовательности. Указан остаток pAcF для сайт-

специфического присоединения РК-энхансера. Цепи А и В совпадают с HUGO, называемым RLN2, и происходят из кДНК варианта 1 транскрипта relaxin2 (refseq NM\_134441).

Фиг. 5. Структурное изображение зрелого RLX-AQ1, содержащего А-цепь (SEQ ID NO: 36) и В-цепь (SEQ ID NO: 6), который связан через не кодируемую в природных условиях аминокислоту в положении 1 А-цепи с фармакокинетическим энхансером ("РК экстендер").

Фиг. 6А-6В. Эффекты WT-RLX (Фиг. 6А) и AQ1-GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH (Фиг. 6В) на изменения экспрессии гена альфа-актина гладких мышц в обработанных TGF-бета фибробластах сердца человека с использованием qRT-PCR для измерения концентраций мРНК. Цифры над столбцами указывают процентное снижение против TGF-бета только носителем, установленным в качестве исходного уровня. Средние значения ± SEM; \*P < 0,05. Veh = носитель. нМ = наномолярный.

Фиг. 7А-7Д. Связанная с PEG вакуолизация эпителия почечных кортикальных канальцев у крысиных самок Sprague Dawley. Почки от крыс обрабатывали подкожно (SQ) один раз в день носителем или аналогами релаксина. PEG-содержащие аналоги релаксина (Фигуры 7В и 7С) показали отчетливо выраженную вакуолизацию кортикальных трубочек, характеризующуюся присутствием крупных сливающихся вакуолей. Вакуолей не наблюдалось у животных, обработанных носителем (Фиг. 7А) или непегилированным релаксином (Фиг. 7Д). Фиг. 7А: Носитель (150 мМ Arg в 10 мМ цитратном буфере, pH 5,5) SQ в течение 10 дней. Фиг. 7В: AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH (1.5 кДа PEG) SQ при 40 мг/кг/сутки в течение 7 дней. Фиг. 7С: AQ1-20-kDa-PEG (20 кДа PEG) SQ при 15 мг/кг/сутки в течение 10 дней. Фиг. 7Д: AQ1-GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH SQ в дозе 40 мг/кг в течение 7 дней. Увеличение 40×, H&E.

Фиг. 8. Структура AQ1-GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, показанная в Формуле III.

Фиг. 9. Структура AQ1-GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, показанная в Формуле III.

#### Подробное описание изобретения

Определения.

Как используется в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают множественное число, если контекст ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "релаксин", "полипептид релаксина" или "модифицированный полипептид релаксина" представляет собой ссылку на один или несколько таких белков и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и так далее.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится данное изобретение.

Термины "фармакокинетический экстендер", "фармакокинетический энхансер", "РК-экстендер" и "РК-энхансер" используются взаимозаменяемо, и каждый из них относится к фармацевтически приемлемому фрагменту, домену или молекуле, ковалентно связанной ("конъюгированной" или "слитой") с модифицированным полипептидом релаксина, описанным в настоящем документе, необязательно посредством не кодируемой в природных условиях аминокислоты, которая предупреждает, задерживает или смягчает протеолитическую деграцию *in vivo* или другую ослабляющую активность химическую модификацию модифицированного полипептида релаксина, увеличивает период полувыведения (период полувыведения из сыворотки и/или терапевтический период полувыведения) и/или улучшает или изменяет другие фармакокинетические или биофизические свойства, включая, но без ограничения, увеличение скорости абсорбции, снижение токсичности, улучшение растворимости, уменьшение агрегации, увеличение биологической активности и/или селективности в отношении мишени модифицированного полипептида релаксина, и/или уменьшение иммуногенности модифицированного полипептида релаксина, по сравнению с веществом сравнения, таким как неконъюгированная форма модифицированного полипептида релаксина или полипептида релаксина дикого типа. РК-энхансер, описанный в настоящем документе, может содержать пептидный компонент, содержащий одну или несколько аминокислот, и фрагмент, удлиняющий период полувыведения.

Термин "фрагмент, удлиняющий период полувыведения" относится к фармацевтически приемлемому фрагменту, домену или молекуле, ковалентно связанной ("конъюгированной" или "слитой") с модифицированным полипептидом релаксина, описанным в настоящем документе, например, в качестве компонента РК-экстендера, необязательно через не кодируемую в природных условиях аминокислоту, непосредственно или через линкер (например, пептидный компонент или PEG), который увеличивает период полувыведения (период полувыведения из сыворотки и/или терапевтический период полувыведения), и/или улучшает или изменяет другие фармакокинетические или биофизические свойства, включая, но без ограничения, увеличение скорости абсорбции, снижение токсичности, улучшение растворимости, уменьшение агрегации, увеличение биологической активности и/или селективности в отношении мишени модифицированного полипептида релаксина, увеличение технологичности и/или уменьшение иммуногенности модифицированного полипептида релаксина по сравнению с веществом сравнения, таким как неконъюгированная форма модифицированного полипептида релаксина или полипептида релаксина дикого типа. Термин "фрагмент, удлиняющий период полувыведения" включает, но без ограниче-

ния, небелковые фрагменты, удлиняющие период полувыведения, такие как жирная кислота или ее производные, водорастворимый полимер, такой как полиэтиленгликоль (PEG) или дискретный PEG, гидроксиэтилкрахмал (HES), липид, разветвленная или неразветвленная ацильная группа, разветвленная или неразветвленная  $C_8-C_{30}$  ацильная группа, разветвленная или неразветвленная алкильная группа и разветвленная или неразветвленная  $C_8-C_{30}$  алкильная группа; и белковые фрагменты, удлиняющие период полувыведения, такие как сывороточный альбумин, трансферрин, аднектин (например, альбумин-связывающий или расширяющий фармакокинетические свойства (PKE) аднектин), Fc-домен и неструктурированный полипептид, такой как полипептид XTEN и PAS (например, конформационно-неупорядоченные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и/или Ser), и фрагмент любого из вышеперечисленных. Термин "линкер" или "спейсер" может представлять собой любой компонент, который связывает фрагмент, удлиняющий период полувыведения, с модифицированным полипептидом релаксина. Типичные линкеры включают, но без ограничения, небольшие органические соединения, водорастворимые полимеры различной длины, такие как поли(этиленгликоль) или полидекстран, и пептиды или полипептиды длиной, например, до 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 6 аминокислот.

Термин "пептидный компонент" относится к компоненту PK-экстендера и содержит пептид длиной до 50 аминокислот. Типичные пептидные компоненты включают, но без ограничения, пептиды длиной до 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоты. Такой пептидный компонент может ковалентно связывать фрагмент, удлиняющий период полувыведения, с модифицированным полипептидом релаксина, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пептидный компонент может содержать 2-50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный компонент может содержать 2-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный компонент может содержать 3-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный компонент может содержать 5-10 аминокислот.

Термин "стабильность" или "термическая стабильность" относится к способности полипептида противостоять разворачиванию при нагревании. Как правило, чем выше термическая стабильность молекулы, тем выше температура, которая требуется для разворачивания полипептида. Иллюстративные способы определения термической стабильности полипептида представляют собой дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) и способы флуоресцентного термического сканирования. Термическую стабильность можно определить по отношению к соединению сравнения, например, для идентификации полипептида, имеющего повышенную термическую стабильность.

Термин "агрегация" относится к тенденции полипептида образовывать нековалентно связанные комплексы с другими молекулами (такими как другие молекулы одного и того же полипептида), образуя тем самым комплексы с высокой молекулярной массой. Иллюстративные способы измерения образования агрегатов включают аналитическую эксклюзионную хроматографию. Относительные объемы агрегации могут быть определены относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, имеющего пониженную агрегацию.

Термин "дезамирирование" относится к тенденции аминокислотных остатков в полипептиде спонтанно подвергаться реакции дезамидирования, тем самым изменяя химическую структуру аминокислоты и потенциально влияя на функцию полипептида. Иллюстративные способы измерения дезамидирования включают динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование (icIEF). Относительное количество дезамидирования может быть определено относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, имеющего пониженное дезамидирование.

Термин "протеолиз *in vivo*" относится к расщеплению полипептида при введении в живую систему (например, при введении в организм), которое может быть результатом действия протеаз, присутствующих в указанном организме. Протеолиз может потенциально влиять на биологическую активность или период полувыведения полипептида. Например, релаксин дикого типа может подвергаться расщеплению, приводя к усеченному, неактивному полипептиду. Иллюстративный способ измерения протеолиза релаксина *in vivo* представляет собой основанный на среднемасштабном исследовании (MSD) электрохемилюминесцентный иммуносорбентный анализ (ECLIA). Относительное количество протеолиза *in vivo* может быть определено относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, имеющего пониженный протеолиз *in vivo*.

Термин "растворимость" относится к количеству вещества, которое может раствориться в другом веществе, например, количеству немодифицированного или модифицированного полипептида релаксина, который может растворяться в водном растворе. Иллюстративный способ измерения растворимости немодифицированного или модифицированного полипептида релаксина представляет собой тест на растворимость в реакторе идеального вытеснения. Относительную растворимость можно определить относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, характеризующегося повышенной растворимостью.

Термин "биологическая активность" или "биоактивность" относится к способности молекулы воздействовать на любые физические или биохимические свойства биологической системы, путь, молекулу или взаимодействие, относящиеся к организму, включая, но без ограничения, вирусы, бактерии, бакте-

риофаг, транспозон, прион, насекомых, грибы, растения, животных и людей. Например, в контексте немодифицированного или модифицированного релаксина биологическая активность предусматривает любую из функций, выполняемых релаксином. Например, "биологически активный" модифицированный полипептид релаксина может проявлять одну или несколько биологических активностей релаксина дикого типа, включая, но без ограничения: активацию рецептора релаксина-2 RXFP1, включая человеческие и не относящиеся к человеческим ортологи RXFP1, активацию другого рецептора релаксина, такого как RXFP2, включая человеческие и не относящиеся к человеческим ортологи, антифибротическую активность *in vitro* или *in vivo*, эффективность в лечении сердечной недостаточности или фиброзной болезни у человека, отличного от человека животного и/или в модельной системе, и другие биологические активности, раскрытые в настоящем документе, например, снижение системного сосудистого сопротивления (SVR), увеличение сердечного выброса, повышение общей артериальной совместимости, увеличение почечного кровотока (RBF) и/или скорости клубочковой фильтрации (GFR). Иллюстративные способы определения того, обладает ли молекула по меньшей мере одной биологической активностью релаксина дикого типа (такого как полипептид релаксина дикого типа из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5), могут включать анализы активности *in vitro* или анализы связывания рецептора, например, внутриклеточный анализ накопления cAMP. Относительный уровень биологической активности может быть определен относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, обладающего биологической активностью или обладающего достаточно высокой биологической активностью для предполагаемого терапевтического применения, например, характеризующегося значением EC<sub>50</sub>, которое менее чем в 5 раз, в 10 раз, менее чем в 20 раз, менее чем в 50 раз или менее чем в 100 раз выше, чем значение EC<sub>50</sub> соединения сравнения, в анализе активности *in vitro* или *in vivo*.

Описанное в настоящем документе соединение сравнения может характеризоваться другой последовательностью, не имеющей модификации, такой как описанная в настоящем документе модификация. Например, соединение сравнения может характеризоваться такой же модифицированной полипептидной последовательностью релаксина без связи с РК-экстендером. Иллюстративные соединения сравнения включают, но без ограничения, полипептид релаксина дикого типа с SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, модифицированный полипептид релаксина с SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6, модифицированный полипептид релаксина с SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 6, модифицированный полипептид релаксина с SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 6, или другое соединение сравнения. В некоторых вариантах осуществления соединение сравнения может содержать по меньшей мере одну не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая может быть связана с описанным в настоящем документе линкером, полимером, биологически активной молекулой, пептидом, полипептидом или фрагментом, удлиняющим период полувыведения (например, PEG или жирная кислота). В некоторых вариантах осуществления соединение сравнения может содержать по меньшей мере одну не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая может быть или может не быть связана с описанным в настоящем документе линкером, полимером, биологически активной молекулой, пептидом, полипептидом или фрагментом, удлиняющим период полувыведения. В некоторых вариантах осуществления соединения сравнения может содержать дополнительные аминокислотные замены, делеции и/или вставки. В некоторых вариантах осуществления сравнение может быть проведено с ацилированной или неацилированной формой полипептида; в первом случае сравнение может быть проведено с полипептидом, содержащим или не содержащим не кодируемую в природных условиях аминокислоту.

Термин "соответствующий" относится к положению ("положению, соответствующему" или "соответствующему положению") или к области ("области, соответствующей" или "соответствующей области") внутри полипептидной или полинуклеотидной последовательности, которая идентифицируется путем сравнения с эталонной последовательностью. Эталонная последовательность может представлять собой последовательность дикого типа или немодифицированную последовательность, такую как полипептид релаксина дикого типа с SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. Соответствующее положение или область могут быть идентифицированы путем выравнивания последовательности с эталонной последовательностью. Например, "положение, соответствующее аминокислоте 1 в А-цепи релаксина" относится к положению в последовательности, которое находится в той же колонке выравнивания, что и аминокислота 1 в SEQ ID NO: 4, когда эта последовательность выровнена с SEQ ID NO: 4. При выравнивании аминокислота или нуклеотид могут соответствовать или не соответствовать аминокислоте или нуклеотиду в соответствующем положении в эталонной последовательности.

Выравнивание, используемое для идентификации соответствующего положения или соответствующей области, может быть получено с использованием обычного алгоритма выравнивания, такого как Blast (Altschul et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10), Smith-Waterman (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25; 147(1): 195-7) или Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53). Алгоритм Needleman-Wunsch может использоваться для получения наиболее эффективного глобального выравнивания (то есть выравнивания, содержащего каждый остаток в обеих последовательностях, хотя выравнивание может начинаться и/или заканчиваться пробелами). Независимо от того, используются ли Blast, Smith-Waterman или Needleman-Wunsch, наиболее эффективное выравнивание может быть определено с использованием параметров "по умолчанию", таких как использование

матрицы подсчета BLOSUM62, штраф за открытие пропуска в последовательности, равный 11, и штраф за продолжение пропуска, равный 1, и (при использовании Blast для парного выравнивания) размер слова 3.

Термин "связанное с фиброзом заболевание" включает заболевания, нарушения и состояния, при которых наблюдается фиброз или про которые известно или предполагается, что с ними связан фиброз или способствует этиологии, прогрессированию или симптомам заболевания, или про которые известно или предполагается, что фиброз возникает по мере прогрессирования заболевания. Фиброз может воздействовать на орган или ткань, такие как поджелудочная железа, легкое, сердце, почка, печень, глаза, нервная система, костный мозг, лимфатические узлы, эндомиокард или забрюшинное пространство. Иллюстративные связанные с фиброзом заболевания, включают, но без ограничения, неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, предцирроз, цирроз, диффузную паренхиматозную болезнь легкого, кистозный фиброз, легочный или пульмонарный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, идиопатический легочный фиброз, инъекционный фиброз, почечный или ренальный фиброз, хроническое заболевание почек, диабетическую нефропатию, очаговый сегментный гломерулосклероз, мембранную нефропатию, нефропатию IgA, миелофиброз, сердечную недостаточность, метаболическую сердечную недостаточность, фиброз сердца, катаракту с фиброзом, катаракту, рубцы глаз, фиброз поджелудочной железы, фиброз кожи, кишечный фиброз, стеноз кишечника, эндомиокардиальный фиброз, фиброз предсердий, фиброз средостения, болезнь Крона, забрюшинный фиброз, келоид, нефрогенный системный фиброз, склеродермию, системный склероз, артрофиброз, синдром Пейрони, контрактуру Дюпюитрена, диабетическую невропатию, адгезивный капсулит, алкогольную болезнь печени, гепатостатит, вирусный гепатит, билиарное заболевание, первичный хемокроматоз, связанный с лекарственными средствами против цирроза печени, криптогенный цирроз печени, болезнь Вильсона, недостаточность альфа-1-антитрипсина, интерстициальная болезнь легких (ILD), фиброзное заболевание легких человека, дегенерацию желтого пятна, ретинопатию сетчатки, витреальную ретинопатию, миокардиальный фиброз, офтальмопатию Грейвса, индуцированный лекарственными средствами эрготизм, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз/рестеноз, гипертрофические рубцы, первичный или идиопатический миелофиброз и воспалительное заболевание кишечника (включая, но без ограничения, коллагенозный колит). В некоторых вариантах осуществления связанное с фиброзом заболевание может включать фиброз печени, почки или ренальный фиброз, легочный или пульмональный фиброз и сердечный фиброз или фиброз миокарда. В некоторых вариантах осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой фиброз печени. В некоторых вариантах осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой NASH.

Термин "по существу очищенный" относится к немодифицированному или модифицированному полипептиду релаксина, который по существу или в основном не содержит компонентов, обычно сопровождающих белок или взаимодействующих с ним, обнаруженных в его природном окружении, то есть нативной клетке или клетке-хозяину в случае рекомбинантно продуцированных немодифицированных или модифицированных полипептидов релаксина. Немодифицированный или модифицированный полипептид релаксина, который может по существу не содержать клеточный материал, включает препараты белка, содержащие менее чем около 30%, менее чем около 25%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 4%, менее чем около 3%, менее чем около 2% или менее чем около 1% (по сухой или влажной массе) загрязняющего белка. Таким образом, "по существу очищенный" немодифицированный или модифицированный полипептид релаксина, полученный способами согласно настоящему изобретению, может иметь уровень чистоты по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, в частности, уровень чистоты по меньшей мере около 75%, 80%, 85% и более конкретно уровень чистоты по меньшей мере около 90%, уровень чистоты по меньшей мере около 95%, уровень чистоты по меньшей мере около 99% или выше, определенный подходящими способами, такими как анализ SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC и капиллярный электрофорез.

"Рекомбинантная клетка-хозяин" или "клетка-хозяин" относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от способа, используемого для вставки, например, прямого поглощения, трансдукции, f-спаривания или других способов, известных в данной области для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в виде неинтегрированного вектора, например, плазмиды или, альтернативно, может быть интегрирован в геном хозяина.

Используемый в настоящем документе термин "эукариот" относится к организмам, принадлежащим филогенетическому домену Eucarya, таким как животные (включая, но без ограничения, млекопитающих, насекомых, рептилий, птиц и т.д.), инфузории, растения (включая, но без ограничения, однодольные, двудольные, водоросли и т.д.), грибы, дрожжи, жгутиковые, микроспоридии, простейшие и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "неэукариот" относится к неэукариотическим организмам или прокариотическим организмам. Например, неэукариотический организм может принадлежать филогенетическому домену Eubacteria (включая, но без ограничения, Escherichia coli, Thermus thermophilus, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas

putida и т.д.) или филогенетическому домену Archaea (включая, но без ограничения, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такие как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium* виды NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix*).

Используемый в настоящем документе термин "среда" или "среды" включает любую культуральную среду, раствор, твердую, полутвердую или жесткую подложку, которая может поддерживать или содержать любую клетку-хозяина, включая бактериальные клетки-хозяева, клетки-хозяева дрожжей, клетки-хозяева насекомых, клетки-хозяева растений, клетки-хозяева эукариот, клетки-хозяева млекопитающих, клетки СНО, прокариотические клетки-хозяева, клетки-хозяева *E.coli* или *Pseudomonas* и содержимое клеток. Таким образом, этот термин может охватывать среду, в которой была выращена клетка-хозяин, например, среду, в которую был секретирован немодифицированный или модифицированный полипептид релаксина, включая среду либо до стадии пролиферации, либо после нее. Термин также может охватывать буферы или реагенты, которые содержат лизаты клеток-хозяев, такие как в случае, когда немодифицированный или модифицированный полипептид релаксина продуцируется внутриклеточно, и клетки-хозяева подвергаются лизису или разрушаются с высвобождением немодифицированного или модифицированного полипептида релаксина.

Используемый в настоящем документе термин "релаксин" относится к человеческому релаксину, в частности, человеческому релаксину-2 (также известному как H2 релаксин или RLN2), если в контексте не указано иное, аминокислотная последовательность и пространственная структура которого хорошо известны. Человеческий релаксин состоит из А-цепи из двадцати четырех аминокислот и В-цепи из двадцати девяти аминокислот, которые поперечно сшиты дисульфидными связями (см. фиг. 5). Правильно сшитый релаксин дикого типа содержит три дисульфидных мостика: один между положением 11 А-цепи и положением 11 В-цепи, второй между положением 24 А-цепи и положением 23 В-цепи, и третий между положениями 10 и 15 А-цепи.

Используемый в настоящем документе "модифицированный полипептид релаксина" или "модифицированный релаксин" используются взаимозаменяемо и включают такие полипептиды и белки, которые отличаются от релаксина дикого типа (например, человеческого релаксина дикого типа с SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5) и, как правило, содержат по меньшей мере одну биологическую активность релаксина-2, а также аналоги релаксина, изоформы релаксина, миметики релаксина, полиморфизмы (например, встречающиеся в природе варианты последовательности релаксина), фрагменты релаксина, гибридные белки релаксина, белки слияния, олигомеры и мультимеры, гомологи, варианты паттерна гликозилирования, их варианты, сплайс-варианты и мутеины. Термины "модифицированный полипептид релаксина" и "модифицированный релаксин" охватывают полипептиды релаксина, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций.

Замены в разнообразных положениях аминокислот в природном релаксине могут быть введены в модифицированный полипептид релаксина. Замены, включая, но без ограничения, такие, которые модулируют растворимость или стабильность, увеличивают активность агонистов, увеличивают период полувыведения *in vivo* или *in vitro*, повышают устойчивость к действию протеаз, снижают иммуногенность или токсичность, способствуют очистке или технологичности и т.д., охвачены термином "модифицированный полипептид релаксина" или "модифицированный релаксин". В некоторых вариантах осуществления замена(ы) не кодируемых в природных условиях аминокислот, описанная в настоящем документе, может быть объединена с другими добавлениями, заменами или делециями в модифицированном полипептиде релаксина для воздействия на биологические признаки модифицированного полипептида релаксина относительно другого полипептида релаксина (например, полипептида релаксина дикого типа с SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, или другого полипептида релаксина, например, того же самого полипептида релаксина без указанного добавления, замены или делеции, или другого немодифицированного или модифицированного полипептида релаксина). В некоторых вариантах осуществления другие добавления, замены или делеции могут увеличить стабильность (включая, но без ограничения, устойчивость к протеолитической деградации) модифицированного полипептида релаксина или увеличить аффинность модифицированного полипептида релаксина к его рецептору. В некоторых случаях другие добавления, замены или делеции могут увеличить фармацевтическую стабильность модифицированного полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления другие добавления, замены или делеции могут увеличить растворимость (включая, но без ограничения, при экспрессии в *E.coli* или других клетках-хозяевах), увеличить технологичность или уменьшить агрегацию модифицированного полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления добавления, замены или делеции могут увеличить растворимость полипептида после экспрессии в *E.coli* или других рекомбинантных клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления сайт(ы) может быть выбран для замены кодируемой в природных условиях или неприродной аминокислотой в дополнение к другому сайту для встраивания неприродной аминокислоты, что приводит к увеличению растворимости полипептида после экспрессии в *E.coli* или других рекомбинантных клетках-хозяевах.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные полипептиды релаксина, кроме того, содержат дополнительную вставку, замену или делецию, которая модулирует биологическую активность модифицированного полипептида релаксина. Например, добавления, замены или делеции могут модули-

ровать одно или несколько свойств или активностей модифицированного релаксина. Например, добавления, замены или делеции могут модулировать аффинность к рецептору полипептида релаксина, связывающим белкам или связанному лиганду, модулировать сигнальную трансдукцию после связывания с рецептором релаксина, модулировать период полувыведения *in vivo* в кровотоке, модулировать терапевтический период полувыведения, модулировать стабильность полипептида, модулировать расщепление протеазами, модулировать дозу, модулировать высвобождение или биодоступность, облегчать очистку, уменьшать дезамидирование, снижать агрегацию, улучшать срок хранения или период полувыведения *in vitro*, или улучшать или изменять конкретный способ введения. Аналогично, модифицированные полипептиды релаксина могут содержать последовательности расщепления протеазой, реакционноспособные группы, связывающие антитела домены (включая, но без ограничения, FLAG или поли-His) или другие последовательности на основе аффинности (включая, но без ограничения, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связанные молекулы (включая, но без ограничения, биотин), которые улучшают обнаружение (включая, но без ограничения, GFP), очистку или другие признаки полипептида.

Термин "модифицированный полипептид релаксина" также включает биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры встречающегося в природе релаксина, а также варианты агонистов, миметиков и антагонистов встречающихся в природе слияний релаксина и полипептидов. Слияния, содержащие дополнительные аминокислоты на аминоконце, карбоксильном конце или и там и там, охвачены термином "модифицированный полипептид релаксина". Иллюстративные слияния включают, но без ограничения, например, метионил-релаксин, в котором метионин связан с N-концом А-цепи и/или В-цепи релаксина, представляя собой результат рекомбинантной экспрессии зрелой формы релаксина, лишенной лидерного или сигнального пептида или его части (например, метионин связан с N-концом А-цепи и/или В-цепи релаксина, представляя собой результат рекомбинантной экспрессии, например, в *E. coli*), слияния с целью очистки (включая, но без ограничения, полигистидиновые или аффинные эпитопы), слияния со связывающими сывороточный альбумин пептидами, такими как РКЕ аднектин, и слияния с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин и слитые белки, содержащие релаксин и одну или несколько других молекул ("партнер по слиянию"), включая, но без ограничения, сывороточный альбумин, Fc-домен, константную область иммуноглобулина, неструктурированный полипептид и аднектин, и их фрагмент. Любые подобные фрагменты могут быть получены из белков стандартными биохимическими способами или путем экспрессии полинуклеотида, кодирующего фрагмент.

Если не указано иное, в целом, термины "полипептид релаксина" и "релаксин", используемые в настоящем документе, включают как немодифицированные (то есть дикого типа), так и модифицированные полипептиды релаксина.

Термин "модифицированный полипептид релаксина" включает полипептиды, конъюгированные с полимером, таким как РЕГ или РК-экстендер, и может необязательно содержать одно или несколько производных цистеина, лизина или других остатков. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид релаксина может содержать линкер, полимер или РК-экстендер, при этом аминокислота, с которой конъюгирован линкер, полимер или РК-экстендер, может представлять собой природную аминокислоту согласно настоящему изобретению или кодируемую в природных условиях аминокислоту (например, лизин или цистеин) с применением известных в данной области способов, таких как соединение с лизином или цистеином.

Термин "модифицированный полипептид релаксина" также включает полипептиды релаксина, конъюгированные или связанные с РК-экстендером, описанным в настоящем документе, посредством кодируемой в природных условиях аминокислоты, например, цистеина или лизина, в полипептиде релаксина. В некоторых вариантах осуществления кодируемая в природных условиях аминокислота может представлять собой замену или вставку в полипептид релаксина.

Термин "модифицированный полипептид релаксина" также включает гликозилированный модифицированный релаксин, такой как, но без ограничения, полипептиды, гликозилированные в любом положении аминокислоты, N-связанные или O-связанные гликозилированные формы полипептида. Кроме того, включены также варианты сплайсинга.

Все ссылки на положения аминокислот в немодифицированном или модифицированном релаксине, описанном в настоящем документе, основаны на соответствующем положении в А-цепи с SEQ ID NO: 4 или В-цепи с SEQ ID NO: 5, если не указано иное. Специалистам в данной области будет понятно, что положения аминокислот, соответствующие положениям в SEQ ID NO: 4 или 5, или другой последовательности релаксина, можно легко идентифицировать в любой другой молекуле релаксина, такой как слияния, варианты, фрагменты релаксина и т.д. Например, программы выравнивания последовательностей, такие как BLAST, можно использовать для выравнивания и идентификации конкретного положения в белке, которое соответствует положению в SEQ ID NO: 4 или 5, или другой последовательности релаксина. Замены, делеции или добавления аминокислот, описанных в настоящем документе в отношении SEQ ID NO: 4 или 5, или другой последовательности релаксина, предназначены также для обозначения замен, делеций или добавлений в соответствующие положения в слияниях, вариантах, фрагментах релаксина и т.д., описанных в настоящем документе или известных в данной области, и прямо охвачены

настоящим изобретением.

Термин "модифицированный полипептид релаксина" также охватывает гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры и гетеромультимеры, которые образуются через партнеров по слиянию, таких как Fc-домены, или которые связаны, включая, но без ограничения, с теми, которые связываются непосредственно через боковые цепи не кодируемых в природных условиях аминокислот с одинаковыми или разными боковыми цепями не кодируемых в природных условиях аминокислот, с боковыми цепями природных аминокислот, или опосредованно через линкер. Иллюстративные линкеры включают, но без ограничения, небольшие органические соединения, водорастворимые полимеры различной длины, такие как полиэтиленгликоль или полидекстран, или пептиды или полипептиды длиной, например, в 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

Используемый в настоящем документе термин "модифицированный" относится к любым изменениям, внесенным в данный полипептид, таким как изменения длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, ко-трансляционной модификации или посттрансляционной модификации полипептида. Термин "посттрансляционно модифицированный" относится к любой модификации природной или не природной аминокислоты, которая встречается в такой аминокислоте после ее встраивания в полипептидную цепь. Термин включает, только в качестве примера, ко-трансляционные *in vivo* модификации, ко-трансляционные *in vitro* модификации (например, в бесклеточной системе трансляции), пост-трансляционные модификации *in vivo* и пост-трансляционные модификации *in vitro*.

"Не кодируемая в природных условиях аминокислота" относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот или пирролизин, или селеноцистеин. Другие термины, которые могут быть использованы как синонимы термина "не кодируемая в природных условиях аминокислота", представляют собой "неприродная аминокислота", "аминокислота неприродного происхождения", "не встречающаяся в природных условиях аминокислота" и различные варианты этих терминов с дефисом или без дефиса. Термин "не кодируемая в природных условиях аминокислота" также включает, но без ограничения, аминокислоты, которые возникают в результате модификации (например, посттрансляционных модификаций) кодируемой в природных условиях аминокислоты (включая, но без ограничения, 20 обычных аминокислот или пирролизин и селеноцистеин), но сами обычно не встраиваются в растущую полипептидную цепь трансляционным комплексом. Примеры таких не кодируемых в природных условиях аминокислот включают, но без ограничения, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

В контексте модифицированного полипептида релаксина используемые в настоящем документе термины "пара-ацетил-фенилаланин" и "пара-ацетил-L-фенилаланин" (включая сокращения pAcF и pAF) также охватывают продукты химических реакций, при этом ацетильная группа в пара-положении отсутствует и на ее месте присутствует связь с другой молекулой. Так, например, в модифицированном полипептиде релаксина, который содержит пара-ацетил-фенилаланин (такой как пара-ацетил-L-фенилаланин), пара-ацетил-фенилаланин может содержать оксим, триазол, амид или другую связь в пара-положении, например, имеющее оксимную связь, которая возникает в результате реакции карбонильной группы пара-ацетил-L-фенилаланина с аминоксигруппой, и отсутствием карбонильного углерода в пара-положении. Такой пара-ацетил-фенилаланин может упоминаться как "модифицированный пара-ацетил-фенилаланин", например, "модифицированный пара-ацетил-L-фенилаланин".

Примером не кодируемой в природе аминокислоты является пара-ацетил-фенилаланин (pAcF). Он может быть синтезирован с использованием ранее описанной методики в работе Zhang, Z., Smith, B. A. C, Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

"Аминоконцевая модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к аминоконцу полипептида. Аналогично, "карбоксиконцевая модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к карбоксиконцу полипептида. Концевые модифицирующие группы включают, но без ограничения, различные водорастворимые полимеры, метионин, пептиды или белки, такие как сывороточный альбумин, Fc-домен, константную область иммуноглобулина, неструктурированный полипептид, аднектин или его фрагмент, жирные кислоты или их производные, или другие фрагменты, которые увеличивают период полувыведения полипептидов из сыворотки (*in vivo*).

Термины "функциональная группа", "активный фрагмент", "активированная группа", "уходящая группа", "реакционноспособный сайт", "химически реакционноспособная группа" и "химически реакционноспособный фрагмент" используются в настоящей области техники и в настоящем документе для обозначения различных определяемых частей или блоков молекулы. Эти термины являются синонимами в химической науке и используются в настоящем документе для обозначения частей молекул, которые осуществляют некоторую функцию или активность и вступают в реакцию с другими молекулами.

Термин "связь" используется в настоящем документе для обозначения групп или связей, которые обычно образуются в результате химической реакции и обычно являются ковалентными связями. Термин "устойчивые к гидролизу связи" означает, что связи являются по существу стабильными в воде и не реагируют с водой при используемом значении pH, в том числе, но без ограничения, в физиологических

условиях, в течение длительного периода времени, возможно, даже в течение неограниченного периода времени. "Гидролитически нестабильные или разлагаемые связи" означают, что эти связи разлагаются в воде или водных растворах, в том числе, например, крови. Ферментативно нестабильные или разлагаемые связи означают, что связь может быть разрушена одним или несколькими ферментами. Как понятно в данной области техники, PEG, жирные кислоты и другие полимеры могут включать разлагаемые связи в основной цепи полимера или в линкерной группе между основной полимерной цепью и одной или более из концевых функциональных групп в молекуле полимера. Например, сложноэфирные связи, образованные в результате реакции карбоновых кислот или активированных карбоновых кислот со спиртовыми группами в биологически активном веществе, обычно гидролизуются в физиологических условиях с высвобождением указанной молекулы. Другие гидролитически разлагаемые связи включают, но без ограничения, карбонатные связи; иминовые связи, образующиеся в результате реакции амина и альдегида; связи эфира фосфорной кислоты, которые образуются при взаимодействии спирта с фосфатной группой; гидразоновые связи, которые являются продуктом реакции гидразида и альдегида; ацетальные связи, которые являются продуктом реакции альдегида и спирта; ортоэфирные связи, которые являются продуктом реакции формиата и спирта; пептидные связи, образующиеся с участием аминокислоты, в том числе, но без ограничения, в конце полимера, и карбоксильной группы пептида; оксимные или семикарбазоновые связи, которые являются продуктом реакции карбонильной функциональной группы и гидроксил-или семикарбазид-содержащего реагента; и олигонуклеотидные связи, которые могут быть образованы фосфорамидитной группой, включая, но без ограничения, на конце полимера, и 5'-гидроксильной группой олигонуклеотида.

В тех случаях, когда замещающие группы определяются их обычными химическими формулами, написанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые могут возникать в результате написания структуры справа налево, например, структура  $\text{CH}_2\text{O}$  эквивалентна структуре  $-\text{OCH}_2$ . Композиции, представленные в настоящем документе, могут включать меченные изотопами соединения с одним или несколькими атомами, замененными атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе. Композиции, представленные в настоящем документе, могут включать изомеры, включая, но без ограничения, диастереомеры, энантиомеры и их смеси, например, L-аминокислоты и/или D-аминокислоты (такие как пара-ацетил-D-фенилаланин и/или пара-ацетил-L-фенилаланин).

Термин "заместители" включает, но без ограничения, "неинтерферирующие заместители". "Неинтерферирующими заместителями" являются группы, которые дают стабильные соединения. Подходящие неинтерферирующие заместители или радикалы включают, но без ограничения, галогено,  $(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкил,  $(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ алкенил,  $(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ алкинил,  $(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкокси,  $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ аралкил,  $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ алкарил,  $(\text{C}_3\text{-C}_{12})$ циклоалкил,  $(\text{C}_3\text{-C}_{12})$ циклоалкенил, фенил, замещенный фенил, толуоил, ксиленил, бифенил,  $(\text{C}_2\text{-C}_{12})$ алкоксиалкил,  $(\text{C}_2\text{-C}_{12})$ алкоксиарил,  $(\text{C}_7\text{-C}_{12})$ арилоксиалкил,  $(\text{C}_7\text{-C}_{12})$ оксиарил,  $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилсульфинил,  $(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилсульфонил,  $-(\text{CH}_2)_m$ -O-( $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил), где m равен от 1 до 8, арил, замещенный арил, замещенный алкокси, фторалкил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, нитроалкил,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NRC}(\text{O})-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$  alkyl),  $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил),  $(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ алкилтиоалкил,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил),  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SO}=\text{S}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NR}_2$ , карбонил,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил)- $\text{CF}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CF}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$ арил)-S-( $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арил),  $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1\text{-C}_{10}$ арил),  $-(\text{CH}_2)_m$ -O-( $-(\text{CH}_2)_m$ -O-( $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил)), где каждый m равен от 1 до 8,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{NR}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}_2$ ,  $-\text{NRC}(\text{O})\text{NR}_2$ ,  $-\text{NRC}(\text{S})\text{NR}_2$ , их соли и т.п. Каждый R, используемый в настоящем документе, представляет собой H, алкил или замещенный алкил, арил или замещенный арил, аралкил или алкарил.

Термин "галоген" включает фтор, хлор, йод и бром.

Термин "алкил", сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, линейную или разветвленную цепь, или циклический углеводородный радикал, или их сочетание, которые могут быть полностью насыщенными, моно- или полиненасыщенными и могут включать ди- и поливалентные радикалы, имеющие указанное число атомов углерода (т.е.  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  означает от одного до десяти атомов углерода). Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но без ограничения, такие группы, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил) метил, циклопропилметил, гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т.п. Ненасыщенная алкильная группа представляет собой группу, имеющую одну или несколько двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но без ограничения, винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомологи и изомеры. Термин "алкил", если не указано иное, также подразумевает включение тех производных алкила, которые определены более подробно ниже, таких как "гетероалкил". Алкильные группы, которые ограничены углеводородными группами, называют "гомоалкил".

Термин "алкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из алкана, как проиллюстрировано, но не ограничивается структурами  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и, кроме того, включает группы, описанные ниже как "гетероалкилен". Как правило, алкильная (или алкиленовая) группа будет содержать от 1 до 24 атомов углерода, причем группы, содер-

жащие 10 или менее атомов углерода, представляют собой конкретный вариант осуществления способов и композиций, описанных в настоящем документе. "Низший алкил" или "низший алкилен" представляет собой алкильную или алкиленовую группу с более короткой цепью, обычно содержащую восемь или меньше атомов углерода.

Термины "алкокси", "алкиламино" и "алкилтио" (или тиоалкокси) используются в их общепринятом смысле и относятся к алкильным группам, которые связаны с остальной частью молекулы через атом кислорода, аминогруппу или атом серы, соответственно.

Термин "гетероалкил", сам по себе или в комбинации с другим термином, означает, если не указано иное, стабильную неразветвленную или разветвленную цепь или циклический углеводородный радикал, или их комбинации, состоящий из указанного числа атомов углерода и по меньшей мере одного гетероатома, выбранного из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы могут быть необязательно окисленными, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизован. Гетероатом(ы) O, N и S и Si могут быть расположены в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают, но без ограничения,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . До двух гетероатомов может быть последовательными, такие как, например,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Аналогично, термин "гетероалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как проиллюстрировано, но без ограничения,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . Для гетероалкиленовых групп одинаковые или различные гетероатомы могут также располагаться на одном или обоих концах цепи (включая, но без ограничения, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино, аминоксидалкилен и т.п.). Кроме того, для алкиленовой и гетероалкиленовой связывающих групп порядок отображения формулы не предполагает никакой конкретной ориентации группы. Например, формула  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  представляет и  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ , и  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ .

Термины "циклоалкил" и "гетероциклоалкил", сами по себе или в сочетании с другими терминами, представляют собой, если не указано иное, циклические варианты "алкила" и "гетероалкила", соответственно. Таким образом, циклоалкил или гетероциклоалкил включают насыщенные, частично ненасыщенные и полностью ненасыщенные кольцевые связи. Кроме того, в случае гетероциклоалкила гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остальной части молекулы. Примеры циклоалкила включают, но без ограничения, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Примеры гетероциклоалкила включают, но без ограничения, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиаен-2-ил, тетрагидротиаен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и т.п. Кроме того, термин охватывает бициклические и трициклические кольцевые структуры. Подобным образом, термин "гетероциклоалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из гетероциклоалкила, а термин "циклоалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из циклоалкила.

Термин "арил" означает, если не указано иное, полиненасыщенный, ароматический углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или несколько колец (включая, но без ограничения, от 1 до 3 колец), которые конденсированы друг с другом или связаны ковалентно. Термин "гетероарил" относится к арильным группам (или кольцам), которые содержат от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O и S, при этом атомы азота и серы необязательно окислены, а атом(ы) азота необязательно кватернизован. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через гетероатом. Неограничивающие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-зохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из указанных выше арильных и гетероарильных кольцевых систем выбраны из группы приемлемых заместителей, описанных ниже.

Вкратце, термин "арил" при использовании в комбинации с другими терминами (включая, но без ограничения, арилокси, арилтиокси, арилалкил) включает как арильные, так и гетероарильные кольца, как определено выше. Таким образом, термин "арилалкил" подразумевает включение тех радикалов, в которых арильная группа присоединена к алкильной группе (включая, но без ограничения, бензил, фенетил, пиридилметил и т.п.), в том числе алкильные группы, в которых атом углерода (включая, но без ограничения, метиленовую группу) заменен, например, на атом кислорода (включая, но без ограничения, феноксиметил, 2-пиридилоксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропил и т.п.).

Каждый из приведенных выше терминов (включая, но без ограничения, "алкил", "гетероалкил", "арил" и "гетероарил") предназначен для включения как замещенных, так и незамещенных форм указан-

ного радикала. Примеры заместителей для каждого типа радикала приведены ниже.

Заместители для алкильных и гетероалкильных радикалов (включая группы, часто называемые алкиленом, алкенилом, гетероалкиленом, гетероалкенилом, алкинилом, циклоалкилом, гетероциклоалкилом, циклоалкенилом и гетероциклоалкенилом) могут представлять собой одну или несколько групп, выбранных, но без ограничения, из:  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR''$ ,  $-SR'$ ,  $-halogen$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR''R'''$ ,  $-OC(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $NR' C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR''R''')=NR''''$ ,  $NR C(NR''R''')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR''R'''$ ,  $NRSO_2R'$ ,  $-CN$  и  $-NO_2$  в количестве от 0 до  $(2m' + 1)$ , где  $m'$  является общим числом атомов углерода в таком радикале. Каждый  $R$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  независимо представляет собой водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, но без ограничения, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиаалкоксигруппы или арилалкильные группы. Если соединение по изобретению содержит более одной группы  $R$ , например, каждая из групп  $R$  независимо выбрана как каждая группа  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$ , если присутствует более одной группы этого типа. Если  $R$  и  $R''$  присоединены к одному атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, предполагается, что  $-NR''R'''$  включает, но без ограничения, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше описания заместителей специалисту в данной области будет понятно, что термин "алкил" включает группы, содержащие атомы углерода, связанные с группами, отличными от водорода, такие как галогеналкил (включая, но без ограничения,  $-CF_3$  и  $-CH_2CF_3$ ) и ацил (включая, но без ограничения,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  и т.п.).

Аналогично заместителям, описанным для алкильного радикала, заместители для арильной и гетероарильной групп варьируются и выбираются, но без ограничения, из следующих: галоген,  $OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR''R'''$ ,  $-SR'$ ,  $-halogen$ ,  $-SiR'R''R'''$ ,  $OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $CO_2R'$ ,  $-CONR''R'''$ ,  $-OC(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $NR' C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $NR-C(NR''R''')=NR''''$ ,  $NR C(NR''R''')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR''R'''$ ,  $NRSO_2R'$ ,  $-CN$  и  $-NO_2$ ,  $-R'$ ,  $-N_3$ ,  $-CH(Ph)_2$ , фтор( $C_1-C_4$ )алкокси и фтор( $C_1-C_4$ )алкил в количестве от 0 до общего числа открытых валентностей в ароматической кольцевой системе; и где  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  независимо выбраны из водорода, алкила, гетероалкила, арила и гетероарила. Когда соединение по изобретению содержит более одной группы  $R$ , например, каждая из групп  $R$  независимо выбрана, как и каждая из групп  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$ , если присутствует более одной из этих групп.

Термин "жирная кислота" относится к насыщенной или ненасыщенной ацильной цепи, имеющей от 6 до 20 атомов углерода, или ее производному. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может быть связана с пептидным компонентом РК-энхансера, описанного в настоящем документе, и заканчиваться карбоновой кислотой или метильной группой. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота, связанная с пептидным компонентом РК-энхансера, может оканчиваться карбоновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может быть связана с пептидным компонентом посредством амидной связи. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может содержать от 10 до 18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может содержать от 12 до 17 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может содержать 14, 15 или 16 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может содержать 15 атомов углерода.

Используемый в настоящем документе термин "водорастворимый полимер" относится к любому полимеру, который является растворимым в водных растворителях. Связывание водорастворимых полимеров с модифицированными полипептидами релаксина может привести к изменениям, включая, но без ограничения, увеличенный или модулированный период полувыведения из сыворотки (*in vivo*), или увеличенный или модулированный терапевтический период полувыведения по сравнению с немодифицированной формой, уменьшенная или модулированная иммуногенность или токсичность, модулированные характеристики физической ассоциации, такие как уменьшенная агрегация и образования мультимеров, измененное связывание с рецептором, измененное связывание с одним или несколькими партнерами по связыванию, и измененная димеризация или мультимеризация рецептора. Водорастворимый полимер может обладать или может не обладать собственной биологической активностью и может быть использован в качестве линкера для присоединения модифицированного релаксина к другим веществам, включая, но без ограничения, один или несколько немодифицированных или модифицированных полипептидов релаксина, или одну или несколько биологически активных молекул. Подходящие полимеры включают, но без ограничения, полиэтиленгликоль, пропиональдегид полиэтиленгликоля, их моно- $C_1-C_{10}$ алкокси- или арилоксипроизводные (описанные в патенте США 5252144, который включен в настоящее описание путем ссылки), монометокси-полиэтиленгликоль, дискретный PEG, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, дивиниловый эфир малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламид, декстран, производные декстрана, включая сульфат декстрана, полипропиленгликоль, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированный полиол, гепарин, фрагменты гепарина, полисахариды, олигосахариды, гликаны, целлюлозу и ее производные, включая, но без ограничения, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу, крахмал и производные крахмала, полипептиды двух или более аминокислот, полиалкиленгликоль и его производные, сополимеры полиалкиленгликолей и их производные, поливинилэтиловые эфиры и альфа-бета-поли[(2-гидроксиэтил)-DL-

аспартамид, и т.п., или их смеси. Примеры таких водорастворимых полимеров включают, но без ограничения, полиэтиленгликоль и сывороточный альбумин.

Используемый в настоящем описании термин "полиалкиленгликоль" (PEG) или "поли(алкенгликоль)" относится к полиэтиленгликолю (поли(этиленгликолю)), полипропиленгликолю, полибутиленгликолю и их производным. Термин "полиалкиленгликоль" включает как линейные, так и разветвленные полимеры со средней молекулярной массой от 0,1 кДа до 100 кДа. Другие представительные варианты реализации приведены, например, в каталогах коммерческих поставщиков, таких как каталог корпорации Shearwater "Полиэтиленгликоль и его производные для биомедицинских применений" (2001).

Используемые в настоящем документе термины "модулированный период полувыведения из сыворотки" или "модулированный *in vivo* период полувыведения из сыворотки" и подобные термины относятся к положительному или отрицательному изменению периода полувыведения из кровотока модифицированного релаксина относительно вещества сравнения, такого как его немодифицированная форма или релаксин дикого типа. Период полувыведения из сыворотки может быть измерен путем взятия образцов крови в различные моменты времени после введения модифицированного релаксина и определения концентрации этой молекулы в каждом образце. Зависимость концентрации в сыворотке от времени позволяет рассчитать период полувыведения из сыворотки. Желательно, чтобы увеличение периода полувыведения из сыворотки (*in vivo*) составляло по меньшей мере примерно в два раза, но может быть полезным и увеличение в меньшей степени, например, когда оно обеспечивает удовлетворительный режим дозирования или позволяет избежать токсического эффекта. В некоторых вариантах осуществления увеличение составляет по меньшей мере примерно в три раза, по меньшей мере примерно в пять раз, по меньшей мере примерно в десять раз, по меньшей мере примерно в двадцать раз или по меньшей мере примерно в пятьдесят раз.

Термин "модулированный терапевтический период полувыведения", используемый в настоящем документе, означает положительное или отрицательное изменение в сыворотке или *in vivo* периода полувыведения терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина, описанного в настоящем документе, по сравнению с препаратом сравнения, таким как его немодифицированная форма или релаксин дикого типа. Терапевтический период полувыведения определяют путем измерения фармакокинетических и/или фармакодинамических характеристик молекулы в различные моменты времени после введения. Желательно, чтобы увеличение терапевтического периода полувыведения обеспечивало особенно благоприятный режим дозирования, особенно благоприятную общую дозу или позволяло избежать нежелательного эффекта. В некоторых вариантах осуществления увеличение терапевтического периода полувыведения приводит к увеличению эффективности, увеличению или уменьшению связывания модифицированной молекулы с ее мишенью, увеличению или уменьшению ферментативного разрушения молекулы, например, под действием протеаз, или увеличению или уменьшению другого параметра или механизма действия немодифицированной молекулы, или увеличению или уменьшению рецептор-опосредованного клиренса молекулы. В некоторых вариантах осуществления увеличение терапевтического периода полувыведения может составлять по меньшей мере примерно в два раза, по меньшей мере примерно в три раза, по меньшей мере примерно в пять раз, по меньшей мере примерно в десять раз, по меньшей мере примерно в двадцать раз, или по меньшей мере примерно в пятьдесят раз.

Термин "выделенный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок не содержат по меньшей мере некоторые из клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии, или что нуклеиновая кислота или белок были концентрированы до уровня, более высокого, чем концентрация при продуцировании *in vivo* или *in vitro*. Это может быть гомогенное состояние. Выделенные вещества могут находиться в сухом или полусухом состоянии или в растворе, включая, но без ограничения, водный раствор. Он может быть одним из компонентов фармацевтической композиции, которая включает дополнительно фармацевтически приемлемые носители и/или наполнители. Чистоту и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающей молекулой, присутствующей в препарате, является по существу очищенным. В частности, выделенный ген отделяют от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от целевого гена. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок дают, по существу, одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это может означать, что нуклеиновая кислота или белок обладают степенью чистоты не менее 85%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 99% или более.

Термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам в однопочечной или двухпочечной форме. Если конкретно не указано иное, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными с эталонной нуклеиновой кислотой, и метаболизируются аналогично природным нуклеотидам. Если специально не указано иное, этот термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая PNA (пептидонуклеиновую

кислоту), аналогам ДНК, используемым в антисмысловой технологии (фосфоротиоаты, фосфоамидааты и т.п.). Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает ее консервативно модифицированные варианты (включая, но без ограничения, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также последовательности, явно указанные.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. То есть описание, относящееся к полипептиду, в равной степени относится к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Термины применяются к встречающимся в природе аминокислотным полимерам, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой не кодируемую в природе аминокислоту. Используемые в настоящем документе термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, в которых аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

"Консервативно модифицированные варианты" относятся к аминокислотным последовательностям, содержащим консервативные замены. Иллюстративные консервативно модифицированные варианты включают замены, делеции или вставки в нуклеотидную, пептидную, полипептидную или белковую последовательность, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в полипептидной последовательности или кодированной полипептидной последовательности, например, до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или до 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% или 3,5% аминокислот в полипептидной последовательности или кодированной полипептидной последовательности, которые необязательно могут быть заменены или могут включать замену аминокислоты(аминокислот) химически сходной аминокислотой(аминокислотами). Таблицы консервативных замен, содержащие функционально сходные аминокислоты, известны специалистам в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели раскрытых модифицированных полипептидов релаксина.

Таблицы консервативных замен, содержащие функционально сходные аминокислоты, известны специалистам в данной области. Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (А или Ala), глицин (G или Gly);
- 2) аспарагиновая кислота (D или Asp), глутаминовая кислота (E или Glu);
- 3) аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln);
- 4) аргинин (R или Arg), лизин (K или Lys), гистидин (H или His);
- 5) изолейцин (I или Ile), лейцин (L или Leu), метионин (M или Met), валин (V или Val);
- 6) фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr), триптофан (W или Trp);
- 7) серии (S или Ser), треонин (T или Thr); и
- 8) цистеин (C или Cys), метионин (M или Met) (см., например, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)).

Термины "идентичные" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Последовательности являются "по существу идентичными", если они содержат некоторый процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. приблизительно 60% идентичности, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% идентичности в пределах определенного участка) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в указанном участке, как определено с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей (или других алгоритмов, доступных специалистам в данной области) или путем ручного выравнивания и визуального осмотра. Идентичность может существовать в области или окне сравнения, длина которого составляет по меньшей мере около 20 аминокислот или нуклеотидов, или в участке, длина которого составляет по меньшей мере около 25 аминокислот или нуклеотидов, или, если не указано иное, по всей последовательности полинуклеотида или полипептида. "Окно сравнения" в настоящем документе включает указание сегмента любого числа последовательных положений, например, по меньшей мере или около 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот, причем последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из того же числа последовательных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Примерами алгоритмов, которые могут быть пригодны для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно, а также Smith-Waterman (Smith and Waterman, *J Mol Biol.* 1981 Mar 25;147(1):195-7), or Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, *J Mol Biol.* 1970 Mar;48(3):443-53), которые могут запускаться с параметрами по умолчанию, например, как описано в этих соответствующих публикациях.

Термин "субъект", используемый в настоящем документе, относится к животному, в некоторых вариантах осуществления - млекопитающему, а в других вариантах осуществления - человеку, который

является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Животное может быть домашним животным (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственным животным (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и т.п.) или лабораторным животным (например, крысы, мыши, морские свинки, и т.п.).

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к такому количеству соединения (например, описанному в настоящем документе модифицированному полипептиду релаксина), введение которого может предупредить, вылечить, облегчить, ослабить, отсрочить начало, уменьшить тяжесть или уменьшить до некоторой степени один или несколько симптомов заболевания, состояния или нарушения, подвергаемого лечению. Композиции, содержащие модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, можно вводить для профилактического, усиливающего и/или терапевтического воздействия.

Термины "усилить" или "усиление" означают увеличение или продление желаемого эффекта по выраженности или продолжительности. Таким образом, в отношении усиления эффекта терапевтических агентов, термин "усиление" относится к способности усиливать или продлевать по выраженности или продолжительности влияние других терапевтических агентов в системе.

При профилактическом применении композиции, содержащие модифицированный полипептид релаксина, вводят пациенту, подверженному или иным образом имеющему риск конкретного заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяется как "профилактически эффективное количество".

При терапевтическом применении композиции, содержащие модифицированный полипептид, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, вводят пациенту, уже страдающему заболеванием, состоянием или нарушением, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного купирования или ослабления симптомов заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяется как "терапевтически эффективное количество" и может зависеть от тяжести и течения заболевания, нарушения или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и реакции на лекарственные средства, а также заключения лечащего врача. Считается, что специалист в данной области сможет определить такие терапевтически эффективные количества путем рутинных экспериментов (например, клинические испытания с эскалацией дозы).

Термин "лечение" используется для обозначения профилактического и/или терапевтического лечения.

Термин "восстанавливающий агент", используемый в настоящем документе в отношении повторной укладки белка, определяется как любое соединение или материал, который сохраняет сульфгидрильные группы в восстановленном состоянии и уменьшает внутри- или межмолекулярные дисульфидные связи. Подходящие восстанавливающие агенты включают, но без ограничения, дитиотреитол (DTT), 2-меркаптоэтанол, цистеин, цистеамин (2-аминоэтантол) и восстановленный глутатион. Специалистам в данной области техники очевидно, что широкий спектр восстанавливающих агентов пригоден для использования в способах и композициях согласно настоящему изобретению.

"Окисляющий агент", используемый в настоящем документе в отношении повторной укладки белка, определяется как любое соединение или материал, который способен удалять электрон из окисляемого соединения. Подходящие окисляющие агенты включают, но без ограничения, окисленный глутатион, цистин, цистамин, окисленный дитиотреитол, окисленный эритреитол и кислород. Специалистам в данной области техники очевидно, что широкий спектр окислителей является пригодным для использования в способах согласно настоящему изобретению.

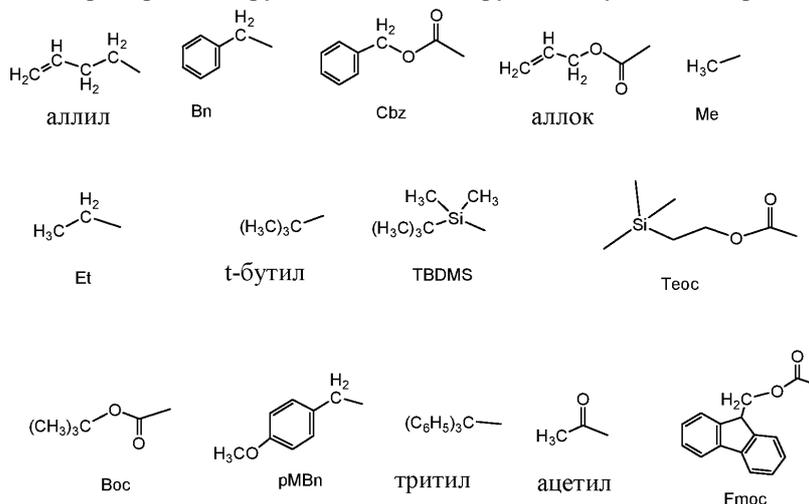
Термин "денатурирующий агент" или "денатурат", используемый в настоящем документе, определяется как любое соединение или материал, который будет вызывать обратимое разворачивание белка. Сила денатурирующего агента или денатурата будет определяться как свойствами, так и концентрацией конкретного денатурирующего агента или денатурата. Подходящими денатурирующими агентами или денатуратами могут быть хаотропы, детергенты, органические растворители, смешивающиеся с водой растворители, фосфолипиды или сочетание двух или более таких агентов. Подходящие хаотропы включают, но без ограничения, мочевины, гуанидин и тиоцианат натрия. Полезные детергенты могут включать, но без ограничения, сильные детергенты, такие как додецилсульфат натрия, или полиоксиэтиленовые эфиры (например, детергенты Tween или Triton), Sarkosyl, мягкие неионные детергенты (например, дигитонин), мягкие катионные детергенты, такие как N-2,3-(диолеокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний, мягкие ионные детергенты (например, холат натрия или дезоксихолат) или цвиттерионные детергенты, включая, но без ограничения, сульфобетаины (Zwittergent), 3-(3-хлорамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфат (CHAPS) и 3-(3-хлорамидопропил)диметиламмоний-2-гидрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO). В качестве денатурирующих агентов могут быть использованы органические смешивающиеся с водой растворители, такие как ацетонитрил, низшие спирты (особенно C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> спирты, такие как этанол или изопропанол), или низшие алкандиолы (особенно C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> алкандиолы, такие как этиленгликоль). Фосфолипиды, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой встречающиеся в природе фосфолипиды, такие как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол, или синтетические производные фосфолипидов или их варианты, такие как дигексаноилфосфатидилхолин или дигептаноилфосфатидилхолин.

"Рефолдинг", как используется в настоящем документе, описывает любой процесс, реакцию или способ, который преобразует полипептиды, содержащие дисульфидную связь, из неправильно уложенного или развернутого состояния в нативную или правильно уложенную конформацию по отношению к дисульфидным связям.

"Совместная укладка" в контексте настоящего описания относится, в частности, к процессам, реакциям или способам рефолдинга, в которых участвует по меньшей мере два полипептида, которые взаимодействуют друг с другом, и в результате преобразует развернутые или неправильно уложенные полипептиды в нативные, правильно уложенные полипептиды.

Термин "защищенный" относится к присутствию "защитной группы" или фрагмента, который предотвращает реакцию химически активной функциональной группы при определенных условиях реакции. Защитная группа будет варьироваться в зависимости от типа защищаемой химически активной группы. Например, если химически активной группой является амин или гидразид, защитная группа может быть выбрана из группы, состоящей из трет-бутилоксикарбонила (трет-Вос) и 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc). Если химически активной группой является тиол, защитной группой может представлять собой ортопиридилдисульфид. Если химически активной группой является карбоновая кислота, такая как бутановая или пропионовая кислота, или гидроксильная группа, защитной группой может представлять собой бензил или алкильную группу, такую как метил, этил или трет-бутил. Другие защитные группы, известные в данной области, могут быть также использованы или со способами и композициями, описанными в настоящем документе, в том числе фотолабильные группы, такие как Nvoc и MeNvoc. Другие защитные группы, известные в данной области, могут быть также использованы со способами и композициями, описанными в настоящем документе.

Только в качестве примера, блокирующие/защитные группы могут быть выбраны из:



Другие защитные группы описаны в книге Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Термины "нарушения сердечно-сосудистой системы" или "сердечно-сосудистые нарушения" включают, например, следующие нарушения: гипертензию (высокое кровяное давление), периферические и сердечные сосудистые нарушения, ишемическую болезнь сердца, стабильную и нестабильную стенокардию, сердечный приступ, недостаточность миокарда, нарушение сердечного ритма (или аритмию), стойкую ишемическую дисфункцию ("спящий миокард"), временную постишемическую дисфункцию ("оглушенный миокард"), сердечную недостаточность, нарушения периферического кровотока, острый коронарный синдром, сердечную недостаточность, сердечную мышечную болезнь (кардиомиопатию), инфаркт миокарда и сосудистые заболевания (заболевания кровеносных сосудов).

Термин "сердечная недостаточность" включает как острые, так и хронические проявления сердечной недостаточности, а также более специфические или связанные с ними виды заболеваний, такие как запущенная сердечная недостаточность, постострая сердечная недостаточность, кардиоренальный синдром, сердечная недостаточность с нарушением функции почек, хроническая сердечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность с фракцией среднего выброса (HFmEF), компенсированная сердечная недостаточность, декомпенсированная сердечная недостаточность, правосторонняя сердечная недостаточность, левая сердечная недостаточность, глобальная недостаточность, ишемическая кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия, сердечная недостаточность, связанная с врожденными пороками сердца, пороки клапанов сердца, сердечная недостаточность, связанная с пороками клапанов сердца, митральный стеноз, митральная недостаточность, аортальный стеноз, аортальная недостаточность, трикуспидальный стеноз, трикуспидальная недостаточность, легочный стеноз, недостаточность легочного клапана, сердечная недостаточность, связанная с сочетанными дефектами сердечного клапана, воспа-

ление миокарда (миокардит), хронический миокардит, острый миокардит, вирусный миокардит, диабетическая сердечная недостаточность, алкогольная кардиомиопатия, сердечная недостаточность, связанная с нарушениями накопления сердца, диастолическая сердечная недостаточность, систолическая сердечная недостаточность, острые фазы обострения сердечной недостаточности, сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HF<sub>r</sub>EF), сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса (HF<sub>r</sub>EF), хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса (HF<sub>r</sub>EF), хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HF<sub>r</sub>EF), постмиокардиальное ремоделирование, стенокардия, гипертензия, легочная гипертензия и легочная артериальная гипертензия.

Термин "фиброзные нарушения" охватывает заболевания и нарушения, характеризующиеся фиброзом, включая, среди прочего, следующие заболевания и нарушения: фиброз печени или гепатический фиброз, цирроз печени, NASH, легочный фиброз или фиброз легких, фиброз сердца, эндомикардиальный фиброз, нефропатию, гломерулонефрит, интерстициальный почечный фиброз, фиброзное повреждение, вызванное диабетом, фиброз костного мозга и подобные фиброзные расстройства, склеродермию, кольцевидную склеродермию, келоиды, гипертрофическое рубцевание (также после хирургических вмешательств), родимые пятна, диабетическую ретинопатию, пролиферативную витреоретинопатию и нарушения соединительной ткани (например, саркоидоз).

Термины "нарушение, связанное с релаксином" и "заболевание, связанное с релаксином", охватывают заболевания и нарушения, которые можно предупредить, лечить, облегчать или на которые можно воздействовать иным образом путем модулирования уровня релаксина в организме, например, повышения уровня белка релаксина в сыворотке. Ассоциированные с релаксином нарушения включают, но без ограничения, нарушения сердечно-сосудистой системы и фиброзные нарушения, описанные в настоящем документе.

Полипептид, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты, представленные в настоящем документе, может включать изотопно-меченые соединения с одним или несколькими атомами, замененными атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в настоящие соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F, <sup>36</sup>Cl, соответственно. Некоторые изотопно-меченые соединения, описанные в настоящем документе, например те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C, могут быть полезны в лекарственном средстве и/или субстрате для исследования распределения в тканях. Кроме того, замещение изотопами, такими как дейтерий, то есть <sup>2</sup>H, может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные их большей метаболической стабильностью, например, увеличение периода полувыведения *in vivo* или уменьшение необходимой дозы.

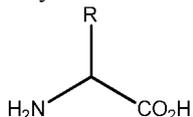
#### I. Введение

Модифицированные молекулы релаксина, связанные с РК-энхансером, представлены в описании. Иллюстративные варианты осуществления представлены, чтобы продемонстрировать по меньшей мере одно преимущественное свойство, выбранное из увеличения периода полувыведения *in vivo*, уменьшения образования почечных вакуолей, увеличения почечного кровотока, более высокой растворимости, уменьшения агрегации, более низкой вязкости, увеличения технологичности по сравнению с другими модифицированными полипептидами релаксина или полипептидами релаксина дикого типа.

В одном аспекте настоящее раскрытие обеспечивает модифицированный полипептид релаксина, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, при этом:

(a) модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в положении, выбранном из группы, состоящей из: остатка 1 А-цепи, остатка 2 А-цепи, остатка 5 А-цепи, остатка 13 А-цепи, остатка 18 А-цепи, остатка 5 В-цепи, остатка 7 В-цепи и остатка 25 В-цепи, и необязательно имеющий до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок и/или делеций в указанной А-цепи релаксина и/или в указанной В-цепи релаксина;

(b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота имеет структуру:



где группа R представляет собой любой заместитель, отличный от боковой цепи, обнаруженной в аланине, аргинине, аспарагине, аспарагиновой кислоте, цистеине, глутамине, глутаминовой кислоте, глицине, гистидине, изолейцине, лейцине, лизине, метионине, фенилаланине, пролине, серине, треонине, триптофане, тирозине или валине;

(c) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с фармакокинетическим энхансером, содержащим пептидный компонент, состоящий из 2-30 аминокислот, и фрагмент, удлиняющий период полувыведения.

В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать

последовательность SEQ ID NO: 4, замещенную указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 и необязательно имеющую до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок и/или делеций. Указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать последовательность SEQ ID NO: 4, замещенную указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 и необязательно имеющую одну дополнительную аминокислотную замену, вставку или делецию. Указанный полипептид В-цепи релаксина может содержать последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, необязательно имеющую до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок или делеций. Указанный полипептид В-цепи релаксина может содержать последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, необязательно имеющую одну дополнительную аминокислотную замену, вставку или делецию. Указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать последовательность SEQ ID NO: 4, замещенную указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1, и указанный полипептид В-цепи релаксина может содержать последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления указанная по меньшей мере одна не кодируемая в природных условиях аминокислота может содержать карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразиновую группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может содержать производное фенилаланина. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть выбрана из пара-замещенного, орто-замещенного или мета-замещенного фенилаланина. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть выбрана из пара-замещенного, орто-замещенного или мета-замещенного фенилаланина, содержащего карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразиновую группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может содержать пара-ацетил-L-фенилаланин. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть связана с указанным фармакокинетическим энхансером. Например, указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь или триазольную связь, например, оксимную связь.

В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 35, и указанный полипептид В-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и при этом указанная А-цепь или В-цепь релаксина необязательно может иметь до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок или делеций. Указанный модифицированный полипептид релаксина может содержать полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Указанный полипептид А-цепи релаксина может иметь по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35. Указанный полипептид В-цепи релаксина может иметь по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления указанный полипептид А-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина может содержать SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления указанный пептидный компонент может содержать от 1 до 25 аминокислот, например, от 2 до 20 аминокислот, от 3 до 10 аминокислот или от 4 до 8 аминокислот. Указанный пептидный компонент может содержать Glu, Glu<sup>γ</sup>, GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 103), RGGEKKKEKEK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 107), GETGSSGEGT-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 108), GGGKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 109), GSHHHHHGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 111), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 113), KKKSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 118), KKSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 114), KKSGGSGG-Glu $\alpha$  (SEQ ID NO: 115), KKSAGSAG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 116), KSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 117), KKSGGSGGEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 119), dKdKdKdKdK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 120), EESGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 121), GSGSGSGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 123), EEEGGG-dGlu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 128), EGGGSK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 130), EEEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 131), EEEEEPEEEEEPEEEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 133), EEEEEPEEEEEPEEGGG (SEQ ID NO: 135), EEEEGEEEEEEEEEEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 136), KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 137), EAQKAQAEQAQKAQAEA QKAQA-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 138), KK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 140), Glu<sup>γ</sup>, KGPKGP-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 146), SGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 147), KGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 148), KGGGSE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 149), GSPGSP-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 150), GGGGP-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 151), EGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 152), EGGGP-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 153), KGPGSE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 154), Spermine-Glu<sup>γ</sup> или KKGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 156).

Указанный пептидный компонент может содержать GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ

ID NO: 102), KKKKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 107), GGGKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 109), GSHHHHGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 113) или KSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 117).

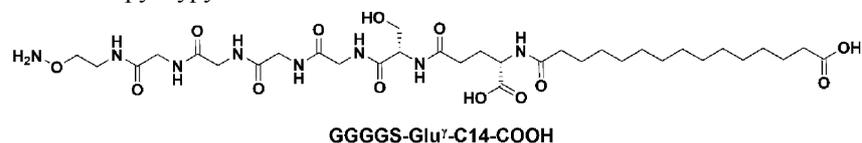
Указанный пептидный компонент может содержать Glu<sup>γ</sup>. Например, указанный пептидный компонент может содержать GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139).

В иллюстративных вариантах осуществления указанный модифицированный полипептид релаксина может содержать полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи, при этом указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером, и указанный фармакокинетический энхансер содержит пептидный компонент GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139). В некоторых вариантах осуществления пептидный компонент может быть ковалентно связан с указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой, например, через оксимовую связь.

В иллюстративных вариантах осуществления указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может содержать жирную кислоту или ее производное, при этом жирная кислота или ее производное может быть ковалентно связана с пептидным компонентом. Указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может содержать насыщенную жирную кислоту или ее производное. Указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может содержать жирную кислоту с концевыми группами карбоновой кислоты. Указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может содержать жирную кислоту Формулы I: -C<sub>n</sub>-COOH (Формула I), где n может составлять от 10 до 18, например, от 12 до 17, или 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления -C<sub>n</sub>- Формулы I может содержать первый карбонильный углерод и -(CH<sub>2</sub>)<sub>n-1</sub>-. Например, -C13- может представлять собой -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-; -C14- может представлять собой -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-; -C15- может представлять собой -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-. В некоторых вариантах осуществления первый карбонильный углерод жирной кислоты может быть связан с остатком (гамма) Glu, необязательно через амидную связь. В некоторых вариантах осуществления первый карбонильный углерод жирной кислоты может быть связан с остатком гамма-Glu через амидную связь.

В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может содержать -C14-COOH.

В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления указанный фармакокинетический усилитель может иметь структуру:



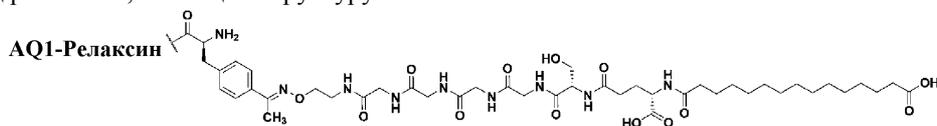
(Формула II),

где аминоксигруппа Формулы II связана с неприродной аминокислотой в указанном модифицированном полипептиде релаксина, например, через оксимную связь.

В других иллюстративных вариантах осуществления указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, может быть конъюгирован с указанным пептидным компонентом через амидную связь.

В других иллюстративных вариантах осуществления указанный полипептид релаксина может содержать полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи; при этом указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-ацетил-L-фенилаланин; при этом указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером, который содержит пептидный компонент, содержащий GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139); и фрагмент, удлиняющий период полувыведения, содержащий -C14-COOH, такой как -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-COOH.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает модифицированный полипептид релаксина, имеющий структуру:



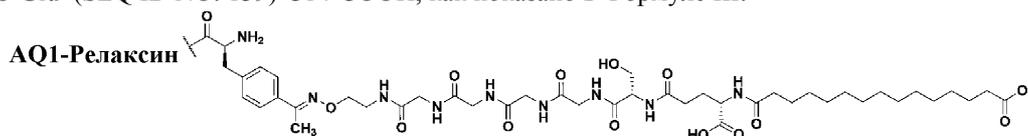
(Формула III),

где указанный AQ1-Релаксин содержит полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релак-

сина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, при этом пара-ацетил-L-фенилаланин, изображенный в Формуле III, расположен на N-конце указанного полипептида А-цепи релаксина. Указанный полипептид А-цепи релаксина может иметь по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35. Указанный полипептид В-цепи релаксина может иметь по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Указанный AQ1-Релаксин может содержать полипептид

А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 35 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает модифицированный полипептид релаксина, содержащий конъюгат релаксина "AQ1-GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH", который содержит полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 35 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 6, при этом пара-ацетил-L-фенилаланин, расположенный на N-конце указанного полипептида А-цепи релаксина, может быть связан с РК-энхансером GGGGS-Glu<sup>7</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, как показано в Формуле III:



(Формула III).

В следующем варианте осуществления модифицированный полипептид релаксина имеет структуру, показанную на фиг. 8.

В следующем варианте осуществления модифицированный полипептид релаксина имеет структуру, показанную на фиг. 9.

В иллюстративных вариантах осуществления указанный модифицированный полипептид релаксина может быть биологически активным. Указанный модифицированный полипептид релаксина может быть терапевтически эффективным для лечения одного или нескольких заболеваний или состояний, связанных с релаксином. Указанный модифицированный полипептид релаксина может проявлять уменьшенное образование почечной вакуоли по сравнению с соединением сравнения, таким как AQ1-20 кДа PEG (релаксин AQ1, конъюгированный с PEG, со средней молекулярной массой 20 кДа). Указанный модифицированный полипептид релаксина может демонстрировать отсутствие или уменьшенное нарушение почечной функции по сравнению с соединением сравнения, таким как AQ1-20 кДа PEG. Указанная функция почек может быть измерена путем определения одного или нескольких из расчетной скорости клубочковой фильтрации, клиренса креатина, скорости клубочковой фильтрации, связанной с инсулином, или изотопной скорости клубочковой фильтрации.

В иллюстративных вариантах осуществления указанный модифицированный полипептид релаксина не проявляет уменьшенного почечного кровотока и/или может быть способен увеличивать почечный кровоток после введения. Почечный кровоток может быть измерен путем определения клиренса парааминогиппурата.

Указанный модифицированный полипептид релаксина может проявлять увеличенный период полувыведения *in vivo*, например, увеличенный по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз или по меньшей мере в 50 раз по сравнению с соединением сравнения, таким как релаксин дикого типа.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество модифицированного полипептида релаксина, как описано в настоящем документе, для лечения или предупреждения нарушения, связанного с релаксином, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения заболевания, связанного с релаксином, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения сердечно-сосудистого заболевания, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом. Указанное сердечно-сосудистое заболевание может быть выбрано из ишемической болезни сердца, сердечного приступа, аритмии, сердечной недостаточности, кардиомиопатии и сосудистого заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, предупреждения или облегчения симптома сердечной недостаточности, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом. Указанная сердечная недостаточность может быть выбрана из прогрессирующей сердечной недостаточности, кардиоренального синдрома, сердечной недостаточности с нарушением функции почек, хронической сердечной недостаточности, хронической сердечной недостаточности с фракцией среднего выброса (HFmEF), острой сердечной недостаточности, постострой сердечной недостаточности, компенсированной сердечной недостаточности, декомпенсированной сердечной недостаточности, недостаточности правого желудочка, недостаточности левого желудочка, глобальной сердечной недостаточности, ишемической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, связанной с врожденными пороками сердца, сердечной недостаточности, связанной с дефектами сердечного клапана, сердечной недостаточности, связанной с сочетанными дефектами сердечного клапана, диабетической сердечной недостаточности, алкогольной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, связанной с нарушениями сердечной памяти, диастолической сердечной недостаточности, систолической сердечной недостаточности, ремоделирования после миокарда, сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFGrEF), стенокардии, гипертензии, легочной гипертензии и легочная артериальной гипертензии.

В некоторых вариантах осуществления указанная сердечная недостаточность может быть выбрана из хронической сердечной недостаточности, острой сердечной недостаточности, постострой сердечной недостаточности, хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFGrEF), хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), хронической сердечной недостаточности с фракцией выброса среднего диапазона (HFmEF), диастолической сердечной недостаточности, систолической сердечной недостаточности, ремоделирования после миокарда, стенокардии, гипертензии, легочной гипертензии и легочной артериальной гипертензии.

В некоторых вариантах осуществления указанная сердечная недостаточность может быть выбрана из постострой сердечной недостаточности, запущенной сердечной недостаточности, кардиоренального синдрома и сердечной недостаточности с нарушением функции почек.

Указанные способы лечения могут, кроме того, включать введение, в комбинации, одновременно или последовательно с указанным модифицированным полипептидом релаксина по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбранного из ингибиторов ингибиторов ACE,  $\beta$ -блокаторов, диуретиков, антагонистов минералокортикоидных рецепторов, модуляторов рианодинных рецепторов, активаторов SERCA2a, ингибиторов ренина, блокаторов кальциевых каналов, агонистов аденозиновых рецепторов A1, частичных агонистов аденозиновых рецепторов A1, ингибиторов дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, антагонистов рецептора ангиотензина II, антагонистов рецептора ангиотензина II со смещенным агонизмом по отношению к выбранным клеточным сигнальным путям, комбинаций антагонистов рецепторов ангиотензина II и ингибиторов фермента неприлизина, ингибиторов фермента неприлизина, активаторов растворимой гуанилатциклазы, активаторов АТФазы миозина, ингибиторов Rho-киназы 1, ингибиторов Rho-киназы 2, агонистов рецептора апелина, соединений, служащих донором нитроксила, ингибиторов кальций-зависимой киназы II, антифибротических агентов, ингибиторов галектина-3, антагонистов рецепторов вазопрессина, модуляторов FPR2 рецептора, агонистов рецептора натрийуретических пептидов, блокаторов каналов ваниллоида-4 с транзитным рецепторным потенциалом, антиаритмических средств, блокаторов канала  $I_f$  "funny current", нитратов, соединений наперстянки, инотропных агентов и агонистов  $\beta$ -рецепторов, средств для восстановления клеточных мембран, например, Полоксамера 188, антигиперлипидемических агентов, повышающих уровень HDL в плазме агентов, антигиперхолестеринемических агентов, ингибиторов биосинтеза холестерина (таких как ингибиторы HMG CoA редуктазы), агониста LXR, агониста FXR, пробукола, ралоксифена, никотиновой кислоты, ниацинамида, ингибиторов абсорбции холестерина, секвестрантов желчных кислот, анионообменных смол, четвертичных аминов, холестирамина, колестипола, индукторов рецепторов липопротеинов низкой плотности, клофибрата, фенофибрата, безафибрата, ципрофибрата, гемфибризола, витамина B6, витамина B12, антиоксидантных витаминов, агентов против диабета, ингибиторов агрегации тромбоцитов, антагонистов рецепторов фибриногена, аспирина и производных фибриновой кислоты, ингибиторов PCSK9, аспирина и ингибиторов P2Y12, таких как клопидогрел.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, предупреждения или облегчения симптома заболевания, связанного с фиброзом, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом. Указанное заболевание, связанное с фиброзом, может включать фиброз сердца, легких, почек, костного мозга или печени, дерматологический фиброз или фиброзное нарушение зрения. Указанное заболевание, связанное с фиброзом, может быть выбрано из фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза, прецирроза, диффузного паренхиматозного заболевания легких, кистозного фиброза,

легочного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, идиопатического легочного фиброза, инъекционного фиброза, почечного фиброза, хронического фиброза почек, диабетического заболевания почек, очагового сегментного гломерулосклероза, мембранной нефропатии, нефропатии IgA, миелофиброза, сердечной недостаточности, метаболической сердечной недостаточности, фиброза сердца, катаракты с фиброзом, катаракты, рубцов глаз, фиброза поджелудочной железы, фиброза кожи, кишечного фиброза, интестинального стеноза, эндомикардиального фиброза, атриального фиброза, медиастинального фиброза, болезни Крона, фиброза забрюшинного пространства, келоида, нефрогенного системного фиброза, склеродермии, системного склероза, артрофиброза, синдрома Пейрони, контрактуры Дюбойттрена, диабетической невропатии, адгезивного капсулита, алкогольной болезни печени, гепатостеатоза, вирусного гепатита, заболевания желчевыводящих путей, первичного гемохроматоза, связанного с лекарственными средствами цирроза, криптогенного цирроза, болезни Вильсона, недостаточности альфа-1-антитрипсина, интерстициальной болезни легких (ILD), фиброзного заболевания легких человека, дегенерации желтого пятна, ретинопатии сетчатки, витреальной ретинопатии, миокардиального фиброза, офтальмопатии Грейвса, вызванного лекарственными средствами эрготизма, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза, воспалительного заболевания кишечника и коллагенозного колита.

Указанный способ лечения заболевания, связанного с фиброзом, может, кроме того, включать введение в комбинации, одновременно или последовательно с указанным модифицированным полипептидом релаксина по меньшей мере одного антифибротического агента указанному пациенту. Указанный антифибротический агент может быть выбран из нинтеданиба, пирфенидона, антагонистов LPA1, антагонистов рецептора LPA1, аналогов GLP1, тралокинумаба (IL-13, AstraZeneca), висмодегиба (антагониста hedgehog, Roche), PRM-151 (пентраксин-2, TGF бета-1, Promedior), SAR-156597 (биспецифическое моноклональное антитело IL-4 и IL-13, Sanofi), симтузумаба (антитело к подобному лизилоксидазе 2 белку (анти-LOXL2), Gilead), CKD-942, PTL-202 (PDE ингибитор/пентоксифиллин/NAC контролируемое пероральное высвобождение, Pacific Then), омипализиб (пероральный ингибитор PI3K/mTOR, GSK), IW-001 (пероральный растворимый мод. бычьего коллагена типа V, ImmuneWorks), STX-100 (антагонист интегрина альфа V/beta-6, Stromedix/Biogen), Actimmune (IFN гамма), PC-SOD (мидизмаза; ингалируемый, LTT Bio-Pharma/CKD Pharm), лебрикизумаб (гуманизированное моноклональное антитело к IL-13 SC, Roche), AQX-1125 (активатор SHIP1, Aquinox), CC-539 (ингибитор JNK, Celgene), FG-3019 (FibroGen), SAR-100842 (Sanofi) и оботихолева кислота (OCA или INT-747, Intercept).

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения почечной недостаточности, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ улучшения, стабилизации или восстановления почечной функции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина или композиции, содержащей модифицированный полипептид релаксина, как описано в настоящем документе, указанному пациенту.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения модифицированного полипептида релаксина, как описано в настоящем документе, включающий: (а) обеспечение полипептида, содержащего А-цепь релаксина и В-цепь релаксина, при этом указанный полипептид содержит не кодируемую в природных условиях аминокислоту; и (b) связывание указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты с указанным фармакокинетическим энхансером. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть связана с указанным фармакокинетическим энхансером посредством оксимной связи, например такой, которая связывает указанную не кодируемую в природных условиях аминокислоту с пептидным компонентом фармакокинетического энхансера. Указанная оксимная связь может быть образована путем реакции карбонильной группы и аминоксигруппы. Указанная карбонильная группа может являться заместителем указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты, и указанная аминоксигруппа может являться составляющей указанного фармакокинетического энхансера. Указанная аминоксигруппа может являться заместителем указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты, и указанная карбонильная группа может являться составляющей указанного фармакокинетического энхансера, например, составляющей пептидного компонента указанного фармакокинетического энхансера. Указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота может быть рибосомально встроена в указанный полипептид.

II. Общие рекомбинантные нуклеиновые кислоты и способы применения с раскрытыми модифицированными полипептидами релаксина

В вариантах осуществления по настоящему изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющий интерес модифицированный полипептид релаксина, могут быть выделены, клонированы и часто изменены с использованием рекомбинантных способов. Такие варианты осуществления могут быть использованы, включая, но без ограничения, для экспрессии белка или в ходе создания вариантов, производных или других последовательностей, происходящих из модифицированного полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие модифицированные

полипептиды релаксина по настоящему изобретению, функционально связаны с гетерологичным промотором. В некоторых вариантах осуществления использование кодона ДНК в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих модифицированный полипептид релаксина, может быть оптимизировано для *E. coli* или экспрессии в клетках млекопитающего (например, CHO) с использованием методов, которые хорошо известны в данной области техники.

В настоящем документе обеспечены иллюстративные полинуклеотиды, кодирующие А-цепь релаксина (SEQ ID NO: 10), В-цепь релаксина (SEQ ID NO: 11), А- и В-цепи релаксина (SEQ ID NO: 12), и лидерные последовательности (SEQ ID NO: 13-14).

Нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, можно синтезировать на основе аминокислотной последовательности исходного полипептида, включая, но без ограничения, наличие аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4, 5, 6, 35, 36 или 37, и затем изменение нуклеотидной последовательности таким образом, чтобы обеспечить введение (т.е. встраивание или замену) или удаление (то есть делецию или замену) соответствующего аминокислотного остатка(ов). Нуклеотидная последовательность может быть легко модифицирована путем сайт-направленного мутагенеза в соответствии с общепринятыми способами. Альтернативно, нуклеотидная последовательность может быть получена путем химического синтеза, включая, но без ограничения, использование синтезатора олигонуклеотидов, где олигонуклеотиды конструируются на основе аминокислотной последовательности желаемого полипептида, и предпочтительно выбор тех кодонов, которые являются предпочтительными в клетке-хозяине, в которой должен продуцироваться рекомбинантный полипептид.

Кроме того, селекторный кодон, кодирующий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может быть включен в полинуклеотидную последовательность, как описано в настоящем документе далее.

Изобретение также относится к эукариотическим клеткам-хозяевам, неэукариотическим клеткам-хозяевам и организмам для встраивания *in vivo* неприродной аминокислоты через ортогональные пары tRNA/RS. Клетки-хозяева генетически сконструированы (в том числе, но без ограничения, трансформированы, трансдуцированы или трансфицированы) с помощью полинуклеотидов по настоящему раскрытию или конструкций, которые включают полинуклеотид по настоящему раскрытию, включая, но без ограничения, вектор по настоящему изобретению, который может представлять собой, например, вектор клонирования или вектор экспрессии. Например, кодирующие области для ортогональной tRNA, ортогональной tРНК-синтетазы и белка, подлежащего дериватизации, функционально связаны с элементами, контролирующими экспрессию генов, которые являются функциональными в желаемой клетке-хозяине. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, космиды, фага, бактерии, вируса, "голового" полинуклеотида или конъюгированного полинуклеотида. Векторы могут быть введены в клетки и/или микроорганизмы с помощью стандартных способов.

### III. Селекторные кодоны

Селекторные кодоны по настоящему изобретению расширяют рамки генетических кодонов механизма биосинтеза белка. Например, селекторный кодон включает, но без ограничения, уникальный кодон из трех оснований, нонсенс-кодон, такой как стоп-кодон, включая, но без ограничения, амбер-кодон (UAG), охра-кодон или опал-кодон (UGA), неприродный кодон, кодон из четырех или более оснований, редкий кодон или т.п. Специалистам в данной области техники очевидно, что многие из числа селекторных кодонов могут быть введены в целевой ген или полинуклеотид, включая, но без ограничения, один или более, два или более, три или более, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более в одном полинуклеотиде, кодирующем по меньшей мере часть модифицированного полипептида релаксина.

В одном варианте осуществления способы включают применение селекторного кодона, который является стоп-кодоном, для встраивания одной или более неприродных (т.е. не кодируемых в природных условиях) аминокислот *in vivo*. Например, получают О-тРНК, которая распознает стоп-кодон, включая, но без ограничения, UAG, и аминоацилируется О-РСазой желаемой неприродной аминокислотой. Эта О-тРНК не распознается природные аминоацил-тРНК синтетазой хозяина. Обычный сайт-направленный мутагенез может быть использован для введения стоп-кодона, включая, но без ограничения, TAG, в целевой сайт целевого полипептида. См., например, Sayers, J.R., et al. (1988), *Nucleic Acids Res*, 16:791-802. При объединении *in vivo* О-РС, О-тРНК и нуклеиновой кислоты, которая кодирует целевой полипептид, происходит встраивание неприродной аминокислоты в ответ на стоп-кодон UAG с образованием полипептида, содержащего неприродную аминокислоту в заданном положении.

Встраивание неприродных аминокислот *in vivo* может быть осуществлено без значительных нарушений эукариотической клетки-хозяина. Например, из-за эффективности супрессии кодона UAG, которая определяется конкуренцией между О-тРНК, включая, но без ограничения, тРНК, являющуюся супрессором амбер-кодона, и фактором высвобождения эукариот (включая, но без ограничения, eRF) (который связывается со стоп-кодоном и инициирует высвобождение растущего пептида из рибосомы), эффективность супрессии может быть модулирована, например, повышением уровня экспрессии О-тРНК и/или супрессорной тРНК.

Неприродные аминокислоты также могут кодироваться редкими кодонами. Например, оказалось,

что если концентрация аргинина в реакции синтеза белка *in vitro* уменьшена, редкий кодон аргинина, AGG, обеспечивает эффективное встраивание Ala синтетической тРНК, ацилированной аланином. См., например, Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). В этом случае синтетическая тРНК конкурирует с природной тРНКArg, которая существует как минорная разновидность в *Escherichia coli*.

Селекторные кодоны могут также включать расширенные кодоны, включая, но без ограничения, кодоны, содержащие четыре или более оснований, например, четыре, пять, шесть или более оснований. Примеры кодонов, состоящих из четырех оснований, включают, но без ограничения, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU и т.п. Примеры кодонов, состоящих из пяти оснований, включают, но без ограничения, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC и т.п.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении можно применять расширенные кодоны, основанные на редких кодонах или нонсенс-кодонах, что может уменьшить бессмысленные (миссенс) проскоки и супрессию сдвига рамки считывания на других нежелательных участках.

В данной системе селекторный кодон может также включать один из естественных трехосновных кодонов, в случае если эндогенная система не использует (или редко использует) природный базовый кодон. Например, это включает систему, в которой отсутствует тРНК, которая распознает природный трехосновный кодон, и/или систему, в которой трехосновный кодон является редким кодоном.

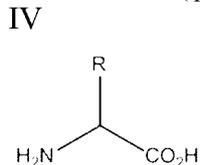
Гены, кодирующие представляющие интерес белки или полипептиды, такие как модифицированный полипептид релаксина, могут быть подвергнуты мутагенезу с использованием способов, известных специалисту в данной области и описанных здесь, с включением, например, одного или нескольких селекторных кодонов для встраивания неприродных аминокислот. Например, нуклеиновая кислота представляющего интерес белка может быть подвергнута мутагенезу с встраиванием одного или более селекторных кодонов, обеспечивающих встраивание одной или нескольких неприродных аминокислот. Изобретение включает любой такой вариант, в том числе, но без ограничения, мутантные варианты любого белка, например, в том числе содержащего по меньшей мере одну неприродную аминокислоту.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок, такой как модифицированный полипептид релаксина, могут быть легко подвергнуты мутации с введением цистеина в любое желаемое положение полипептида. Цистеин широко используется для введения реакционноспособных молекул, водорастворимых полимеров, белков или множества других молекул в представляющий интерес белок.

#### IV. Не кодируемые в природных условиях аминокислоты

Очень широкий спектр не кодируемых в природных условиях аминокислот пригодны для использования в настоящем изобретении. Любое количество не кодируемых в природных условиях аминокислот может быть введено в модифицированный полипептид релаксина. Обычно встраиваемые не кодируемые в природных условиях аминокислоты, по существу, химически инертны по отношению к 20 стандартным генетически кодируемым аминокислотам (например, аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают функциональные группы боковой цепи, которые эффективно и селективно реагируют с функциональными группами, не встречающимися в 20 обычных аминокислотах (включая, но без ограничения, азидную, кетонную, альдегидную и аминоксигруппы) с образованием стабильных конъюгатов. Например, модифицированный полипептид релаксина, который включает не кодируемую в природе аминокислоту, содержащую функциональные азидогруппы, может вступать в реакцию с полимером или удлинителем РК или, в альтернативном варианте, вторым полипептидом, содержащим алкиновую группу, с образованием стабильного конъюгата в результате селективной реакции азидной и алкиновой функциональных групп, приводящей к образованию продукта [3+2] циклоприсоединения Хуисгена.

Общая структура альфа-аминокислоты показана ниже (формула IV):



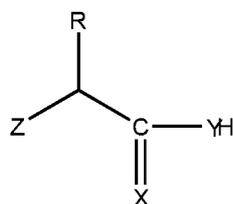
Не кодируемая в природных условиях аминокислота, как правило, имеет любую структуру, соответствующую приведенной выше формуле, где группа R представляет собой любой заместитель, отличный от встречающихся в двадцати природных аминокислотах, и могут быть пригодными для использования в модифицированных полипептидах релаксина по настоящему изобретению. Поскольку не кодируемые в природных условиях аминокислоты по настоящему изобретению обычно отличаются от природных аминокислот только структурой боковой цепи, не кодируемые в природных условиях аминокислоты образуют амидные связи с другими аминокислотами, включая, но без ограничения, природные или не кодируемые в природных условиях аминокислоты, так же, как они образуются в природных полипептидах. Тем не менее, не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют боковую цепь группы,

которая отличает их от природных аминокислот. Например, R необязательно содержит следующие группы алкил-, арил-, ацил-, кето-, азидо-, гидроксил-, гидразин, циано-, галогено-, гидразид, алкенил, алкинил, эфир, тиол, селено-, сульфонил-, борат, боронат, фосфо-, фосфоно-, фосфин, гетероциклическую, енон, имин, альдегид, сложный эфир, тиокислотную, гидроксилламин, аминогруппу или т.п. или любую их комбинацию.

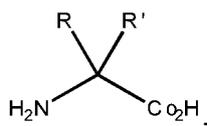
Иллюстративные не кодируемые в природных условиях аминокислоты, которые могут быть пригодными для использования в настоящем изобретении и которые являются полезными для реакции с удлинителями РК и полимерами, включают, но без ограничения, аминокислоты, содержащие карбонильные, аминокси, гидразин, гидразид, семикарбазид, азид и алкин реакционноспособные группы. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат сахаридную группу. Примеры таких аминокислот включают N-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, N-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, N-ацетил-L-глюкозаминил- L-аспарагин и O-маннозаминил-L-серин.

Многие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, приведенные в настоящем документе, коммерчески доступны, например, от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (подразделение EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) или Peptech (Burlington, MA, USA). Те, которые не являются коммерчески доступными, могут быть синтезированы, как это описано в настоящем документе, или с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области. Информацию о методах органического синтеза можно найти, например, в Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); and Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). См. также, патенты США 7045337 и 7083970, которые включены в настоящий документ путем ссылки. В дополнение к неприродным аминокислотам, которые содержат новые боковые цепи, неприродные аминокислоты, которые могут быть пригодными для использования в настоящем изобретении, также необязательно включают изменение структуры остова, включая, но без ограничения, как показано на структурах формулы V и VI:

V



VI



где Z обычно содержит OH, Nth, SH, NH-R' или S-R'; X и Y, которые могут быть одинаковыми или разными, обычно содержат S или O, и R и R', которые необязательно являются одинаковыми или различными, обычно выбраны из того же списка, который определяет группы R, описанные выше для неприродных аминокислот формулы I, а также водород. Например, неприродные аминокислоты по настоящему изобретению необязательно включают замену в amino- или карбоксильной группе, как показано в формулах V и VI. Неприродные аминокислоты этого типа включают, но без ограничения,  $\alpha$ -гидрокси кислоты,  $\alpha$ -тио кислоты,  $\alpha$ -амино тиокарбоксилаты, включая, но без ограничения, с боковыми цепями соответствующих обычных двадцати природных аминокислот или неприродными боковыми цепями. Кроме того, замены на  $\alpha$ -углероде необязательно включают, но без ограничения, L, D или  $\alpha$ - $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, такие как D-глутамат, D-аланин, D-метил-O-тирозин, аминокислотная кислота и т.п. Другие структурные альтернативы включают циклические аминокислоты, такие как аналоги пролина, а также 3-, 4-, 6-, 7-, 8- и 9-членные циклические аналоги пролина,  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислоты, такие как замещенные  $\beta$ -аланин и  $\gamma$ -аминоацетил-аминокислота.

Многие неприродные аминокислоты основаны на природных аминокислотах, таких как тирозин, глутамин, фенилаланин и т.п., и являются подходящими для использования в настоящем изобретении. Аналоги тирозина включают, но без ограничения, пара-замещенные тирозины, орто-замещенные тирозины и мета-замещенные тирозины, где замещенный тирозин содержит, включая, но без ограничения, кето-группу (включая, но без ограничения, ацетильную группу), бензоильную группу, аминогруппу, гидразин, гидроксилламин, тиольную группу, карбоксильную группу, изопропильную группу, метильную группу, C<sub>6</sub>-

C<sub>20</sub> линейную или разветвленную углеводородную цепь, насыщенный или ненасыщенный углеводород, O-метильную группу, полиэфирную группу, нитрогруппу, алкильную группу или т.п. Кроме того, также предусмотрены многократно замещенные арильные кольца. Аналоги глутамина, которые могут быть пригодными для использования в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, α-гидроксипроизводные, γ-замещенные производные, циклические производные и амидные производные замещенного глутамина. Иллюстративные аналоги фенилаланина, которые могут быть пригодными для использования в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, пара-замещенные фенилаланины, орто-замещенные фенилаланины и мета-замещенные фенилаланины, при этом заместитель содержит, включая, но без ограничения, гидроксигруппу, метоксигруппу, метильную группу, аллильную группу, альдегид, азидо, йодо, бром, кетогруппу (включая, но без ограничения, ацетильную группу), бензоильную, алкильную группу или т.п. Конкретные примеры неприродных аминокислот, которые могут быть подходящими для использования в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, p-ацетил-L-фенилаланин, O-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метил-фенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAcβ-серин, L-Dopa, фторированный фенилаланин, изо-пропил-L-фенилаланин, p-азидо-L-фенилаланин, p-ацил-L-фенилаланин, p-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфонотиозин, p-иодфенилаланин, p-бромфенилаланин, p-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин и p-пропаргилокси-фенилаланин и т.п.

В одном варианте осуществления обеспечены композиции модифицированного полипептида релаксина, содержащие неприродную аминокислоту (такую как p-ацетил-L-фенилаланин). Также, обеспечены различные композиции, содержащие p-ацетил-L-фенилаланин и, включая, но без ограничения, белки и/или клетки. В одном аспекте композиция, которая включает неприродную аминокислоту p-ацетил-L-фенилаланин, кроме того, включает ортогональную tРНК. Неприродная аминокислота может быть связана (включая, но без ограничения, ковалентно) с ортогональной tРНК, в том числе, но без ограничения, ковалентно связана с ортогональной tРНК аминокислотной связью, ковалентно связаны с 3'ОН или 2'ОН в сахаре концевой рибозы ортогональной tРНК и т.д.

Модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, может содержать не кодируемую в природных условиях аминокислоту, описанную в патенте США № 8735539, озаглавленном "Полипептиды релаксина, содержащие не кодируемые в природе аминокислоты", который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

#### V. Структура и синтез неприродных аминокислот

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает модифицированный полипептид релаксина, связанный с РК-экстендером, например, содержащим жирную кислоту, с помощью оксимной связи или связывания. Многие типы не кодируемых в природных условиях аминокислот являются пригодными для образования оксимных связей. Они включают, но без ограничения, не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие карбонильную, дикарбонильную, карбонил-подобную, маскированную карбонильную, защищенную карбонильную или гидроксиламиновую группу. Такие аминокислоты, их структура и синтез описаны в патентах США 8012931 и 8735539, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Иллюстративные структуры и способы синтеза не кодируемых в природных условиях аминокислот, включая гидроксиламиносодержащие аминокислоты, известные в данной области, например, как раскрыто в патенте США 7332571, патентных публикациях США 2006/0194256, 2006/0217532 и 2006/0217289 и WO 2006/069246, каждая из которых включена полностью.

Химический синтез не кодируемых в природных условиях аминокислот.

Многие неприродные аминокислоты, пригодные для использования в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными, например, от Sigma (USA) или Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Те, которые не являются коммерчески доступными, могут быть синтезированы, как это описано в настоящем документе или, как это описано в различных публикациях, или с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области.

#### A. Карбонильные реакционноспособные группы.

Аминокислоты с карбонильной реакционноспособной группой подходят для различных реакций по соединению молекул (включая, но без ограничения, PEG или другие водорастворимые молекулы, такие как пептидные компоненты) с помощью нуклеофильного присоединения или реакций альдольной конденсации, а также других.

Синтез p-ацетил- (+/-)-фенилаланина и m-ацетил- (+/-)-фенилаланина описан в Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Другие карбонилсодержащие аминокислоты могут быть получены аналогичным образом специалистом в данной области.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид релаксина, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может быть химически модифицирован с образованием реакционноспособной карбонильной функциональной группы. Например, альдегидная функциональная группа, полезная для реакций конъюгации, может быть получена из функциональных групп, содер-

жащих соседние amino- и гидроксильные группы.

В настоящем изобретении, не кодируемая в природных условиях аминокислота, несущая соседние гидроксильные и аминогруппы, может быть встроена в полипептид в качестве "маскированной" альдегидной функциональной группы. Например, 5-гидроксилизин несет гидроксильную группу, смежную с эпсилон-амином. Условия реакции для формирования альдегида обычно включают добавление молярного избытка метапериодата натрия в мягких условиях, чтобы избежать окисления на других сайтах в полипептиде. Значение pH реакции окисления обычно составляет около 7,0. Типичная реакция включает добавление примерно 1,5 молярного избытка метапериодата натрия к буферному раствору полипептида с последующей инкубацией в течение примерно 10 минут в темноте. См., например, патент США 6433685, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Карбонильные функциональные группы могут селективно взаимодействовать с гидразин-, гидразид-, гидроксиламин- или семикарбазидсодержащим реагентом в мягких условиях в водном растворе с образованием соответствующих гидразоновых, оксимных или семикарбазоновых связей соответственно, которые являются стабильными в физиологических условиях. См., например, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной группы обеспечивает возможность селективной модификации в присутствии других боковых цепей аминокислот. См., например, Cornish, V. W., et al, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroth, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997).

В. Гидразиновые, гидразидные или семикарбазидные реакционноспособные группы.

Не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие нуклеофильную группу, такую как гидразин, гидразид или семикарбазид, подходят для взаимодействия с различными электрофильными группами с образованием конъюгатов.

Гидразид-, гидразин- и семикарбазидсодержащие аминокислоты доступны от коммерческих источников. Например, L-глутамат- $\gamma$ -гидразид доступен от Sigma Chemical (St. Louis, MO). Другие аминокислоты, не доступные коммерчески, могут быть получены специалистом в данной области. См., например, патент США 6281211, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные полипептиды релаксина, содержащие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, которые несут гидразидные, гидразиновые или семикарбазидные функциональные группы, могут эффективно и избирательно взаимодействовать с различными молекулами, которые содержат альдегидные или другие функциональные группы с аналогичной химической реакционной способностью. См., например, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Уникальная реакционная способность гидразидных, гидразиновых и семикарбазидных функциональных групп делает их значительно более реакционноспособными в отношении альдегидов, кетонов и других электрофильных групп по сравнению с нуклеофильными группами, присутствующими в 20 обычных аминокислотах (включая, но без ограничения, гидроксильную группу серина или треонина или аминогруппы лизина и N-конец).

С. Аминооксисодержащие аминокислоты.

Не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие аминооксигруппу (также называемую гидроксиламин), можно применять в реакциях с различными электрофильными группами с образованием конъюгатов (включая, но без ограничения, с PEG или пептидными компонентами). Аналогично гидразинам, гидразидам и семикарбазидам, повышенная нуклеофильность аминооксигруппы позволяет ей эффективно и селективно реагировать с различными молекулами, содержащими альдегиды или другие функциональные группы со сходной химической реакционной способностью. См, например, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001). В то время как результатом реакции с гидразиновой группой является соответствующий гидразон, оксим образуется обычно в результате реакции аминооксигруппы с карбонилсодержащей группой, такой как кетон.

Аминооксисодержащие аминокислоты могут быть получены из легкодоступных предшественников аминокислот (гомосерин, серии и треонин). См., например, M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003). Некоторые аминооксисодержащие аминокислоты, такие как L-2-амино-4-(аминоокси)масляная кислота, были выделены из природных источников (Rosenthal, G., *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997)). Другие аминооксисодержащие аминокислоты могут быть получены специалистом в данной области.

Д. Азидные и алкиновые реакционноспособные группы.

Уникальная реакционная способность азидных и алкиновых функциональных групп делает их полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул. Органические азиды, в частности, альфатические азиды и алкины, обычно стабильны в обычных условиях химических реакций. В частности, как азидные, так и алкиновые функциональные группы являются инертными по отношению к боковым цепям (т.е. R-группы) 20 обычных аминокислот, встречающихся в природных полипептидах. Однако, если они находятся в непосредственной близости, проявляется "подпружиненный" характер азидных и алкиновых групп, и они селективно и эффективно реагируют по механизму

реакции циклоприсоединения Гуисгена [3+2] с образованием соответствующего триазола. См., например, Chin J, et al., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

Поскольку реакция циклоприсоединения Гуисгена включает реакцию селективного циклоприсоединения (см., например, Padwa, A., in *COMPREHENSIVE Organic Synthesis*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176), а не нуклеофильного замещения, включение не кодируемых в природных условиях аминокислот, несущих азид- и алкинсодержащие боковые цепи, позволяет получить полипептиды, которые селективно модифицированы в положении не кодируемой в природных условиях аминокислоты. Реакция циклоприсоединения с участием азид- или алкинсодержащего модифицированного полипептида релаксина может быть проведена при комнатной температуре в водной среде путем добавления Cu(II) (включая, но без ограничения, в форме каталитического количества CuSO<sub>4</sub>) в присутствии восстановителя для восстановления Cu(II) до Cu(I) *in situ* в каталитическом количестве. См., например, Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., et al., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Иллюстративные восстанавливающие агенты включают, но без ограничения, аскорбат, металлическую медь, хинин, гидрохинон, витамин К, глутатион, цистеин, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, и приложение электрического потенциала.

В некоторых случаях, когда желательна реакция [3+2] циклоприсоединения Гуисгена между азидом и алкином, модифицированный полипептид релаксина может содержать не кодируемую в природных условиях аминокислоту, содержащую алкиновую группу, и присоединяемый к аминокислоте РК-энхансер может содержать азидный фрагмент. Альтернативно, также может быть проведена обратная реакция (то есть с азидным фрагментом на аминокислоте и алкиновым фрагментом, присутствующим на водорастворимом полимере).

Азидная функциональная группа может также селективно взаимодействовать с водорастворимым полимером, содержащим ариловый эфир, и соответствующим образом функционализированный арилфосфиновой группой с образованием амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и полученный амин затем эффективно реагирует с проксимальной сложноэфирной связью с образованием соответствующего амида. См., например, E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). Азидсодержащая аминокислота может быть алкилазидом (включая, но без ограничения, 2-амино-6-азидо-1-гексановую кислоту) или арилазидом (p-азидофенилаланин).

Азидная функциональная группа может также селективно взаимодействовать с водорастворимым полимером, содержащим тиоэфир, и соответствующим образом функционализированным группой арилфосфина, с образованием амидной связи. Группа арилфосфина восстанавливает азид *in situ*, и образованный амин затем эффективно реагирует с тиоэфирной связью с образованием соответствующего амида.

Алкинсодержащие аминокислоты являются коммерчески доступными. Альтернативно, алкинсодержащие аминокислоты могут быть получены в соответствии со стандартными способами. Например, p-пропаргилоксифенилаланин может быть синтезирован, например, как описано в Deiters, A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783 (2003), и 4-алкинил-L-фенилаланин может быть синтезирован, как описано в Kayser, V., et al., *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997). Другие алкинсодержащие аминокислоты могут быть получены специалистом в данной области.

Азидсодержащие аминокислоты доступны от коммерческих источников. Для тех азидсодержащих аминокислот, которые не являются коммерчески доступными, азидная группа может быть сравнительно легко получена с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области, включая, но без ограничения, путем вытеснения подходящей уходящей группы (включая, но без ограничения, галогенид, мезилат, тозилат) или через открытие надлежащим образом защищенного лактона. См., например, *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Молекула, которая может быть добавлена к белку согласно изобретению посредством [3+2]-циклоприсоединения, включает практически любую молекулу с азидным или алкинильным производным. Молекулы включают, но без ограничения, красители, флуорофоры, сшивающие агенты, сахаридные производные, полимеры (включая, но без ограничения, полимеры, содержащие полиэтиленгликоль), фотокросслинкеры, цитотоксические соединения, метки аффинности, производные биотина, смолы, шарики, пептид, второй белок или полипептид (или более), полинуклеотид(ы) (включая, но без ограничения, ДНК, РНК и т.д.), хелаторы металлов, кофакторы, жирные кислоты, углеводы и т.п. Эти молекулы могут быть присоединены к неприродной аминокислоте с алкинильной группой, включая, но без ограничения, p-пропаргилоксифенилаланин или азидогруппу, включая, но без ограничения, p-азидофенилаланин, соответственно.

Е. Аминотиольные реакционноспособные группы.

Уникальная реакционная способность бета-замещенных аминотиольных функциональных групп делает их полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул, которые содержат альдегидные группы, посредством образования тиазолидина. См., например, J. Shao and J. Tarn, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. В некоторых вариантах осуществления бета-замещенные аминотиольные аминокислоты могут быть включены в модифицированные полипептиды

релаксина и затем использованы в реакции с РК-энхансером, содержащим альдегидную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления РК-энхансер, лекарственный конъюгат или другая нагрузка могут быть связаны с модифицированным полипептидом релаксина, содержащим бета-замещенную аминотиольную аминокислоту, через образование тиазолидина.

Г. Дополнительные реакционноспособные группы.

Дополнительные реакционноспособные группы и не кодируемые в природных условиях аминокислоты, которые могут быть включены в модифицированные полипептиды релаксина согласно изобретению, описаны в следующих патентных заявках, которые включены в настоящее описание путем ссылки во всей своей полноте: патентная публикация США 2006/0194256, патентная публикация США 2006/0217532, патентная публикация США 2006/0217289 и международная патентная заявка WO / 2007/070659.

VI. Получение *in vivo* модифицированных полипептидов релаксина, содержащих не кодируемые в природных условиях аминокислоты

Модифицированные полипептиды релаксина по изобретению могут быть созданы *in vivo*, используя модифицированные тРНК и тРНК синтетазы для добавления к аминокислотам или для замещения аминокислотами, которые не кодированы в природных системах. Такие способы описаны в патенте США № 8735539, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Способы получения тРНК и тРНК синтетаз, которые используют аминокислоты, которые не кодируются в природных системах, описаны, например, в патентах США 7045337 и 7083970, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Эти способы включают создание трансляционного механизма, который функционирует независимо от синтетаз и тРНК эндогенных в отношении трансляционной системы (и поэтому иногда называемых "ортогональными"). Как правило, трансляционная система включает ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоацил-тРНК-синтетазу (О-RS). Обычно О-RS преимущественно аминоацилируют О-тРНК, содержащую по меньшей мере одну не встречающуюся в природе аминокислоту в трансляционной системе, и О-тРНК распознает по меньшей мере один селекторный кодон, который не распознают другие тРНК в системе. Таким образом, трансляционная система встраивает не кодируемую в природных условиях аминокислоту в белок, продуцируемый в системе, в ответ на кодируемый селекторный кодон, тем самым "замещая" аминокислоту в положении в кодированном полипептиде.

Использование О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетаз включает отбор специфического кодона, который кодирует не кодируемую в природных условиях аминокислоту. Хотя можно использовать любой кодон, обычно желательно выбирать такой кодон, который редко или никогда не используется в клетке, в которых экспрессируется О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетазы. Например, примеры кодонов включают нонсенс-кодона, такие как стоп-кодона (амбер-кодон, охра-кодон и опал-кодон), кодона с четырьмя или более основаниями и другие природные трехосновные кодона, которые редко используются или вовсе не используются.

Специфический селекторный кодон(ы) может быть встроен в соответствующие положения в модифицированной последовательности, кодирующей полинуклеотидный релаксин, используя методы мутагенеза, известные в данной области (включая, но без ограничения, сайт-специфический мутагенез, касетный мутагенез, рестрикционно-селекционный мутагенез и т.д.).

VII. Экспрессия в не эукариотах и эукариотах

Системы экспрессии, культура и выделение.

Немодифицированные или модифицированные полипептиды релаксина могут быть экспрессированы в любом количестве подходящих систем экспрессии, включая, например, дрожжи, клетки насекомых (например, инфицированные бакуловирусом клетки насекомых), клетки млекопитающих и бактерии. Описание примеров систем выражения приводится ниже.

Дрожжи. Используемый в настоящем документе термин "дрожжи" включает любые из различных дрожжей, способных экспрессировать ген, кодирующий модифицированный полипептид релаксина, включая, но без ограничения, *P. pastoris*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. Maltosa* и *H. polymorpha*. В WO 2005/091944, который включен в настоящий документ путем ссылки, описана экспрессия релаксина в дрожжах.

*E. Coli*, виды *Pseudomonas* и другие прокариоты.

Термин "бактериальный хозяин" или "бактериальная клетка-хозяин" относится к бактериальной клетке, которая может быть использована или уже была использована в качестве реципиента рекомбинантных векторов или других переносчиков ДНК. Термин включает потомство исходной бактериальной клетки-хозяина, которая была трансфицирована. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентично по морфологии или по геномному или полному хромосомному набору ДНК в сравнении с оригинальной родительской клеткой из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомок родительской клетки, который достаточно похож на родительскую клетку, характеризующуюся соответствующими особенностями, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей немодифицированный или модифицированный полипептид релакси-

на, включены в термин "потомок".

При выборе бактериальных хозяев для экспрессии, подходящие хозяева могут включать хозяев, которые, как было показано, обладают, наряду с другими, хорошей способностью к формированию телец включения, низкой протеолитической активностью и общей устойчивостью. Для промышленной/фармацевтической ферментации обычно используют бактериальные штаммы, полученные из штаммов K (например, W3110), или бактерий, полученных из штаммов B (например, BL21). Другие примеры подходящих хозяев *E.coli* включают, но без ограничения, штаммы BL21, DH10B или их производные. В другом варианте осуществления способов согласно настоящему изобретению хозяин *E.coli* является штаммом, не содержащим протеазы, включая, но без ограничения, OMP- и LON-. Штамм клетки-хозяина может быть одним из видов *Pseudomonas*, включая, но без ограничения, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*. Известно, что *Pseudomonas fluorescens biovar 1*, обозначенный как штамм MB101, является пригодным для рекомбинантного производства и доступен для процессов производства белков для терапевтических целей.

После того как рекомбинантный штамм клетки-хозяина (т.е. экспрессионная конструкция введена в клетку-хозяина и клетки-хозяева с соответствующей экспрессионной конструкцией выделены), рекомбинантный штамм клетки-хозяина культивируют в условиях, подходящих для получения модифицированных полипептидов релаксина.

Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать в периодическом или непрерывном формате, либо с отбором клеток (в случае, когда модифицированный полипептид релаксина накапливается внутриклеточно), или с отбором супернатанта культуры в периодическом или непрерывном формате.

Модифицированные полипептиды релаксина, полученные в бактериальных клетках-хозяевах, могут быть плохо растворимыми или нерастворимыми (в виде телец включения). В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислотные замены могут быть легко сделаны в модифицированном полипептиде релаксина, которые выбираются с целью увеличения растворимости рекомбинантно продуцируемого белка. Модифицированный полипептид релаксина может быть растворен, например, с использованием мочевины или гидрохлорида гуанидина.

В случае растворимого модифицированного белка релаксина релаксин может секретироваться в периплазматическое пространство или в культуральную среду. Например, модифицированный релаксин секретировали в периплазматическое пространство клеток W3110-B2 путем использования плазмидных кодирующих конструкций, включающих восемь различных лидерных последовательностей, включая последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-44, и их трансформации в клетки W3110-B2, затем клетки выращивали при 37°C до тех пор, пока значение OD не достигло приблизительно 0,8, после чего экспрессию индуцировали 0,01% арабинозой. Через пять часов образцы периплазматического высвобождения получали из культур. Кроме того, растворимый модифицированный релаксин может присутствовать в цитоплазме клеток-хозяев. Может быть желательно концентрировать растворимый модифицированный релаксин перед выполнением стадий очистки.

Когда модифицированный полипептид релаксина продуцируется в виде белка слияния, присоединенная последовательность может быть удалена. Удаление присоединенной последовательности может быть достигнуто путем ферментативного или химического расщепления. Ферментативное удаление присоединенных последовательностей может быть осуществлено с использованием способов, известных специалистам в данной области. Выбор фермента для удаления присоединенной последовательности будет определяться типом конъюгата, и условия реакции будут определяться выбором фермента, как будет очевидно специалисту в данной области. Химическое расщепление может быть осуществлено с использованием реагентов, известных специалистам в данной области, включая, но без ограничения, цианогенбромид, TEV-протеазу и другие реагенты. Расщепленный модифицированный полипептид релаксина может быть очищен от отщепляемой последовательности слияния способами, известными специалистам в данной области.

В общем, иногда бывает желательно денатурировать и восстановить экспрессированные полипептиды, а затем вызвать процесс сворачивания полипептидов в предпочтительную конформацию. Например, гуанидин, мочевины, DTT, DTE и/или шаперонин можно добавлять к представляющему интерес продукт трансляции. Белки могут быть повторно упакованы в окислительно-восстановительном буфере, содержащем, включая, но без ограничения, окисленный глутатион и L-аргинин. Реагенты рефолдинга в потоке или каким-либо другим образом вступают в контакт с одним или несколькими из полипептидов или других продуктов экспрессии, или наоборот.

В случае прокариотного продуцирования модифицированного полипептида релаксина, полученный таким образом модифицированный полипептид релаксина может быть неправильно упакован и, таким образом, может утратить биологическую активность или может обладать пониженной биологической активностью. Биологическая активность белка может быть восстановлена путем "рефолдинга". Как правило, неправильно свернутый немодифицированный или модифицированный полипептид релаксина подвергают рефолдингу путем солюбилизации (когда модифицированный полипептид релаксина также нерастворим), разворачиванию и восстановлению полипептидной цепи, используя, например, один или несколько хаотропных агентов (например, мочевины и/или гуанидин) и восстанавливающий агент, спо-

способный восстанавливать дисульфидные связи (например, дитиотреитол, ДТТ или 2-меркаптоэтанол, 2-МЕ). При умеренной концентрации хаотропного агента затем добавляют окисляющий агент (например, кислород, цистин или цистамин), которые позволяют реформировать дисульфидные связи. Можно заново упаковать полипептид релаксина, используя стандартные способы, известные в данной области, такие как способы, описанные в патентах США 4511502, 4511503 и 4512922, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Модифицированный полипептид релаксина может быть также упакован с другими белками с образованием гетеродимеров или гетеромультимеров.

После рефолдинга модифицированный релаксин может быть дополнительно очищен. Очистку модифицированного релаксина можно осуществить, используя различные методики, известные специалистам в данной области, включая хроматографию гидрофобных взаимодействий, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой, аффинную хроматографию и т.п. или любую их комбинацию. Дополнительная очистка может также включать стадию сушки или осаждения очищенного белка.

После очистки модифицированный релаксин можно обменять в различных буферах и/или сконцентрировать любым из различных способов, известных в данной области, включая, но без ограничения, диализ, ультрафильтрацию и диализ. Модифицированный релаксин, который представлен в виде отдельного очищенного белка, можно подвергнуть агрегации и осаждению.

Очищенный модифицированный релаксин может иметь степень чистоты по меньшей мере 90% (по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, RP-HPLC, или электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, SDS-PAGE), или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% или более. Независимо от точного численного значения степени чистоты модифицированного релаксина, модифицированный релаксин является достаточно чистым для использования в качестве фармацевтического продукта или для последующей обработки, такой как конъюгирование с РК-энхансером.

Некоторые молекулы модифицированного релаксина можно использовать в качестве терапевтических агентов в отсутствие других активных ингредиентов или белков (других нежели эксципиенты, носители и стабилизаторы, сывороточный альбумин и т.п.) или они могут образовывать комплекс с другим белком или полимером.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выход модифицированного релаксина после каждой стадии очистки может составлять по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере, около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,9% или по меньшей мере около 99,99% немодифицированного или модифицированного релаксина в исходном материале для каждой стадии очистки.

#### VIII. Экспрессия в альтернативных системах

Модифицированные полипептиды релаксина по настоящему изобретению могут быть экспрессированы с использованием бесклеточной (например, *in vitro*) системы трансляции. Системы трансляции могут быть клеточными или бесклеточными и могут быть прокариотическими или эукариотическими. Клеточные системы трансляции включают, но без ограничения, препараты цельных клеток, такие как пермеабиллизированные клетки или клеточные культуры, в которых желаемая последовательность нуклеиновых кислот может быть транскрибирована в мРНК и мРНК транслирована. Бесклеточные трансляционные системы коммерчески доступны, и многие различные типы систем хорошо известны. Примеры бесклеточных систем включают, но без ограничения, прокариотические лизаты, такие как лизаты *Escherichia coli*, и эукариотические лизаты, такие как экстракты зародышей пшеницы, клеточные лизаты насекомых, лизаты ретикулоцитов кролика, лизаты ооцитов кролика и лизаты клеток человека. Также доступны мембранные экстракты, такие как экстракты поджелудочной железы собаки, содержащие микросомальные мембраны, которые можно использовать для трансляции секреторных белков.

#### IX. Белки слияния, содержащие модифицированные полипептиды релаксина

Настоящее изобретение также обеспечивает модифицированные полипептиды релаксина или их фрагменты, содержащие последовательность модифицированного полипептида релаксина и партнер по слиянию. Партнер по слиянию может наделять функциональным свойством, включая, но без ограничения, увеличение периода полувыведения, содействие очистке и/или получению белка, улучшенные биофизические свойства, такие как повышение растворимости или стабильности и снижение иммуногенности или токсичности, или любая другая цель. Например, слитый белок может демонстрировать увеличенный период полувыведения *in vivo*, тем самым содействуя менее частому дозированию (например, дозирование два раза в неделю, один раз в неделю или один раз в две недели и т.д.) в терапевтическом режиме. Типичные белки слияния содержат модифицированный релаксин, слитый с партнером по слиянию, таким как альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин), удлиняющий РК (РКЕ)

аднектин, XTEN, домен Fc, константная область иммуноглобулина или фрагмент любого из вышеуказанного, или комбинация любого из вышеуказанного. Белок слияния может быть получен путем экспрессии нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность модифицированного полипептида релаксина и последовательность партнера по слиянию в одной и той же рамке считывания, необязательно разделенные последовательностью, кодирующей соединяющий пептид. Белок слияния может содержать модифицированный полипептид релаксина и партнер по слиянию в любом порядке, например, один или несколько партнеров по слиянию соединены с N-концом и/или C-концом последовательности модифицированного полипептида релаксина, или один или несколько партнеров по слиянию соединены как с N-концом, так и с C-концом.

#### X. Гликозилирование модифицированных и немодифицированных полипептидов релаксина

Настоящее изобретение включает модифицированные полипептиды релаксина, содержащие одну или несколько не кодируемых в природных условиях аминокислот, содержащих сахаридные остатки. Сахаридные остатки могут быть либо природными (включая, но без ограничения, N-ацетилглюкозамин), либо неприродными (включая, но без ограничения, 3-фторгалактозу). Сахариды могут быть связаны с не кодируемыми в природных условиях аминокислотами посредством N- или O-связанной гликозидной связи (включая, но без ограничения, N-ацетилгалактоза-L-серин), либо неприродной связи (включая, но без ограничения, оксим или соответствующий C- или S-связанный гликозид).

Сахаридные (включая, но без ограничения, гликозил) фрагменты могут быть добавлены к модифицированным полипептидам релаксина либо *in vivo*, либо *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид релаксина, содержащий карбонилсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может быть модифицирован сахаридом, дериватизированным аминооксигруппой, с образованием соответствующего гликозилированного полипептида, связанного через оксимную связь. После присоединения к не кодируемой в природных условиях аминокислоте сахарид может быть дополнительно обработан гликозилтрансферазами и другими ферментами для получения олигосахарида, связанного с модифицированным полипептидом релаксина. См., например, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

#### XI. Введение и фармацевтические композиции

Также, в настоящем документе предлагаются композиции, содержащие терапевтически эффективное количество модифицированного полипептида релаксина, описанного в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Такой носитель или вспомогательное вещество включает, но без ограничения, солевой раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, сахарозу, гистидин, воду, глицерин, PS80 (полисорбат 80), этанол и/или их комбинации. Лекарственную форму изготавливают таким образом, чтобы она соответствовала способу введения.

Например, описанный в настоящем документе модифицированный полипептид релаксина может быть введен пациенту в концентрации примерно от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента-реципиента. В одном варианте осуществления модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, можно вводить пациенту в концентрации примерно 0,5-5 мг/кг массы тела пациента-реципиента. В другом варианте осуществления модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, может вводить пациенту-реципиенту с частотой от одного раза в сутки до одного раза в две недели, три недели или четыре недели, такой как, например, один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней или один раз каждые шесть дней. В другом варианте осуществления модифицированный полипептид релаксина, описанный в настоящем документе, можно вводить пациенту один раз в неделю.

Следует понимать, что концентрация модифицированного полипептида релаксина, вводимого данному пациенту, может быть выше или ниже, чем концентрации для иллюстративного введения, представленные выше.

Основываясь на информации, представленной в настоящем раскрытии, специалист в данной области сможет определить эффективную дозировку и частоту введения путем рутинного экспериментирования, например, руководствуясь раскрытием в настоящем документе и учениями в Goodman et al., (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; или Howland et al., (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Средние количества модифицированного релаксина могут варьировать и, в частности, должны основываться на рекомендациях и назначении квалифицированного врача. Точное количество модифицированного релаксина является предпочтительным с учетом таких факторов, как точный тип подвергаемого лечению состояния, состояние подвергаемого лечению пациента, а также другие ингредиенты в композиции. В настоящем раскрытии также предусмотрено введение терапевтически эффективного количества другого активного агента. Количество, которое следует давать, может быть легко определено специалистом в данной области.

"Фармацевтическая композиция" относится к химической или биологической композиции, подходящей для введения млекопитающему. Такие композиции могут быть специально составлены для введения одним или несколькими из некоторого числа путей, включая, но без ограничения, трансбуккальный, назогастральный, эпидуральный, ингаляционный, внутриаартериальный, внутрисердечный, интрацеребровен-

трикулярный, внутрикожный, внутримышечный, интраназальный, внутриглазной, внутрибрюшинный, внутриспинальный, интратекальный, внутривенный, пероральный, парентеральный, ректальный с помощью клизмы или суппозитория, подкожный, субдермальный, подъязычный, трансдермальный и трансмукозальный. Кроме того, введение может происходить посредством инъекции, порошка, жидкости, геля, капель или других средств введения.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "вспомогательное вещество" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, которые являются физиологически совместимыми. В одном варианте осуществления носитель подходит для парентерального введения. В другом варианте осуществления носитель подходит для подкожного введения. Альтернативно, носитель может быть подходящим для внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного или подъязычного введения. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может присутствовать в лиофилизированной форме. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит изотонический агент, например, сахара, такие как сахароза, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Посредством включения такого средства, как соли-моностеараты и желатин, можно продлить абсорбцию инъектируемых композиций. Кроме того, полипептид может быть составлен в виде состава с высвобождением во времени, например, в композиции, которая включает полимер с медленным высвобождением. Активные соединения могут быть получены с носителями, которые могут защищать соединение от быстрого высвобождения, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры, полимолочная кислота и полимолочные, полигликолевые сополимеры (PLG).

Модифицированные полипептиды релаксина и композиции по настоящему изобретению можно вводить любым обычным способом, подходящим для белков или пептидов, включая, но без ограничения, парентерально, например, посредством инъекции, включая, но без ограничения, подкожно или внутривенно, или в любой другой форме инъекций или инфузий. Полипептидные композиции можно вводить несколькими путями, включая, но без ограничения, пероральный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, трансдермальный, подкожный, местный, подъязычный или ректальный пути. Композиции, содержащие модифицированный релаксин, также можно вводить через липосомы. Модифицированный полипептид релаксина может использоваться отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, такими как фармацевтический носитель. Модифицированный полипептид релаксина может быть использован в комбинации с другими агентами, как описано в настоящем документе.

Составы, подходящие для парентерального введения, такого как, например, внутрисуставное (в суставах), внутривенное, внутримышечное, внутрикожное, внутрибрюшинное и подкожное введение, включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Составы модифицированного релаксина могут быть представлены в виде однократных или многократных герметичных контейнеров, таких как ампулы и флаконы.

Доза, вводимая пациенту, в контексте настоящего раскрытия, представляет собой достаточную для того, чтобы характеризоваться благоприятным терапевтическим ответом у пациента с течением времени или другой соответствующей активностью в зависимости от применения. Доза определяется эффективностью состава и активностью, стабильностью или периодом полувыведения из сыворотки модифицированного полипептида релаксина и состоянием пациента, а также массой тела или площадью поверхности пациента, подлежащего лечению.

Доза, вводимая, например, пациенту массой 70 кг, как правило, находится в диапазоне, эквивалентном дозам используемых в настоящее время терапевтических белков, с поправкой на измененную активность или период полувыведения из сыворотки соответствующей композиции.

Для введения составы по настоящему изобретению вводят со скоростью, определяемой LD-50 или ED-50 соответствующего состава и/или наблюдением любых побочных эффектов модифицированных полипептидов релаксина в различных концентрациях, включая но без ограничения, применительно к

массе и общему состоянию здоровья пациента. Введение может быть достигнуто с помощью одной или нескольких доз.

Модифицированные полипептиды релаксина по настоящему изобретению могут быть введены непосредственно субъекту-млекопитающему. Модифицированные полипептиды релаксина по настоящему изобретению могут быть получены в виде смеси в однодозовой инъекционной форме (включая, но без ограничения, раствор, суспензию или эмульсию) с фармацевтически приемлемым носителем. Модифицированные полипептиды релаксина по настоящему изобретению также можно вводить путем непрерывной инфузии (с использованием, но без ограничения, мини-насосов, таких как осмотические насосы), одноболусных составов или депо с замедленным высвобождением.

Составы, подходящие для введения, включают водные и неводные растворы, изотонические стерильные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного выше типа.

Фармацевтически приемлемые носители включают, но без ограничения, буферы, содержащие сукцинат, фосфат, борат, НЕРЕС, цитрат, гистидин, имидазол, ацетат, бикарбонат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая, но без ограничения, аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды, включая, но без ограничения, полипептиды с менее чем 10 остатками; белки, включая, но без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, включая, но без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, включая, но без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, гистидин или производные гистидина, метионин, глутамат или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, но без ограничения, трегалозу, сахарозу, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, включая, но без ограничения, EDTA и эдентат натрия; ионы двухвалентных металлов, включая, но без ограничения, цинк, кобальт или медь; сахарные спирты, включая, но без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, включая, но без ограничения, натрий и хлорид натрия; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, включая, но без ограничения, Tween™ (включая, но без ограничения, Tween 80 (полисорбат 80 или PS80) и Tween 20 (полисорбат 20), Pluronic™ и другие плуроновые кислоты, включая, но без ограничения, и другие плуроновые кислоты, включая, но без ограничения, плуроновую кислоту F68 (полосамер 188) или PEG. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, например, но без ограничения, простые полиэфиры на основе поли(этиленоксида)-поли(пропиленоксида)-поли(этиленоксида), то есть (PEO-PPO-PEO), или поли(пропиленоксида)-поли(этиленоксида)-поли(пропиленоксида), т.е. (PPO-PEO-PPO), или их комбинацию. PEO-PPO-PEO и PPO-PEO-PPO коммерчески доступны под торговыми названиями Pluronic™, R-Pluronic™, Tetronics™ и R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) и дополнительно описаны в патенте США № 4820352, включенном в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки. Другие блок-сополимеры этилена/полипропилена могут быть подходящими поверхностно-активными веществами. Поверхностно-активное вещество или комбинацию поверхностно-активных веществ можно использовать для стабилизации модифицированного релаксина против одного или нескольких стрессов, включая, помимо прочего, стресс, возникающий в результате перемешивания. Некоторые из вышеперечисленных могут упоминаться как "наполнители". Некоторые из них могут также называться "модификаторами тоничности". Противомикробные консерванты могут также применяться для стабильности продукта и противомикробной эффективности; подходящие консерванты включают, но без ограничения, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, метакрезол, метил/пропилпарабен, крезол и фенол или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать буфер, содержащий сукцинат, фосфат, борат, НЕРЕС, цитрат, гистидин, имидазол, ацетат, бикарбонат и/или другие органические кислоты; углевод (например, моносахариды, дисахариды и другие углеводы), такой как трегалоза, сахароза, глюкоза, манноза или декстрин; и поверхностно-активные вещества, такие как Tween™ 80 (полисорбат 80 или PS80) или Tween 20 (полисорбат 20). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать буфер, содержащий гистидин, углевод, такой как сахароза; и поверхностно-активные вещества, такие как PS80.

Модифицированные полипептиды релаксина по настоящему изобретению, в том числе полипептиды, связанные с РК-энхансером, также могут вводиться или быть частью систем с замедленным высвобождением. Композиции с замедленным высвобождением включают, но без ограничения, полупроницаемые полимерные матрицы в форме формованных изделий, включая, но без ограничения, пленки или микрокапсулы. Матрицы с замедленным высвобождением включают биосовместимые материалы, такие как поли(2-гидроксиэтилметакрилат), этиленвинилацетат (или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту, полилактоиды (полимолочную кислоту), полигликолид (полимер гликолевой кислоты), полиангидриды полилактоид-со-гликолид (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, поли(орто)сложные эфиры, полипептиды, гиалуроно-

вую кислоту, коллаген, хондроитинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Композиции с замедленным высвобождением также включают захваченное в липосому соединение.

Доза, вводимая пациенту в контексте настоящего изобретения, должна быть достаточной, чтобы вызвать благоприятный ответ у субъекта с течением времени. Как правило, общее фармацевтически эффективное количество модифицированного полипептида релаксина согласно настоящему изобретению, вводимое парентерально (например, внутривенно или подкожно) на дозу, может находиться в диапазоне от около 0,01 мкг/кг до около 500 мг/кг, от около 0,01 мкг/кг до около 100 мг/кг, от около 0,05 мг/кг до около 50 мг/кг, от около 100 мкг/кг до около 40 мг/кг, от около 0,2 мг/кг до около 20 мг/кг или от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг или составляет около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 12 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг или около 100 мг/кг массы тела пациента, хотя это подлежит терапевтическому усмотрению. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированного полипептида релаксина согласно настоящему изобретению, вводимое парентерально (например, внутривенно или подкожно) на дозу, может находиться в диапазоне от около 0,2 мг/кг до около 5 мг/кг, от 0,5 мг/кг до около 3 мг/кг или от 1 мг/кг до около 3 мг/кг, или составляет около 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 50 мг/кг или 80 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированного полипептида релаксина согласно настоящему изобретению, вводимое парентерально (например, внутривенно или подкожно) на дозу, может составлять около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированного полипептида релаксина согласно настоящему изобретению, вводимое парентерально (например, внутривенно или подкожно) на дозу, может представлять фиксированную дозу в диапазоне от около 0,1 мг до около 10000 мг, от около 1 мг до около 5000 мг, от около 10 мг до около 2500 мг, от около 100 мг до около 1000 мг, от около 200 мг до около 800 мг, от около 400 мг до около 600 мг, от около 1 мг до около 10 мг, от около 10 мг до около 50 мг, от около 50 мг до около 100 мг, от около 100 мг до около 300 мг, от около 300 мг до около 500 мг, от около 500 мг до около 700 мг, от около 700 мг до около 900 мг, от около 900 мг до около 1200 мг, от около 1000 до около 2000 мг, от около 2000 мг до около 3000 мг, от около 3000 мг до около 4000 мг, от около 4000 мг до около 5000 мг, от около 5000 мг до около 6000 мг, от около 6000 мг до около 7000 мг, от около 7000 мг до около 8000 мг, от около 8000 мг до около 9000 мг или от около от 9000 мг до около 10000 мг.

## XII. Терапевтическое применение модифицированных полипептидов релаксина

Настоящее изобретение обеспечивает применение модифицированных полипептидов релаксина для лечения заболеваний, включающих сердечные-сосудистые заболевания или фиброзные заболевания, такие как сердечная недостаточность, панкреатит, воспаление, рак, склеродермия, фиброз легких, фиброз почек, фиброз печени или фиброз миокарда.

Указанное сердечно-сосудистое заболевание может включать, но без ограничения, ишемическую болезнь сердца, сердечный приступ, аритмию или нерегулярные сердечные сокращения, сердечную недостаточность, болезнь сердечных клапанов, врожденный порок сердца, кардиомиопатию (заболевание сердечной мышцы), заболевание перикарда, болезнь аорты, синдром Марфана или сосудистое заболевание (болезнь кровеносных сосудов).

В некоторых вариантах осуществления указанная сердечная недостаточность может включать одно или несколько из прогрессирующей сердечной недостаточности, кардиоренального синдрома, сердечной недостаточности с нарушением функции почек, хронической сердечной недостаточности, хронической сердечной недостаточности с фракцией выброса среднего диапазона (HFmEF), острой сердечной недостаточности, постострой сердечной недостаточности, такой как постострая декомпенсированная сердечная недостаточность, компенсированной сердечной недостаточности, декомпенсированной сердечной недостаточности, недостаточности правого желудочка, недостаточности левого желудочка, глобальной сердечной недостаточности, ишемической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, сердечная недостаточность, связанная с врожденными пороками сердца, сердечная недостаточность, связанная с дефектами клапанов сердца, митрального стеноза, митральной недостаточности, аортального стеноза, аортальной недостаточности, трикуспидального стеноза, трикуспидальной недостаточности, легочного стеноза, недостаточности клапана легочной артерии, стенокардии, гипертонии, легочной гипертензии или гипертензии легочной артерии, сердечной недостаточности, связанной с комбинированными дефектами сердечных клапанов, воспаления миокарда (миокардит), хронического миокардита, острого миокардита, вирусного миокардита, диабетической сердечной недостаточности, алкогольной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, связанной с нарушениями памяти сердца, диастолической сердечной недостаточности, систолической сердечной недостаточности, диастолической дисфункции, постмиокардиального ремоделирования, хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF) или хронической сердечной недостаточности с уменьшенной фракцией выброса (HFrEF).

В некоторых вариантах осуществления указанная сердечная недостаточность выбрана из хронической сердечной недостаточности, острой сердечной недостаточности, постострой сердечной недостаточ-

ности, хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HF<sub>r</sub>EF), хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HF<sub>p</sub>EF), хронической сердечной недостаточности с фракцией выброса среднего уровня (HF<sub>m</sub>EF), диастолической сердечной недостаточности, систолической сердечной недостаточности, постмиокардиального ремоделирования, стенокардии, гипертонии, легочной гипертензии и гипертензии легочной артерии. В некоторых вариантах указанная сердечная недостаточность выбрана из постострой сердечной недостаточности, прогрессирующей сердечной недостаточности, кардиоренального синдрома и сердечной недостаточности с нарушенной функцией почек.

Фиброз представляет собой образование избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани. Избыточное отложение фиброзной ткани связано с патологическими состояниями, которые могут привести к нарушению функции органа или ткани. Пораженные органы могут включать легкие (фиброз легких или пульмональный фиброз), печень (фиброз печени или гепатический фиброз), почки (фиброз почки или ренальный фиброз) и сердце (фиброз сердца). Фиброз может также поражать другие ткани и органы, включая суставы, кожу, кишечник, костный мозг и другие. Иллюстративные фиброзные состояния или заболевания включают, но без ограничения, неалкогольный стеатогепатит (NASH), который поражает печень; диабетическую болезнь почек и диабетическую нефропатию, которые поражают почку; и метаболическую сердечную недостаточность, которая поражает сердце. Например, NASH характеризуется жиром, воспалением и повреждением в печени у людей, которые употребляют мало или не употребляют алкоголь и могут привести к циррозу печени. NASH, как правило, диагностируется у людей среднего возраста с избыточным весом или ожирением, которые часто имеют повышенный уровень липидов в крови и диабет или преддиабет.

Биологическая активность модифицированных полипептидов релаксина для потенциального терапевтического применения может быть определена с использованием стандартных или известных анализов *in vitro* или *in vivo*. Полипептиды релаксина могут быть проанализированы на биологическую активность подходящими способами, известными в данной области. Такие анализы включают, но без ограничения, анализы связывания с рецептором.

В отношении заболеваний, таких как сердечная недостаточность и фиброзная болезнь, активность модифицированного релаксина может быть определена с использованием одного или нескольких анализов *in vivo*. Указанные анализы обычно включают введение релаксина у животной модели указанного заболевания и определение влияния на прогрессирование, тяжесть заболевания или другие показатели эффективного лечения. Такие анализы можно использовать для определения эффективных дозировок и режимов лечения в модельной системе, и на их основе прогнозировать режим дозирования для клинического применения, например, для пациентов-людей. Иллюстративные анализы HF, которые можно использовать, включают: 1) мышиную модель лигирования левой передней нисходящей коронарной артерии (LAD), которая имитирует кардиальные изменения у пациентов, перенесших инфаркт миокарда и прогрессирование до HF (Samuel et al., *Lab. Investigation* 91:675-690, 2011); 2) ограниченная модель инфузии ангиотензина (AngII), в которой минимальные концентрации AngII используют для индукции сердечного фиброза (Xu et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51:62-70, 2008); 3) модель соль-чувствительных крыс линии Dahl (Dahl-Salt sensitive rat model), которая характеризуется гипертензией, почечной недостаточностью и перегрузкой объемом крови (Sakata et al., *Circulation* 109:2143-2149, 2004); 4) модель кардиального и почечного фиброза у крыс с возрастной спонтанной гипертензией (Aged-Spontaneously Hypertensive Rat, SHR), которую ранее использовали для демонстрации эффективности WT-RLX (Lekgabe et al., *Hypertension* 46:412-418, 2005); и 5) крысиная модель сужения просвета грудного отдела аорты при перегрузке давлением (Kuster et al., *Circulation* 111:420-427, 2005). В дополнение к этим моделям, активность модифицированных релаксинов также может быть определена на собачьей модели, такой как у нормальных собак и собак с индуцированной HF. Кроме того, эти анализы могут быть выполнены для определения, эффективен ли модифицированный релаксин при его введении не только в профилактическом режиме, но также в терапевтическом режиме. Кроме того, модифицированные релаксины могут быть протестированы на моделях фиброза, включая почечный (Yoshida et al., *Nephrol. Dialysis Transplant* 27: 2190-2197, 2012), легочный (Huang et al., *Am. J. Pathol.* 179:2751-2765, 2011) и печеночный фиброз (Williams et al., *Gut* 49:577-583, 2001). Например, эффективность модифицированного релаксина можно сравнить с эффективностью релаксина дикого типа (например, человеческого релаксина дикого типа).

Введенные количества релаксина, полипептидов релаксина и/или аналогов релаксина по настоящему изобретению могут варьироваться и, в частности, должны основываться на рекомендациях и предписаниях квалифицированного врача. Точное количество релаксина, полипептидов релаксина и/или аналогов релаксина по настоящему изобретению составляет вопрос предпочтений субъекта относительно таких факторов, как точный тип и/или тяжесть состояния, подлежащего лечению, состояния пациента, подвергаемого лечению, так же, как и других ингредиентов композиции. Изобретение может также включать введение терапевтически эффективного количества другого активного агента. Вводимое количество может легко определить специалист в данной области на основании сведений о терапии релаксином, доступных терапиях релаксином и/или других аналогов релаксина.

Соединения по настоящему изобретению можно применять для уменьшения площади миокарда,

пораженной инфарктом, и для профилактики вторичных инфарктов. Кроме того, предлагается применение соединений по настоящему изобретению для профилактики и/или лечения тромбозов, реперфузионного повреждения после ишемии, микро- и макрососудистых поражений (васкулита), артериальных и венозных тромбозов, отеков, ишемий, таких как инфаркт миокарда, инсульт и транзиторные ишемические атаки, для кардиозащиты в связи с операциями шунтирования коронарной артерии (шунтирование коронарной артерии, САВГ), первичной чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (РТСА), РТСА после тромболитического лечения, спасательная РТСА, пересадка сердца и операции на открытом сердце, и для защиты органов в связи с трансплантацией, шунтированием, катетерным исследованием и другими хирургическими процедурами. Кроме того, предлагается применение соединений по настоящему изобретению для профилактики и/или лечения респираторных нарушений, таких как, например, хроническая обструктивная болезнь легких (хронический бронхит, COPD), астма, эмфизема легких, бронхоэктазы, муковисцидоз (муковисцидоз) и легочная гипертензия, в частности, легочная артериальная гипертензия.

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают применение модифицированного релаксина по настоящему изобретению в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения заболеваний почек, включая, но без ограничения, острые и хронические заболевания почек, и острую и хроническую почечную недостаточность, а также острую и хроническую почечную дисфункцию, включая острые и хронические стадии почечной дисфункции с необходимостью и без необходимости диализа, а также основные или связанные с этим заболевания почек, такие как почечная гипоперфузия, вызванная диализом гипотензия, гломерулопатии, клубочковая и тубулярная протеинурия, отек почек, гематурия, первичный, вторичный, а также острый и хронический гломерулонефрит, мембранозный и мембранопротрофирующий гломерулонефрит, синдром Альпорта, гломерулосклероз, интерстициальные заболевания канальцев, нефропатические заболевания, такие как первичные и врожденные заболевания почек, воспаление почек, иммунологические заболевания почек, такие как отторжение почечного трансплантата, вызванные иммунными комплексами заболевания почек, а также вызванные интоксикацией нефропатические заболевания, диабетические и недиабетические заболевания почек, пиелонефрит, кистозные почки, нефросклероз, гипертонический нефросклероз, нефротический синдром, которые характеризуются и диагностически ассоциируются с аномальным снижением клиренса креатинина и/или экскрецией воды, аномально повышенными концентрациями мочевины, азота, калия и/или креатинина в крови, изменением активности почечных ферментов, таких как глутамилсинтетаза, осмолярности мочи и объема мочи, повышенной микроальбуминурией, макроальбуминурией, клубочковыми и артериоллярными поражениями, трубчатой дилатацией, гиперфосфатемией и/или необходимостью диализа.

Кроме того, модифицированный релаксин по изобретению можно применять в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения почечной карциномы, после неполной резекции почки, обезвоживания после чрезмерного употребления диуретиков, неконтролируемого повышения артериального давления при злокачественной гипертензии, обструкции и инфекции мочевых путей, амилоидоза, а также системных заболеваний, связанных с повреждением клубочков, таких как красная волчанка, и ревматических иммунологических системных заболеваний, а также стеноза почечной артерии, тромбоза почечной артерии, тромбоз почечной вены, вызванной анальгетиками нефропатии и ацидоза почечных канальцев.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает применение модифицированного релаксина по настоящему изобретению в качестве лекарственного средства для профилактики и/или лечения индуцированных контрастным веществом и индуцированных лекарственными средствами острых и хронических интерстициальных заболеваний почек, метаболического синдрома и дислипемии.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает применение модифицированного релаксина по изобретению в качестве лекарственного средства для профилактики, облегчения и/или лечения последствий или симптомов, связанных с острыми и/или хроническими заболеваниями почек, такими как отек легких, сердечная недостаточность, уремия, анемия, нарушения электролитного обмена (например, гиперкалиемия, гипонатриемия), а также метаболизм костной ткани и углеводов.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает применение модифицированного релаксина по изобретению в качестве лекарственного средства для улучшения, стабилизации или восстановления функции почек у пациента, нуждающегося в этом, например, у пациента с заболеванием почек, как описано выше.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления обеспечивают применение модифицированного релаксина для лечения и/или профилактики заболеваний легких, особенно астматических расстройств, легочной артериальной гипертензии (РАН) и других форм легочной гипертензии (РН), включая заболевания левых отделов сердца, ВИЧ, серповидно-клеточной анемии, тромбозов (СТЕРН), саркоидоза, COPD или легочной гипертензии, связанной с фиброзом легких, хронической обструктивной болезни легких (COPD), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), острого повреждения легких (ALI), дефицита альфа-1-антитрипсина (AATD), фиброза легких, эмфиземы легких (например, эмфиземы легких, вызванной сигаретным дымом) и муковисцидоза (CF).

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления обеспечивают применение модифицированного релаксина для лечения и/или профилактики фиброзных нарушений, включая фиброзные нарушения внутренних органов, таких как, например, легкое, сердце, почка, костный мозг и, в частности, печени, а также дерматологического фиброза и фиброзных нарушений зрения.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает применение модифицированного релаксина для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики расстройств, в частности, упомянутых выше расстройств.

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает способ лечения и/или предупреждения нарушений, в частности, упомянутых выше нарушений, с использованием эффективного количества по меньшей мере одного модифицированного релаксина по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает модифицированный релаксин для применения в способе лечения и/или профилактики ишемической болезни сердца, острого коронарного синдрома, сердечной недостаточности (например, острой сердечной недостаточности, хронической сердечной недостаточности или запущенной сердечной недостаточности), и инфаркта миокарда.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в способах и композициях по настоящему изобретению, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в эффективном количестве для достижения намеченной цели, например, для лечения сердечной недостаточности. Определение эффективной дозы находится в пределах компетенции специалистов в данной области с учетом настоящего изобретения.

Для любого соединения терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена либо в анализах *in vitro*, например, активации рецептора RXFP1, *ex vivo* в изолированных перфузированных сердцах крыс, либо на моделях животных, обычно мышей, крыс, кроликов, собак или свиней. Животная модель также используется для достижения желаемого диапазона концентраций и пути введения. Такая информация затем может быть использована для определения полезных доз и путей введения людям.

Терапевтически эффективная доза относится к такому количеству модифицированного релаксина, которое ослабляет симптомы или состояние. Терапевтическая эффективность и токсичность таких соединений может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур *in vitro* или экспериментальных животных, например, ED50 (доза, терапевтически эффективная у 50% населения) и LD50 (доза, летальная для 50% населения). Соотношение доз между терапевтическим и токсическим эффектами представляет терапевтический индекс, который может быть выражен как соотношение ED50/LD50. Иллюстративные фармацевтические композиции демонстрируют высокие терапевтические индексы.

Данные, полученные в результате анализов *in vitro* и исследований на животных, используют при составлении диапазона дозировок для использования человеком. Дозировка таких соединений лежит, например, в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED50 с минимальной токсичностью или без нее. Дозировка изменяется в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы, чувствительности пациента и пути введения.

Как правило, размер дозы может варьировать от 0,1 до 100000 миллиграммов общей дозы в зависимости от пути введения. Руководство относительно конкретных дозировок и способов доставки приведено в литературе. См. патенты США 4657760; 5206344; или 5225212.

### XIII. Комбинации

Модифицированный релаксин по изобретению может быть введен отдельно или в комбинации с другими активными соединениями. В этом контексте термин "комбинация" охватывает любые способы одновременного или последовательного введения, независимо от того, содержится ли модифицированный релаксин и другой агент в одной и той же композиции или вводятся раздельно, при этом введение может осуществляться с помощью одного и того же или разных способов введения. Настоящее изобретение обеспечивает лекарственные средства, содержащие по меньшей мере один модифицированный релаксин и один или несколько дополнительных активных ингредиентов в фармацевтических композициях, в которых он смешан со вспомогательным веществом(ами) или фармацевтически приемлемыми носителями, для лечения и/или профилактики упомянутых выше нарушений.

Подходящие активные ингредиенты для комбинации могут включать, в качестве примера: активные ингредиенты, которые модулируют липидный обмен, противодиабетические средства, гипотензивные агенты, усиливающие перфузию и/или антитромботические агенты, антиоксиданты, антагонисты хемкиновых рецепторов, ингибиторы p38-киназы, агонисты NPY, агонисты орексина, анорексигенные средства, ингибиторы PAF-АН, противовоспалительные средства (ингибиторы COX, антагонисты LTB<sub>4</sub>-рецепторов), анальгетики, например, аспирин, ингибиторы P2Y<sub>12</sub>, такие как клопидогрел, ингибиторы PCSK9, такие как эволокумаб (REPATHA) или алирокумаб (PRALUENT), антипрессанты и другие психофармакологические средства.

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает комбинации по меньшей мере одного модифицированного релаксина по меньшей мере с одним активным ингредиентом, изменяющим метаболизм липидов, противодиабетическим средством, активным ингредиентом, снижающим кровяное давление, и/или агентом, обладающим антитромботическими эффектами.

Модифицированный релаксин можно комбинировать с одним или несколькими активными ингредиентами, модулирующими метаболизм липидов, например, ингибиторами HMG-CoA-редуктазы, ингибиторами экспрессии HMG-CoA-редуктазы, ингибиторами синтеза сквалена, ингибиторами АСАТ, индукторами рецептора LDL, ингибиторами абсорбции холестерина, полимерными адсорберами желчных кислот, ингибиторами реабсорбции желчных кислот, ингибиторами МТР, ингибиторами липазы, активаторами LpL, фибратами, ниацином, агонистами ниациновых рецепторов, ингибиторами СЕТР, агонистами PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  и/или PPAR- $\delta$ , модуляторами RXR, модуляторами FXR, модуляторами LXR, гормонами щитовидной железы и/или миметиками тиреоидина, ингибиторами АТФ-цитратлиазы, антагонистами Lp(a), антагонистами каннабиноидного рецептора 1, агонистами рецептора лептина, агонистами бомбезинового рецептора, ингибиторами PCSK9, агонистами гистаминового рецептора и антиоксидантами/поглотителями свободных радикалов.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором HMG-CoA-редуктазы из класса статинов, например, ловастатином, симвастатином, правастатином, флувастатином, аторвастатином, розувастатином или питавастатином. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором синтеза сквалена, например, BMS-188494 или TAK-475. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором АСАТ, например, авасимибом, мелинамидом, пактимибом, эфлюцимибом или SMP-797. В другом варианте осуществления другой модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором абсорбции холестерина, например, эзетимибом, тиквизидом или памаквезидом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором МТР, например, имплитапидом, BMS-201038, R-103757 или JTT-130. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором липазы, например, орлистатом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с гормонами щитовидной железы и/или миметиком тиреоидина, например, D-тироксидом или 3,5,3'-трийодтиронином (Т3). В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с агонистом рецептора ниацина, например, ниацином, аципимоксом, ацифраном или радеколом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором СЕТР, например, далцетрапибом, BAY 60-5521, анацетрапибом или СЕТР-вакциной (СЕТi-1). В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с агонистом PPAR- $\gamma$ , например, из класса тиазолидиндионов, например, пиоглитазоном или росиглитазоном. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с агонистом PPAR- $\delta$ , например, GW-501516 или BAY 68-5042. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с полимерным адсорбером желчных кислот, например, холестирамином, колестиполом, колесолвамом, CholestaGel или колестимилом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором реабсорбции желчных кислот, например, ингибиторами ASBT (=IBAT), такими как, например, AZD-7806, S-8921, AK-105, BARI-1741, SC-435 или SC-635. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антиоксидантом/ поглотителем свободных радикалов, например, пробуколом, AGI-1067, BO-653 или AEOL-10150. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом каннабиноидного рецептора 1, например, римонабантом или SR-147778.

Модифицированный релаксин можно комбинировать с одним или несколькими противодиабетическими средствами, например, инсулином и производными инсулина, сульфонилмочевинами, бигуанидами, производными меглитинида, ингибиторами глюкозидазы, агонистами PPAR-гамма, ингибиторами дипептидилпептидазы IV (ингибиторы DPP-IV), оксадиазолидинонами, тиазолидиндионами, агонистами рецептора GLP 1, антагонистами глюкагона, сенсibiliзаторами инсулина, агонистами рецептора ССК 1, агонистами рецептора лептина, ингибиторами ферментов печени, участвующих в стимуляции глюконеогенеза и/или гликогенолиза, модуляторами захвата глюкозы, а также веществами, открывающими калиевые каналы.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с инсулином или производным инсулина. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с сульфонилмочевинной, например, толбутамидом, глибенкламидом, глимепиридом, глипизидом или гликлазидом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с бигуанидом, например, метформином. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с производным меглитинида, например, релаглинидом или натеглинидом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором глюкозидазы, например, миглитолом или акарбозой. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором DPP-IV, например, ситаглиптином и вилдаглиптином. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с агонистом PPAR-гамма, например, из класса тиазолидиндионов, например, пиоглитазоном или росиглитазоном.

Модифицированный релаксин можно комбинировать с одним или несколькими активными ингре-

диентами, снижающими кровяное давление, например, антагонистами кальция, антагонистами ангиотензина II, ингибиторами АСЕ, ингибиторами ренина, блокаторами бета-рецепторов, блокаторами альфа-рецепторов, диуретиками, антагонистами альдостерона, антагонистами минералокортикоидных рецепторов, ингибиторами ЕСЕ, ингибиторами АСЕ/NEP и ингибиторами вазопептидазы.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом кальция, например, нифедипином, амлодипином, верапамилом или дилтиаземом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом ангиотензина II, например лозартаном, валсартаном, кандесартаном, эмбусартаном, олмесартаном или телмисартаном. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором АСЕ, например, эналаприлом, каптоприлом, лизиноприлом, рамиприлом, делаприлом, фозиноприлом, квиноприлом, периндоприлом или трандоприлом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с блокатором бета-рецепторов, например, пропранололом, атенололом, тимололом, пиндололом, алпренололом, окспренололом, пенбутололом, бупранололом, метипранололом, надололом, мепиндололом, каразололом, соталолом, метопрололом, бетаксололом, целипрололом, бисопрололом, картеололом, эсмололом, лабеталолом, карведилолом, адапрололом, ландилолом, небивололом, эпаноололом или буциндололом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с блокатором альфа-рецепторов, например, празозином. В другом варианте осуществления изобретения модифицированный релаксин вводят в комбинации с диуретиком, например, фуросемидом, буметанидом, торсемидом, бендрофлюметиазидом, хлортиазидом, гидрохлортиазидом, гидрофлуметиазидом, метиклотиазидом, политиазидом, трихлорметиазидом, хлорталидоном, индапамидом, метолазоном, квинэтазоном, ацетазоламидом, дихлорфенамидом, метазоламидом, глицерином, изосорбидом, маннитом, амилоридом или триамтереном. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом альдостеронового или минералокортикоидного рецептора, например, спиронолактоном или эплереноном. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом рецептора вазопрессина, например, кониваптаном, толваптаном, ликсиваптаном или SR-121463.

Модифицированный релаксин может быть комбинирован с одним или несколькими из следующих веществ: антитромботические агенты, например, ингибиторы агрегации тромбоцитов или антикоагулянты; диуретики; антагонисты вазопрессинных рецепторов; органические нитраты и доноры NO; соединения с положительной инотропной активностью; соединения, которые ингибируют деградацию циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и/или циклического аденозинмонофосфата (сAMP), такие как, например, ингибиторы фосфодиэстераз (PDE) 1, 2, 3, 4 и/или 5, в частности, ингибиторы PDE 5, такие как силденафил, варденафил и тадалафил, а также ингибиторы PDE 3, такие как милринон; натрийуретические пептиды, например, "предсердный натрийуретический пептид" (АКР, анаритид), "натрийуретический пептид В-типа" или "натрийуретический пептид головного мозга" (BNP, несиритид), "натрийуретический пептид С-типа" (СNP), а также уродилатин; агонисты рецептора простаглицина (IP-рецептор), например, илопрост, берапрост, цикапрост; ингибиторы If-канала (funny channel), например, ивабрадин; сенситизаторы кальция, такие как, например, левосимендан; калиевые добавки; NO-независимые, но гем-зависимые стимуляторы гуанилатциклазы, например, соединения, описанные в WO 00/06568, WO 00/06569, WO 02/42301 и WO 03/095451; NO- и гем-независимые активаторы гуанилатциклазы, например, соединения, описанные в WO 01/19355, WO 01/19776, WO 01/19778, WO 01/19780, WO 02/070462 и WO 02/070510; ингибиторы человеческой нейтрофильной эластазы (HNE), например, сивелестат и DX-890 (релтран); соединения, ингибирующие каскады трансдукционных сигналов, например, ингибиторы тирозинкиназы, например, сорафениб, иматиниб, gefitinib и эрлотиниб; и/или соединения, которые модулируют энергетический метаболизм сердца, например, этомоксир, дихлорацетат, ранолазин и триметадин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с органическим нитратом или донором NO, например, нитропруссидом натрия, нитроглицерином, изосорбидмононитратом, изосорбиддинитратом, молзидомином или SIN-1, или в комбинации с ингаляционным NO. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с соединением с положительным инотропным действием, например, сердечными гликозидами (дигоксин), бета-адренергическими и дофаминергическими агонистами, такими как изопротеренол, адреналин, норадреналин, дофамин или добутамин. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антисимпатотониками, такими как резерпин, клонидин или альфа-метилдопа, или в комбинации с агонистами калиевых каналов, такими как миноксидил, diazoxid, дигидралазин или гидралазин, или с веществами, которые выделяют оксид азота, такими как нитрат глицерина или нитропруссид натрия. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором агрегации тромбоцитов, например, аспирином, клопидогрелем, тиклопидином или дипиридамолом. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с ингибитором тромбина, например, ксимелагатраном, мелагатраном, дабигатраном, бивалирудином или клексаном. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом GPIIb/IIIa, например, тирофибаном или абциксимабом. В другом варианте осуществления модифициро-

ванный релаксин вводят в комбинации с ингибитором фактора Ха, например, ривароксабаном (BAY 59-7939), DU-176b, апиксабаном, отамиксабаном, фидексабаном, разаксабаном, фондапаринуксом, идрапаринуксом, PMD-3112, YM-150, KFA-1982, EMD-503982, MCM-17, MLN-1021, DX 9065a, DPC 906, JTV 803, SSR-126512 или SSR-128428. В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с гепарином или низкомолекулярным производным гепарина (LMW). В другом варианте осуществления модифицированный релаксин вводят в комбинации с антагонистом витамина К, таким как, например, кумадин (варфарин).

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает лекарственные средства, содержащие по меньшей мере один модифицированный релаксин, обычно вместе с одним или несколькими инертными нетоксичными фармацевтически пригодными вспомогательными веществами, а также их применение для целей, упомянутых выше. Необязательно, указанное лекарственное средство может содержать указанный модифицированный релаксин и другой активный ингредиент, такой как ингредиенты, указанные выше. Например, указанное лекарственное средство может содержать указанный модифицированный релаксин и другой активный ингредиент в количестве, эффективном для лечения или предупреждения сердечной недостаточности и/или заболевания, связанного с фиброзом.

#### Примеры

Пример 1: Рибосомальное включение не кодируемой в природных условиях аминокислоты в пре-про-релаксин (PreproRelaxin)

В этом примере в качестве иллюстрации описано клонирование и экспрессия полипептида релаксина, включающего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, в *E.coli*.

Способы клонирования релаксина известны специалистам в данной области. Полипептидные и полинуклеотидные последовательности для релаксина и клонирование релаксина в клетки-хозяева подробно описаны в патенте США 4758516; патенте США 5166191; патентах США 5179195, 5945402; и 5759807; все из которых включены в настоящий документ путем ссылки.

Кодирующая релаксин кДНК показана как SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность зрелого полипептида показана как SEQ ID NO: 1. Иллюстративные последовательности релаксина представлены в табл. 1.

Таблица 1  
Последовательности релаксина

SEQ ID NO:	Название последовательности	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность релаксина (цепи А и В)	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	Аминокислотная последовательность релаксина B1 Ala (цепи А и В)	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	Иллюстративная аминокислотная последовательность про-релаксина	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQ VELGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCT KRSLARFC
4	Цепь А релаксина, аминокислотная последовательность	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	Цепь В релаксина, аминокислотная последовательность	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	Цепь В релаксина, аминокислотная последовательность с B1 Ala	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	Иллюстративная аминокислотная последовательность C-	RREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQKR

	пептида (соединяющего пептида)	
8	Иллюстративная лидерная аминокислотная последовательность релаксина	MKKNIAFLKKR
9	Иллюстративная лидерная аминокислотная последовательность инсулина	MIEGGR
10	Иллюстративная нуклеотидная последовательность цепи А релаксина	caactctacagtcattggctaataaatgttccatgttggtgtacacaaaagatctctgtagatt ttgc
11	Иллюстративная нуклеотидная последовательность цепи В релаксина	gactcatggatggaggaagtattataatgatcgcccgcaattagtcgcgcgagattccat ttcggcatgagcacctggagc
12	Иллюстративная нуклеотидная последовательность цепей А и В релаксина	caactctacagtcattggctaataaatgttccatgttggtgtacacaaaagatctctgtagatt ttgc gactcatggatggaggaagtattataatgatcgcccgcaattagtcgcgcgagattccat ttcggcatgagcacctggagc
13	Иллюстративная лидерная нуклеотидная последовательность релаксина	atgaaaaagaatatcgatttcttcttaaacgg
14	Иллюстративная лидерная нуклеотидная последовательность инсулина	atgattgaaggtggtcgt
15	Пример аминокислотной последовательности экспрессионной конструкции для релаксина	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAED LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCC HVGCTKRSLARFC
35	Цепь А релаксина, замещенная пара- ацетил-L- фенилаланином в положении 1	(pAcF)LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
36	Цепь А релаксина, замещенная аспарагином в положении 1	NLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
37	Цепь В релаксина, замещенная пара- ацетил-фенилаланином в положении 25	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG(pAcF)STWS
38	Иллюстративная последовательность	MIEEGR ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
	экспрессии препо- релаксина (X может представлять собой, например, pAcF)	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQGR XLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
39	Иллюстративная лидерная аминокислотная последовательность инсулина	MIEEGR

Введенная система трансляции, которая включает ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоксил тРНК синтетазу (О-RS), используется для экспрессии релаксина или аналогов релаксина, содержащих не кодируемую в природных условиях аминокислоту. О-RS предпочтительно аминокислитизирует О-тРНК с не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В свою очередь, система трансляции вставляет не кодируемую в природных условиях аминокислоту в релаксин или аналог релаксина в ответ на кодируемый селекторный кодон. Подходящие последовательности О-RS и О-тРНК описаны в заявке WO 2006/068802, озаглавленной "Композиции аминоксил-тРНК синтетазы и их применение" (E9; SEQ ID NO: 16), и в заявке WO 2007/021297, озаглавленной "Композиции тРНК и их применение" (F13; SEQ

ID NO: 17), которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Иллюстративные последовательности, которые могут быть использованы, приведены в табл. 2.

Таблица 2

## Последовательности, используемые в системах экспрессии

SEQ ID NO:18	<i>M. jannaschii</i> mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CUA</sub>	tPHK
SEQ ID NO:19	<i>HLAD03</i> ; оптимизированная амбер-супрессорная tPHK	tPHK
SEQ ID NO:20	<i>HL325A</i> ; оптимизированная супрессорная tPHK сдвига рамки генетического кода AGGA	tPHK
SEQ ID NO:21	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- <i>L</i> -фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(6)	RS
SEQ ID NO:22	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -бензоил- <i>L</i> -фенилаланина <i>p</i> -BraRS(1)	RS
SEQ ID NO:23	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	RS
SEQ ID NO:24	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	RS
SEQ ID NO:25	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	RS
SEQ ID NO:26	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(1)	RS
SEQ ID NO:27	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(3)	RS
SEQ ID NO:28	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(4)	RS
SEQ ID NO:29	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(2)	RS
SEQ ID NO:30	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина (LW1)	RS
SEQ ID NO:31	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина (LW5)	RS
SEQ ID NO:32	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина (LW6)	RS
SEQ ID NO:33	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина (AzPheRS-5)	RS
SEQ ID NO:34	Аминоацил tPHK синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо-фенилаланина (AzPheRS-6)	RS

Трансформация *E. coli* плазмидами, содержащими ген модифицированного релаксина или аналога релаксина, и ортогональной парой аминоацил-tPHK синтетаза/tPHK (специфическую в отношении желаемой, не кодируемой в природных условиях аминокислоты), позволяет осуществить сайт-специфическое встраивание не кодируемой в природных условиях аминокислоты в полипептид релаксина, как описано в патенте США 8735539, который полностью включен в настоящий документ.

Зрелый релаксин дикого типа амплифицируют методом PCR из реакции синтеза кДНК с использованием стандартных протоколов и клонируют в плазмидный вектор, такой как pET30 (NcoI-BamHI). Последовательность релаксина субклонировали в вектор супрессии, содержащий амбер-супрессорную тирозил tPHK<sup>Tyr</sup>/CUA из *Methanococcus jannaschii* (Mj tPHK<sup>Tyr</sup>/CUA) под конститутивным контролем синтетического промотора, полученного из последовательности промотора липопротеина *E. coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), а также ортогональную тирозил-tPHK-синтетазу (MjTyrRS) (например, E9) под контролем промотора GlnRS *E. coli*. Экспрессия релаксина находится под контролем промотора T7, который косвенно индуцируется L-арабинозой. Амбер-мутации вводят с использованием стандартных протоколов мутагенеза QuickChange (Stratagene; La Jolla, California). Последовательность конструкций верифицировали.

Подавление пара-ацетил-фенилаланином (pAcF).

Плазмиды, содержащие ген модифицированного релаксина, содержащий амбер мутацию (кодирующую SEQ ID NO: 38 с pAcF у остатка 1 А-цепи, см. фиг. 4) и ортогональную пару аминоацил tPHK синтетаза/tPHK, как описано выше, использовали для трансформации в штамм *Escherichia coli* W3110B55 [F- IN (rrnD-rrnE) lambda<sub>deara</sub>B::g1 tetA fhuA::dhfr proS W375R::cat] в результате чего получали штамм *E. coli*, в котором экспрессия T7 полимеразы была под контролем индуцируемого арабинозой промотора. Суточные бактериальные культуры разбавляли в пропорции 1:100 во встряхиваемых флаконах, содержащих культуральную среду 2X YT, и выращивали при 37°C до OD<sub>600</sub> ~ 0,8. Экспрессию белка индуцировали добавлением арабинозы (конечная концентрация 0,2%) и пара-ацетил-фенилаланина (pAcF) до конечной концентрации 4 мМ. Культуры инкубировали при 37°C в течение 5 часов. Клетки осаждали и ресуспендировали в лизирующем буфере B-PER (Pierce) 100 мкл/OD/мл + 10 мкг/мл ДНКазы и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Клеточный материал удаляли центрифугированием с удалением супернатанта. Осадок ресуспендировали в равном количестве белкового загрузочного буфера для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Все образцы загру-

жали в 4-12% ПААГ с буфером MES и дитиотриэтолом (DTT). Экспрессию релаксина подтверждали методами SDS-PAGE, Вестерн-блот-анализом или масс-спектроскопией с ионизацией электрораспылением и ионными ловушками, и т.п.

Последовательность гена модифицированного релаксина может включать N-концевую His-метку, например, НННННННССGG (SEQ ID NO: 55). Меченые гистидином мутантные белки релаксина могут быть очищены с использованием методов, известных специалистам в данной области. Для стандартных процедур очистки меченых гистидином белков может быть использована никель-хелатирующая смола Pro-Bond (Invitrogen, Carlsbad, CA), которую поставляет производитель. Функциональные измерения белков могут быть проведены с использованием методов, известных в данной области, методов, приведенных в данной заявке и во включенных в нее ссылках, а также, в качестве альтернативы, метод твердофазного ИФА (ELISA) на живых клетках может быть адаптирован для оценки полипептидов релаксина по изобретению.

Пример 2. Продукция и очистка зрелого релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту

PreproRelaxin (SEQ ID NO: 38 с рAcF в остатке 1 А-цепи, см. фиг. 4) получали путем ферментации в клетках *E.coli* в качестве телец включения. Не кодируемую в природных условиях аминокислоту пара-ацетил-фенилаланин рибосомально встраивали с использованием общих методов, приведенных в примере 1.

Клетки *E.coli*, содержащие плазмиду, экспрессирующую модифицированный полипептид релаксина, выращивали в ферментере, содержащем ферментационную среду. Канамицин добавляли в ферментер для содействия стабильности плазмиды. Гидрохлорид L-аланина-L-пара-ацетилфенилаланина (L-Ala-pAcF) добавляли в ферментер для обеспечения встраивания р-ацетилфенилаланина (рAcF) в аминокислотную последовательность PreproRelaxin. И наконец, L-арабинозу добавляли для индукции экспрессии PreproRelaxin. PreproRelaxin, продуцируемый внутри клеток, приводил к образованию нерастворимых телец включения (IB). Ферментационный бульон собирали после периода индукции. Титр ферментации составил приблизительно 4,5 г PreproRelaxin на литр ферментации.

Тела включения (IB) были отделены от интактных клеток путем лизиса клеток под действием высокого сдвига. Интактные IB извлекали путем центрифугирования. После извлечения гранулы IB ресуспендировали в воде и повторно центрифугировали для удаления примесей. Промытые IB солибилизовали при pH 8,5 в 5М гуанидине/ Tris буфере, содержащем 5 мМ дитиотреитол (DTT). Рефолдинг PreproRelaxin достигался путем медленного разбавления солибализованного раствора IB приблизительно в 4,5 раза в охлажденном Tris буфере при pH 8,5, содержащем 5 мМ DTT и 8,5 мМ цистамин. Раствор для рефолдинга инкубировали в течение минимум 12 ч перед продолжением обработки. После завершения инкубационного периода pH снижали до 3,5-4,0 путем добавления уксусной кислоты и соляной кислоты для ускорения осаждения примесей. Осажденный материал удаляли центрифугированием с последующей глубокой фильтрацией.

Подвергнутый глубокой фильтрации раствор для рефолдинга разбавляли приблизительно в 6,5 раз ацетатным буфером при pH 4 для снижения проводимости при подготовке к загрузке в катионообменную колонку Tosoh Bioscience SP550C. После загрузки колонку SP550C промывали и затем элюировали PreproRelaxin, используя градиент 10%-90% 50 мМ ацетатного буфера, pH 5,5, содержащего 1М NaCl. Элюат SP550C разбавляли очищенной водой до тех пор, пока концентрация PreproRelaxin не достигла 1,5 мг/мл. Значение pH доводили до 8,0 путем добавления 2М Tris, pH 8,0, с последующим добавлением 2 мМ CaCl<sub>2</sub> при подготовке к ферментативному превращению.

Трипсин дикого типа модифицировали янтарным ангидридом (то есть сукцинилирование) для облегчения удаления из реакционной смеси PreproRelaxin/ трипсин после завершения стадии обработки трипсина. Концентрированный трипсин дикого типа в 10 мМ HCl, 20 мМ CaCl<sub>2</sub> разбавляли до 5 мг/мл очищенной водой, затем добавляли 1 М боратный буфер при pH 7,6 до конечной концентрации 0,2 М. Твердый янтарный ангидрид добавляли к разбавленному раствору трипсина с отрегулированным pH в 100-молярном избытке по сравнению с трипсином путем трех эквимольных добавлений (3×33,3 молярных избытка), перемешивая в течение 10 минут между каждым добавлением.

Сукцинированный трипсин добавляли к раствору PreproRelaxin, инкубированному при 22°C в течение 4 часов, чтобы обеспечить полное ферментативное удаление соединяющего пептида и лидерной последовательности молекулы PreproRelaxin. Полученная молекула Relaxin-R содержит C-концевой аргинин на В-цепи. Затем обработанный трипсином материал обрабатывали через анионообменный фильтр Sartobind STIC® P, который связывает сукцинированный трипсин, в то время как Relaxin-R собирали в потоке. Карбоксипептидазу-В (CPB) добавляли к фильтрату STIC® PA и инкубировали при перемешивании в течение 2 часов для обеспечения полного ферментативного удаления C-концевого остатка аргинина В-цепи. Реакцию CPB гасили, понижая pH реакционной смеси до 2,8-3,2.

Зрелый релаксин очищали с использованием катионообменной смолы Tosoh Bioscience SP-5PW. Зрелый релаксин загружали в колонку, а затем трижды промывали колонку; 1) 50 мМ ацетат, pH 5,5, 2) 50 мМ ацетат, pH 5,5, 0,1 М NaCl и 3) 50 мМ ацетат, pH 4,0. Связанный релаксин элюировали при pH 4 с

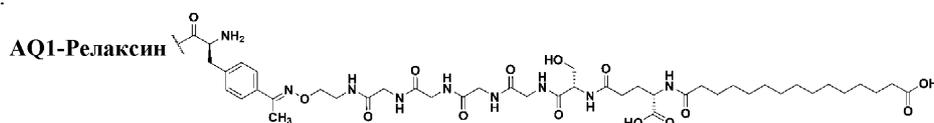
использованием линейного градиента от 0% до 100% 2 М КСl на 20 объемах колонки. Значение рН элюированного раствора релаксина доводили до 3,0 с использованием 1М НСl перед дальнейшей обработкой. Альтернативно, трипсин удаляли из реакционной смеси осаждением. Релаксин выпадает в осадок после повышения рН реакционной смеси до 8,0 в течение 1 часа при комнатной температуре. Осажденный релаксин затем извлекали центрифугированием. Осадок промывали 3 раза путем ресуспендирования осадка в Tris-буфере при рН 8 с последующим центрифугированием. После окончательной промывки осадок повторно растворяли в 20 мМ уксусной кислоте. Очищенный релаксин не проявлял какой-либо триптической активности. Конечным продуктом был зрелый релаксин.

По существу, такой же способ синтеза использовали для получения RLX-AQ1 ("AQ1") (Фиг. 2) и RLX-BM25/AN1 ("BM25/AN1") (Фиг. 3) с соответствующей модификацией последовательности PreproRelaxin.

Пример 3. Конъюгирование релаксина с РК-энхансером, содержащим пептид, связанный с жирной кислотой

Очищенный релаксин концентрировали ультрафильтрацией до приблизительно 10 мг/мл. Аминоокси-активированный РК-энхансер, содержащий пептид и жирную кислоту C15 (например, GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH), добавляли к реакционной смеси при 1,5 молярном избытке по сравнению с релаксином. Затем добавляли гидразидную добавку (то есть 4-аминобензоигидразид) при 45-молярном избытке по сравнению с релаксином. Раствор корректировали по мере необходимости с помощью 1М НСl для поддержания рН между 3,5 и 4,0, и температуру контролировали при 30°C. Реакция конъюгации дала стабильную оксимную связь между пептидным линкером, связанным с жирной кислотой C15 (например, GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH), полученной согласно методике, описанной в примере 4, и пара-ацетил-фенилаланиновым остатком в релаксине. Реакция была завершена в течение 16 часов.

Реакционную смесь для конъюгирования разбавляли до  $\leq 4$  мСм/см с помощью 10 мМ ацетатного буфера при рН 4,0, затем загружали в катионообменную колонку GE Healthcare SP HP. После завершения загрузки колонку промывали 20 мМ гистидином, рН 6,0, для удаления примесей. Затем конъюгат релаксин-C15 (содержащий, например, AQ1-Relaxin-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH) элюировали 50 мМ бикарбонатом аммония, рН 8,5. Структура зрелого релаксина схематически показана на фиг. 5 и в формуле III:



(Формула III).

Очищенный конъюгат Релаксин-C15 концентрировали и затем подвергали диалфильтрации в подходящий буфер для конечного состава. Иллюстративная композиция конъюгата представляет собой 8 мг/мл конъюгата Релаксин-C15 в 20 мМ гистидине, 0,25 М сахарозе, 0,05% (масса/объем) полисорбата-80, рН 5,5. Композицию хранили в замороженном состоянии при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Другие конъюгаты релаксин-жирная кислота могут быть получены с использованием аналогичных процессов.

Пример 4: Твердофазный синтез РК-энхансеров

РК-энхансеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены с использованием методик, приведенных в качестве примеров ниже.

Сокращения, используемые в настоящей заявке, включая, в частности, в иллюстративных схемах и примерах, которые следуют далее, известны специалистам в данной области техники. Некоторые из используемых сокращений представляют собой следующие: min для минут; h для часов; RT для комнатной температуры; sat. для насыщенный; TFA для трифторуксусной кислоты; DMF для N,N-диметилформамида; DCM для дихлорметана; Fmoc для 9-флуоренилметилоксикарбонила; HATU = 1-[бис-(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5 -b]пиридиния 3 -оксид гексафторфосфата; DIEA или DIPEA для диизопропилэтиламина; NMP для N-метилпирролидона; EDC для 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида; DMSO для диметилсульфоксида; MeOH для метанола; EtOAc для этилацетата; Et<sub>3</sub>N для триэтиламина; MeCN или ACN для ацетонитрила.

Аналитические данные: Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, проводимую в режиме регистрации положительно-заряженных ионов; "ESI-MS(-)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, проводимую в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, проводимую в режиме регистрации положительно заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, проводимую в режиме регистрации отрицательных ионов. Обнаруженные массы приводят после условного обозначения "m/z". Соединения с точными массами более 1000 часто опреде-

ляют как двухзарядные, трехзарядные ионы и/или четырехзарядные ионы. CAD: детектор заряженных аэрозолей. ELSD: испарительный детектор рассеяния света.

Условия А проведения LCMS-анализа: колонка: Waters Acuity UHPLC BEH C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 минут, затем удерживание в течение 1,0 минуты при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; обнаружение: масса.

Условие В проведения LCMS-анализа: колонка: Waters Acuity UHPLC BEH C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 минут, затем удерживание в течение 1,0 минуты при 100% В; скорость потока: 1,0 мл/мин; Обнаружение: масса.

Условие А проведения анализа UHPLC-CAD: колонка: Waters BEH Phenyl, 150×2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; профиль градиента: 10% В - 35% В в течение от 0 мин до 15 мин, 35% В - 95% В в течение от 16 мин до 25 мин, затем удерживание в течение 1,0 мин при 95% В; Время прогона: 4 мин (в начальных условиях исходной подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 3 мкл образца 2 мг/мл в DMSO; обнаружение: CAD в диапазоне 100 Па и газа 35 psi.

Условие В проведения анализа UHPLC-CAD: колонка: Waters BEH Phenyl, 150×2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; профиль градиента: 10% В-95% В в течение от 0 до 25 мин, затем удерживание в течение 1,0 мин при 95% В; Время прогона: 4 мин (в начальных условиях подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 3 мкл образца 2 мг/мл в DMSO; обнаружение: CAD в диапазоне 100 Па и газ 34 psi.

Общие методики.

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Если не указано иное, все методики проводили в полипропиленовом реакционном сосуде объемом 40 мл, снабженном нижней фриттой. Сосуд соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через нижнюю, так и через верхнюю часть сосуда. DMF может быть добавлен через верхнюю и нижнюю часть сосуда, что промывает вверх и вниз стороны сосуда в равной мере. Реагенты добавляли только через нижнюю часть сосуда и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть сосуда. "Периодическое возмущение" описывает краткий выброс газообразного N<sub>2</sub> через нижнюю фритту; выброс длится приблизительно 5 секунд и происходит каждые 30 секунд. Растворы аминокислот, как правило, не используют позже двух недель после приготовления. Растворы HATU использовали в течение двух недель после приготовления. DMF = диметилформамид; HATU = 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-б]пиридиний-3-оксида гексафторфосфат; DIPEA = диизопропилэтиламин; 2-хлортритилхлоридная смола = 2-хлортрифенилметилхлоридная смола (Chem-Impreg, 100-200 меш, желтые шарики, 1,1 мег/г). Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(<sup>t</sup>Bu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH; Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH; Fmoc-Val-OH. Следующие производные жирных кислот использовали для самой последней стадии сочетания, HO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, n = 10-18, и HO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu), n = 10-18.

Общая методика описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,4 ммоль, при этом масштаб определялся количеством (9Н-флуорен-9-ил)метил(2-(аминокси)этил)карбамата, связанного со смолой. Этот масштаб соответствует приблизительно 364 мг описанной выше смолы. Однако использовали 800 мг смолы исходя из предположения о том, что степень загрузки составляет 46%. Избыток 2-хлортрифенилметилхлорида гасили метанолом в конце реакции загрузки. Все методики могут быть выполнены в меньшем, чем 0,400 ммоль масштабе путем корректировки описанных объемов с помощью кратности масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса загрузки линкера и набухания смолы, описанного ниже как "Методика загрузки линкера" и "Методика набухания смолы". Затем для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина используют описанную ниже "Методику присоединения первичного амина". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина используют описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". Для глобального снятия защиты и отщепления от смол использовали описанную ниже "Методику глобального снятия защиты". Наконец, для приготовления прозрачного раствора, содержащего сырые продукты для очистки LC-MS, использовали описанную ниже "Методику приготовления образца".

Методика загрузки линкера. Масштаб 0,4 ммоль использовали для приготовления шести реакционных сосудов (RV) с загрузкой 0,4 ммоль (9Н-флуорен-9-ил)метил(2-(аминокси)этил)карбамата для

смола в каждом RV. DIEA (2,95 мл, 16,9 ммоль) добавляли к смеси гидрохлорида (9Н-флуорен-9-ил)метил(2-(аминоокси)этил)-карбамата (соединение 4, 0,803 г, 2,4 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (72 мл) при 0°C. Сразу после того, как он стал гомогенным, 12 мл этого прозрачного раствора добавляли в 30 мл флакон, содержащий 800 мг 2-хлортритилхлоридной смолы. Все 6 флаконов помещали на шейкер на 75 минут при 750 об/мин. Затем 0,2 мл MeOH добавляли в один флакон за раз, каждый встряхивая в течение 2 минут при 750 об/мин. Смолы переносили в 40 мл RV, промывали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 мл×3), DMF (8 мл×3),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл×3). Этот процесс (гашение MeOH и промывки  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) применяли к другим 5 флаконам с получением связанного со смолой соединения линкера 5 в шести RV.

Методика набухания смолы: Реакционные сосуды, содержащие смолы с предыдущей стадии, соединяли с пептидным синтезатором Prelude и трижды промывали (набухали) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (10 мл), после чего смесь периодически перемешивали в течение 10 минут, а затем растворитель сливали через фритту.

Методика присоединения первичного амина:

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об. 10,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 минут, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд снова добавляли пиперидин: DMF (20:80 об./об., 10,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 минут, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали через нижнюю часть один раз следующим образом: через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 минут, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор слили через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту или жирную кислоту (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.), NATU (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.) и DIPEA (0,8 М в DMF, 2,0 мл, 4 экв) в таком порядке. Смесь периодически перемешивали в течение 15 минут или 30 минут, затем раствор реакционной смеси сливали через фритту (15 минут времени реакции использовали только для самой первой реакции сочетания для образования первой амидной связи в синтезаторе Prelude; для всех других последовательностей применяли время реакции 30 минут). Смолу последовательно промывали три раза следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (8,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор сливали через фритту. К реакционной смеси добавляли DMF (3,3 мл), DIPEA (0,8 М в DMF, 1,5 мл, 3 экв.). После перемешивания смеси в течение 30 секунд добавляли уксусный ангидрид (1,0 М в DMF, 5,0 мл, 12,5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали через нижнюю часть один раз следующим образом: через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 минут, после чего раствор пропускали через фритту. Смолу последовательно промывали через верхнюю часть четыре раза следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения к вторичному амину:

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин: DMF (20:80 об./об. 10,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 минут, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд снова добавляли пиперидин: DMF (20:80 об./об., 10,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 минут, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали через нижнюю часть один раз следующим образом: через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 минут, после чего раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту или жирную кислоту (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.), NATU (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.) и DIPEA (0,8 М в DMF, 2,0 мл, 4 экв.) в этом порядке. Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно трижды промывали через верхнюю часть следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 2 мин, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд снова добавляли аминокислоту или жирную кислоту (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.), NATU (0,2 М в DMF, 4,0 мл, 2 экв.) и DIPEA (0,8 М в DMF, 2,0 мл, 4 экв.) в этом порядке. Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно трижды промывали через верхнюю часть следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (8,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (3,3 мл), DIPEA (0,8 М в DMF, 1,5 мл, 3 экв.).

После перемешивания смеси в течение 30 секунд добавляли уксусный ангидрид (1,0 М в DMF, 5,0

мл, 12,5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали через нижнюю часть один раз следующим образом: через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 минут, после чего раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (10,0 мл) и полученную смесь периодически перемешивали в течение 2 мин, после чего раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

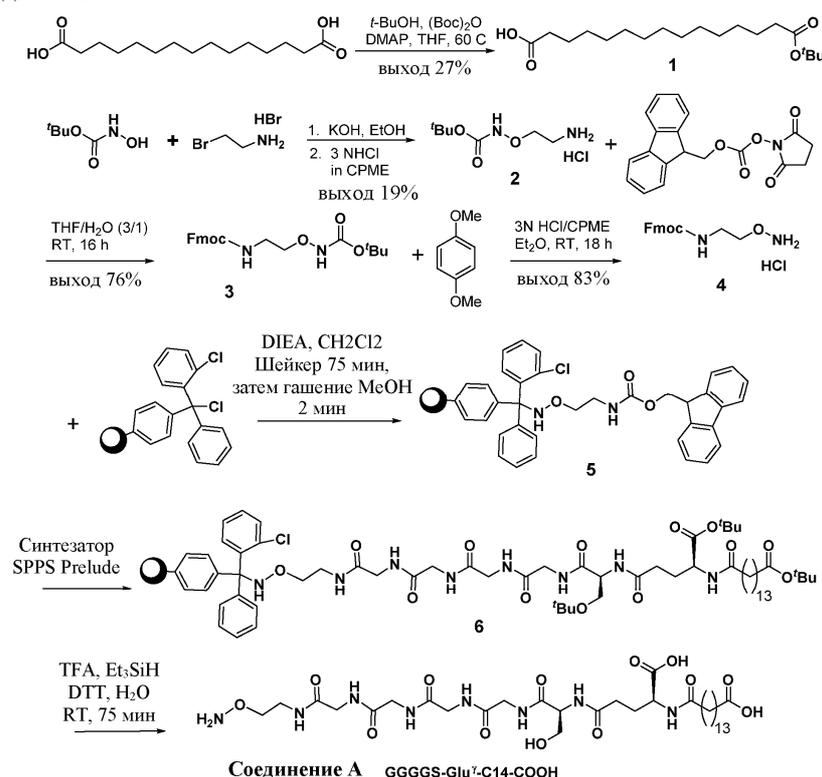
Методика глобального снятия защиты:

После того, как процедура на синтезаторе Prelude была завершена, каждый реакционный сосуд промывали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 мл×6) и оставляли сушиться на воздухе. Как только смола стала свободнотекучей, ее переносили во флакон на 30 мл и добавляли 8 мл раствора для расщепления (см. ниже). После перемешивания флакона в шейкере в течение 75 минут при 750 об/мин реакционную смесь фильтровали. Полученный прозрачный желто-коричневый раствор разделяли в четыре 25-мл пробирки, каждая из которых содержала 16 мл диэтилового эфира, что приводило к образованию белых суспензий. Каждую пробирку центрифугировали, дважды промывали диэтиловым эфиром с образованием белого твердого вещества в каждой из пробирок. Раствор для расщепления (50 мл) готовили следующим образом: в колбу Эрленмейера объемом 250 мл добавляли 500 мг дитиотреитола, 46 мл TFA, 2,5 мл воды и 1,0 мл триизопропилсилана при перемешивании с образованием прозрачного раствора.

Методика получения образцов:

В каждую пробирку, содержащую сырой продукт, полученный на предыдущей стадии, добавляли по порядку 0,4 мл DMSO и 0,4 мл MeOH. После перемешивания в течение 1 мин во многих случаях происходило образование прозрачного раствора. Однако, если твердые вещества все еще присутствовали в пробирке, добавляли дополнительное количество DMSO (0,2 мл) и смесь перемешивали в течение 2 минут. В этот момент, если твердые вещества оставались, прозрачный раствор удаляли и добавляли дополнительное количество DMSO (до 1,0 мл). Полученный прозрачный раствор подвергали препаративной LC-MS при 2,0 мл на инъекцию.

Синтез Соединения А



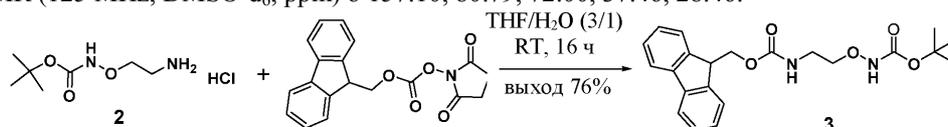
DMAP (2,80 г, 23,0 ммоль) добавляли к смеси пентадекадикарбоновой кислоты (25,0 г, 92,0 ммоль) в 2-Ме-THF (250 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли трет-бутанол (13,2 мл, 138 ммоль) и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 10 мин. После нагревания полученной суспензии при 60°C в течение 10 мин она становилась прозрачным бесцветным раствором. Раствор ВОС-ангидрида (26,0 г, 119 ммоль) в THF (100 мл) добавляли в течение 2 ч через делительную воронку с выровненным давлением к указанной выше реакционной смеси при 60°C. В конце добавления реакционная смесь превращалась в светло-розовый прозрачный раствор. Перемешивание продолжали при 60°C в течение 18 ч. После охлаждения до 0°C в течение 5 минут добавляли 100 мл 1,5 N HCl. Затем смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение

15 мин. После отделения органический слой промывали рассолом (250 мл×2), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Полученное вещество суспендировали в ацетонитриле (250 мл), перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и фильтровали для удаления непрореагировавшего дикислотного исходного материала. Затем фильтрат концентрировали приблизительно до 125 мл. Полученную суспензию перемешивали при 0°C в течение 2 ч, при этом суспензия становилась со временем более мутной. Полученное твердое вещество фильтровали, промывали холодным (0°C) ацетонитрилом (2×15 мл) и сушили с получением 15-(трет-бутокси)-15-оксопентадекановой кислоты (соединение 1, 8,20 г, 25,0 ммоль, выход 27,2%) в виде грязно-белого твердого вещества. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 2.35 (t, J= 7.58 Hz, 2H), 2.20 (t, J= 7.46 Hz, 2H), 1.68 - 1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34 - 1.24 (m, 18H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 179.91, 173.44, 79.93, 35.64, 34.08, 29.57, 29.48, 29.46, 29.41, 29.39, 29.29, 29.23, 29.09, 29.06, 28.12, 25.12, 24.70.

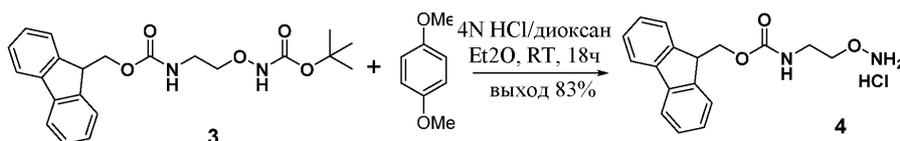
Следующие соединения получали в соответствии с вышеуказанной методикой, HO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu, n = 10 -18. Отделение целевого продукта - сложного моноэфира HO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu от непрореагировавшей дикислоты HO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H и чрезмерно прореагировавшего сложного диэфира <sup>t</sup>BuO<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu в каждом случае достигалось путем использования различия в их растворимости в ацетонитриле.



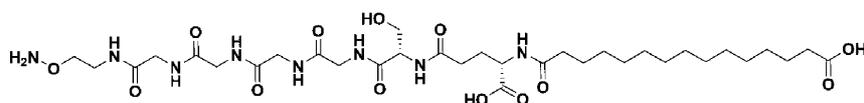
[1] Гидроксид калия (74,1 г, 1122 ммоль) добавляли порциями в течение 10 мин к прозрачному раствору трет-бутил N-гидроксикарбамата (50,0 г, 376 ммоль) в безводном этаноле (500 мл) при 0°C, используя механическую мешалку. После перемешивания при 0°C в течение 10 мин и затем при комнатной температуре в течение 20 мин реакционную смесь охлаждали до 0°C и порциями в течение 15 мин добавляли гидробромид 2-бромэтиламина (100 г, 488 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 30 мин и затем при комнатной температуре в течение 5 ч полученные белые суспензии фильтровали и осадок на фильтре промывали EtOH (40 мл×2). Объединенные фильтраты концентрировали до объема 100 мл, экстрагировали t-BuOMe (500 мл) и H<sub>2</sub>O (250 мл). После отделения водный слой экстрагировали t-BuOMe (200 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом (2×200 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением очень вязкой жидкости (20,0 г). Полученную жидкость растворяли в t-BuOMe (300 мл). К вышеуказанному прозрачному раствору по каплям добавляли HCl (3 M в циклопентилметиловом эфире) (40 мл, 120 ммоль) при комнатной температуре. Происходило образование белой суспензии. После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 ч полученные белые твердые вещества фильтровали, промывали t-BuOMe и сушили под вакуумом в течение 45 мин с получением трет-бутил-2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (соединение 2, 15,5 г, 72,9 ммоль, выход 19,4%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ 10.21 (br s, 1H), 8.27 (br s, 2.6H), 3.92 (t, J= 5.26 Hz, 2H), 2.98 (t, J= 5.26 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ 157.10, 80.79, 72.00, 37.46, 28.46.



[1] Бикарбонат натрия (8,00 г, 95 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси трет-бутил-2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (соединение 2, 13,5 г, 63,5 ммоль), Fmoc-OSu (25,7 г, 76,0 ммоль) в THF (450 мл) и воде (150 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи все летучие компоненты удаляли под вакуумом. Остаток экстрагировали EtOAc (400 мл, 200 мл) после насыщения водного слоя твердым NaCl. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали. Остаток подвергали флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя смесью EtOAc/гексаны. Более чистые фракции объединяли, концентрировали и остаток повторно очищали, используя вышеуказанные условия. И вновь более чистые фракции объединяли и концентрировали. Остаток очищали в третий раз, используя идентичные условия. Чистые фракции объединяли, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением соединения 3 (соединение 3, 19,2 г, 48,2 ммоль, выход 76%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 7.78 (d, J= 7.32 Hz, 2H), 7.65 (d, J= 7.32 Hz, 2H), 7.63, (s, 1H), 7.42 (t, J= 7.32 Hz, 2H), 7.33 (t, J= 7.232 Hz, 2H), 6.00 (br s, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.26 (t, J= 7.10 Hz, 1H), 3.91 (t, J= 4.20 Hz, 2H), 3.49 - 3.46 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 157.54, 156.90, 144.06, 141.32, 127.68, 127.08, 125.23, 119.96, 82.11, 75.66, 66.91, 47.30, 39.23, 28.24.



[1] HCl (100 мл, 400 ммоль, 4M в диоксане) добавляли при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения 3 (8,6 г, 21,6 ммоль), 1,4-диметоксибензола (7,46 г, 54,0 ммоль) в диэтиловом эфире (100 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи смесь превращалась в густую суспензию, которую сложно было перемешивать. Добавляли дополнительное количество эфира (400 мл) и полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем ее фильтровали в атмосфере азота и твердые вещества промывали эфиром (3×100 мл) с получением соединения 4 (6,36 г, 19,0 ммоль, выход 87%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ 11.10 (br, s, 2.60 H), 7.89 (d, J = 7.58 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 7.34 Hz, 2H), 7.54 (br t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 4.31 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 4.23 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 5.38 Hz, 2H), 3.28 (q, J = 5.22 Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ 156.74, 144.32, 141.22, 128.11, 127.57, 125.64, 120.60, 73.50, 66.08, 47.17, 38.91.

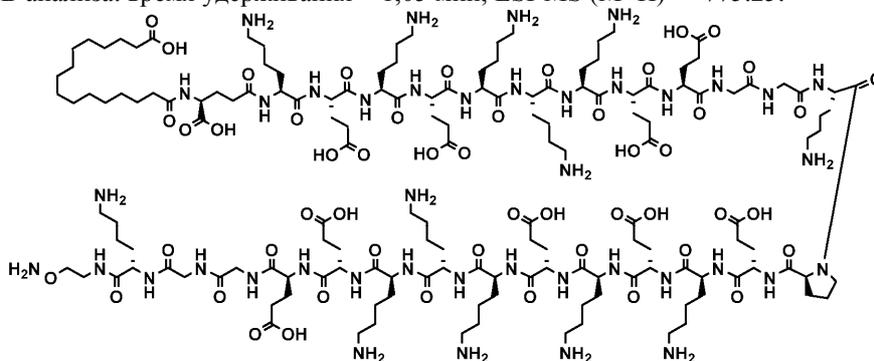
GGGGS-Glu<sup>γ</sup>-C14-COOH

Соединение А

Сырой материал очищали препаративной LC/MS, используя следующие условия: колонка: XBridge CSH C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 0-34,9% В в течение 23 минут, затем удерживание в течение 2 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий целевой продукт, охлаждали до -78°C в потоке азота и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения А в виде белого твердого вещества (88 мг, выход 25,9%, чистота по LC-CAD 98,6%).

Условие А анализа: время удерживания = 1,24 мин; ESI-MS (M+H)<sup>+</sup> = 775.30.

Условия В анализа: время удерживания = 1,05 мин; ESI-MS (M+H)<sup>+</sup> = 775.25.

KGGEEKKKEKPKGGEEKKKEK-Glu<sup>γ</sup>-C15-COOH

Точная масса:3496,97

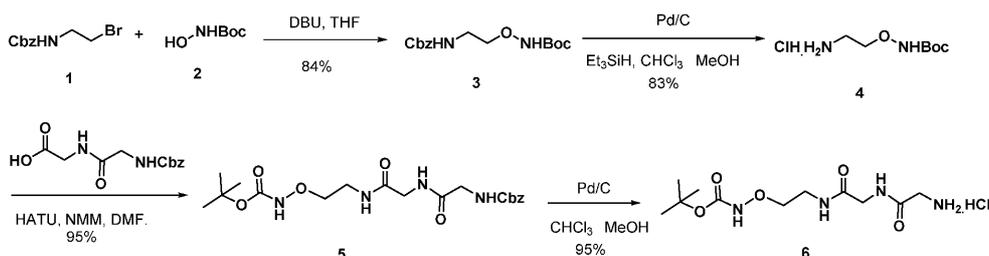
Сырой продукт очищали препаративной LC/MS, используя следующие условия: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 20-70% В в течение 20 минут, затем удерживание в течение 5 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, охлаждали до -78°C в потоке азота и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (47 мг, выход 3,4%, чистота по LC-CAD 72%).

Условие А анализа: время удерживания = 1,14 мин; ESI-MS (M+3H)<sup>3+</sup> = 1166.90, (M+3H)<sup>4+</sup> = 875.45.

Условия В анализа: время удерживания = 0,991 мин; ESI-MS (M+3H)<sup>3+</sup> = 1166.90, (M+3H)<sup>4+</sup> = 875.50.

Пример 5. Синтез РК-энхансера в растворе

Раскрытые в настоящем документе РК-энхансеры могут быть получены с использованием методик, приведенных в качестве примера ниже.

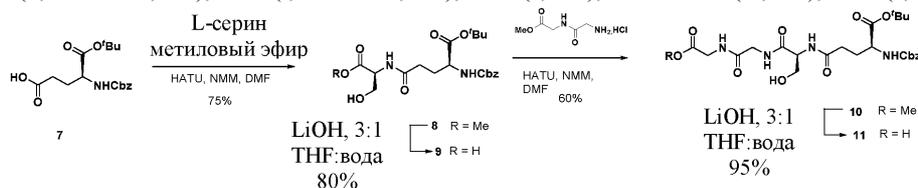


Бензил (2-(((трет-бутоксикарбонил)амино)окси)этил)карбамат, 3. DBU (26,3 мл, 174 ммоль) добавляли порциями к перемешиваемой смеси бензил (2-бромэтил)карбамата (30 г, 116 ммоль) и трет-бутилгидроксикарбамата (24,76 г, 186 ммоль) в THF (75 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре (наблюдалось выпадение осадка). Анализ LCMS показал только следовое количество оставшегося исходного материала. Реакционную смесь концентрировали, гасили водой, экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фазу объединяли, промывали водой, рассолом, затем сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После концентрирования получали 45 г сырого продукта и подвергали хроматографическому разделению (0-20% ацетона в гексане). После разделения бензил (2-(((трет-бутоксикарбонил)амино)окси)этил)карбамат (32,9 г, 106 ммоль, выход 91%) получали в виде очень вязкого светло-желтого масла.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHLOROFORM-d}$ )  $\delta$  7.43 - 7.30 (m, 5H), 5.75 (br. s., 1H), 5.32 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.94 - 3.85 (m, 2H), 3.54 - 3.42 (m, 2H), 1.50 (s, 9H).

трет-Бутил (2-аминоэтокси)карбамата гидрохлорид, 4. Бензил (2-(((трет-бутоксикарбонил)амино)окси)этил)карбамат (16,4 г, 52,8 ммоль) растворяли в MeOH (161 мл) и хлороформе (5,33 мл, 66,1 ммоль). Раствор продували азотом перед осторожным добавлением Pd/C (2,81 г, 2,64 ммоль). Затем раствор охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и медленно по каплям добавляли триэтилсилан (76 мл, 476 ммоль). Во время добавления наблюдалось выделение  $\text{H}_2$ , и оно было экзотермическим. После добавления реакцию смесь оставляли для постепенного нагревания до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и промывали дополнительным количеством метанола перед упариванием в вакууме. Затем остаток растирали с гексаном и полученное твердое вещество фильтровали, промывали дополнительным количеством гексана и оставляли для высыхания под вакуумом с получением трет-бутил 2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (10,2 г, 48,0 ммоль, выход 91%) в виде розоватого твердого вещества.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHLOROFORM-d}$ )  $\delta$  8.78 (br. s., 1H), 8.31 (br. s., 2H), 4.24 (s., 2H), 3.39 (s., 2H), 1.48 (s, 9H).

трет-Бутил ((3,6,9-триоксо-1-фенил-2-окса-4,7,10-триазадодекан-12-ил)-окси)карбамат, 5. N-Метилморфолин (5,17 мл, 47,2 ммоль) добавляли по каплям к раствору трет-бутил 2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (4 г, 18,81 ммоль), 2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)ацетида)уксусной кислоты (5,01 г, 18,81 ммоль) и HATU (7,87 г, 20,69 ммоль) в безводном DMF (75 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом и промывали 1 N HCl. Затем отделенный водный слой экстрагировали дополнительной порцией этилацетата, и объединенные органические слои затем промывали 1 N HCl, рассолом, насыщенным раствором бикарбоната натрия с последующей дополнительной промывкой рассолом. Органический слой затем сушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и упаривали в вакууме. Затем сырой продукт очищали колоночной хроматографией, используя смесь этилацетат-гексан в качестве элюента, с получением 6,25 г (78%) указанного в заголовке соединения.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHLOROFORM-d}$ )  $\delta$  7.69 (s, 1H), 7.41 - 7.28 (m, 6H), 7.00 - 6.87 (m, 1H), 5.81 (br s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.98 (dd,  $J=16.7$ , 5.7 Hz, 4H), 3.86 (t,  $J=4.8$  Hz, 2H), 3.55 - 3.46 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). MS  $m/e$  447.0 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ).

трет-Бутил (2-(2-(2-аминоацетида)ацетида)этокси)карбамата гидрохлорид, 6. Соединение 5 (6,25 г, 14,72 ммоль) растворяли в безводном метаноле (58,9 мл) и добавляли хлороформ (1,782 мл, 22,09 ммоль) с последующим Pd-C (1,567 г, 1,472 ммоль). Реакционную колбу затем продували водородом (баллон) и оставляли перемешиваться в течение 6 ч, затем фильтровали через целит и упаривали с получением трет-бутил 2-(2-(2-аминоацетида)ацетида)этоксикарбамата гидрохлорида (4,87 г, 14,90 ммоль, выход 101%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10.00 (br s, 1H), 8.71 (br t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 8.18 - 7.99 (m, 4H), 3.77 (d,  $J=5.1$  Hz, 2H), 3.69 (t,  $J=5.9$  Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.36 - 3.23 (m, 3H), 1.41 (s, 9H).



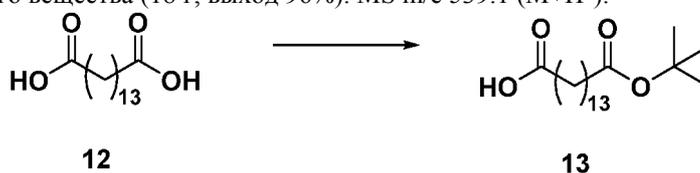
(S)-трет-Бутил 2-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-(((S)-3-гидрокси-1-метокси-1-оксопропан-2-ил)амино)-5-оксопентаноат, 8. (S)-4-(((Бензилокси)-карбонил)амино)-5-(трет-бутоксикарбонил)-5-оксопентановую кислоту (7., приобретенную у фирмы ChemImprex) (15 г, 44,5 ммоль) и (S)-метил 2-амино-3-

гидроксипропаноата гидрохлорид (6,92 г, 44,5 ммоль) растворяли в DMF (148 мл) и раствор охлаждали до 0°C. Добавляли НАТУ (18,60 г, 48,9 ммоль) с последующим N-метилморфолином (12,22 мл, 111 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 12 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc, гасили 1 N HCl, затем промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и рассолом. Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищали путем хроматографической очистки (0-40% ацетон/гексан) с получением (S)-трет-бутил 2-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-(((S)-3-гидрокси-1-метокси-1-оксопропан-2-ил)-амино)-5-оксопентаноата (16,31 г, 36,5 ммоль, выход 82%) в виде грязно-белого твердого вещества. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.37 (m, 5H), 6.5 (bs, 1H), 5.53 (m, 1H); 5.1 (s, 2H), 4.7 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.1 (bs, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 2.4 (m, 2H), 2.3 (M, 1H), 1.7 (m, 1H), 1.5 (s, 9H); MS m/e 439.2 (M+H<sup>+</sup>).

(S)-2-((S)-4-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутоксипропан-2-ил)-амино)-5-оксопентаноат (14 г, 31,9 ммоль) растворяли в THF (106 мл) и воде (53,2 мл) и охлаждали до 0°C. После перемешивания в течение 30 минут добавляли LiOH (0,688 г, 28,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при этой температуре в атмосфере N<sub>2</sub>. После завершения реакции pH реакционной смеси доводили до ~4 при 0°C. Реакционную смесь экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенную органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали на ротационном испарителе с получением (S)-2-((S)-4-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутоксипропан-2-ил)-амино)-5-оксопентаноата (13,01 г, 30,7 ммоль, выход 96%) в виде грязно-белого твердого вещества. MS t/e 425.0 (M+H<sup>+</sup>).

(5S, 10S)-метил 5-(трет-бутоксикарбонил)-10-(гидроксиметил)-3,8,11,14-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,9,12,15-тетраазагептадекан-17-оат, 10. Метил 2-(2-аминоацетида)ацетата гидрохлорид (5 г, 27,4 ммоль) растворяли в DMF (116 мл) и загружали (S)-2-((S)-4-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутоксипропан-2-ил)-амино)-5-оксопентаноат (11,62 г, 27,4 ммоль). К этой реакционной смеси добавляли НАТУ (11,45 г, 30,1 ммоль) и N-метилморфолин (7,53 мл, 68,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 12 ч. LC/MS и HPLC показали завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (150 мл) и гасили 1 N HCl. Органический слой отделяли и промывали рассолом (50 мл), водн. NaHCO<sub>3</sub> (50 мл) и, наконец, рассолом (3×50 мл). Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме с получением желаемого продукта в виде густого масла, которое подвергали хроматографической очистке (0-10% MeOH/DCM) с получением желаемого продукта (5S, 10S)-метил 5-(трет-бутоксикарбонил)-10-(гидроксиметил)-3,8,11,14-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,9,12,15-тетраазагептадекан-17-оата (14 г, 25,3 ммоль, выход 93%) в виде густого масла. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.38 (m, 5H), 5.1 (m, 2H), 4.0 (m, 6H), 3.7(s, 3H), 2.4(m, 2H), 2.2(M, 1H), 1.9(m, 1H), 1.45(s, 9H); MS m/e 553.2 (M+H<sup>+</sup>).

(5S, 10S)-5-(трет-Бутоксикарбонил)-10-(гидроксиметил)-3,8,11,14-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,9,12,15-тетраазагептадекан-17-оат, 11. (5S, 10S)-метил 5-(трет-бутоксикарбонил)-10-(гидроксиметил)-3,8,11,14-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,9,12,15-тетраазагептадекан-17-оат (20 г, 36,2 ммоль) растворяли в THF (193 мл) и воде (97 мл), и охлаждали до 0°C. После перемешивания в течение 30 минут добавляли LiOH (0,780 г, 32,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 5 ч. Развитие реакции контролировали с помощью LC/MS and HPLC. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли EtOAc (150 мл) и нейтрализовали 1 N HCl. Органическую фазу отделяли, и водную фазу экстрагировали EtOAc (3×50 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали в вакууме и сушили под высоким вакуумом в течение 12 ч с получением желаемого продукта в виде грязно-белого твердого вещества (18 г, выход 96%). MS m/e 539.1 (M+H<sup>+</sup>).



15-(трет-Бутоксипропан-2-ил)-15-оксопентадекановая кислота, 13. Суспензию пентадекандикарбоновой кислоты (20,2 г, 70,5 ммоль) в уксусном ангидриде (70 мл) нагревали до 128°C в атмосфере Ar. Полученный раствор перемешивали при этой температуре в течение 6,0 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Раствор разбавляли толуолом (100 мл) и упаривали. Остаток отгоняли с толуолом (4×80 мл) и сушили под вакуумом в течение 6,5 ч с получением 27,53 г грязно-белого твердого вещества. К смеси указанного выше твердого вещества (27,53 г) и трет-бутанола (235 мл) при комнатной температуре и в атмосфере Ar добавляли 4-диметиламинопиридин (34,8 г, 282 ммоль) тремя порциями в течение 15 мин. Смесь нагревали до 50°C и полученный раствор перемешивали при этой температуре в течение 34,0 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли толуолом (50 мл) и упаривали. Остаток отгоняли с толуолом (2×100 мл) и затем поглощали в смеси 9/1 эфир/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 мл). Раствор промывали 1 M HCl (400 мл), 0,5 M HCl (400 мл), водой (300 мл) и рассолом (300 мл). Органический слой сушили

(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и упаривали. Сырой продукт поглощали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) и обрабатывали ультразвуком. Полученную суспензию фильтровали через воронку с фриттой средней пористости, и твердое вещество в воронке промывали двумя небольшими порциями CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Фильтрат и промывки объединяли и упаривали. Концентрат подвергали хроматографии (120 г картридж для колоночной флэш-хроматографии, от CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> до 9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/i-PrOH) с получением в порядке элюирования:

смеси ~5/1 (7,19 г, бесцветное масло) ди-трет-бутил пентадекандиоата и 15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты;

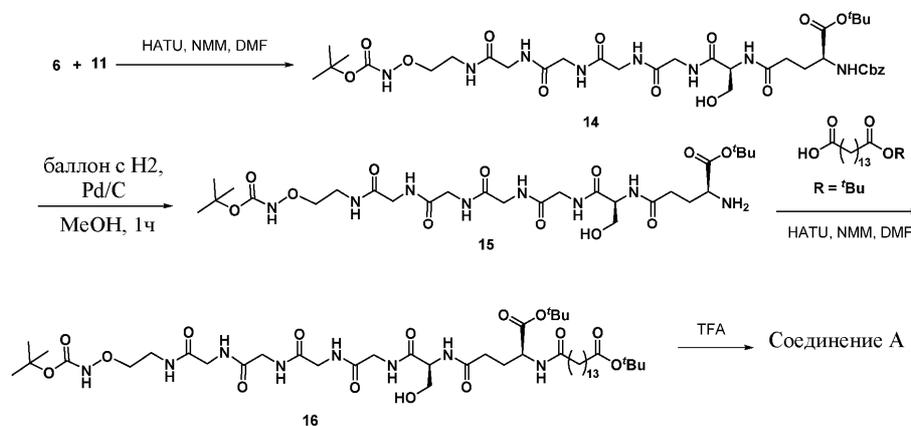
15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты (4,38 г, выход 19%) в виде белого твердого вещества: LC/MS [M-H]<sup>-</sup> = 327; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.37 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.22 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.28 (m, 18H);

смеси ~4/1 (4,42 г, грязно-белое твердое вещество) 15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты и пентадекандикарбоновой кислоты.

Смесь ди- и моно- трет-бутиловых эфиров (7,19 г) разделяли хроматографией (120 г картридж флэш-колонки, от CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> до 9/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/iPrOH) с получением дополнительного количества количества 15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты (0,8 г, выход 4%) в виде белого твердого вещества.

Смесь моно- трет-бутилового эфира и дикислоты (4,42 г) разделяли хроматографией (330 г картридж флэш-колонки, от гексана до смеси 4/1 гексан/ацетон) с получением дополнительного количества 15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты (2,92 г, выход 13%) в виде белого твердого вещества.

Общее выделенное количество 15-(трет-бутоксидека)-15-оксопентадекановой кислоты составило 8,1 г (выход 36%).



трет-Бутил N2-((бензилокси)карбонил)-N5-((S)-1-((2-((2-((2-((2,2-диметил-4,10-диоксо-3,6-диокса-5,9-диазаундекан-11-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-3-гидрокси-1-оксопропан-2-ил)-L-глутаминат, 14. трет-Бутил 2-(2-(2-аминоацетида)ацетида)этоксикарбамата гидрохлорид (3,73 г, 11,41 ммоль) и (5S, 10S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-10-(гидроксиметил)-3,8,11,14-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,9,12,15-тетраазагептадекан-17-оевую кислотку (5,85 г, 10,87 ммоль) растворяли в DMF (36,2 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота. Раствор охлаждали до 0°C перед добавлением HATU (4,55 г, 11,96 ммоль) с последующим добавлением по каплям N-метилморфолина (2,99 мл, 27,2 ммоль). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, затем гасили ледяной водой и интенсивно перемешивали по мере того, как таял лед. Когда весь лед растаял вокруг колбы, образовалось вещество, которое затем фильтровали через вакуумный фильтр в течение ночи (медленно). Полученное воскообразное твердое вещество растворяли в метаноле (200 мл) перед упариванием. Обработка метанолом (приблизительно 20 мл) с последующим добавлением диэтилового эфира обеспечило затем получение продукта, который собирали путем аспирации с получением 6,4 г (23S, 28S)-трет-бутил 28-(((бензилокси)карбонил)амино)-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25-гептаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24-гептаазанона козан-29-оата (выход 73%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.96 (br s, 1H), 8.24 - 8.01 (m, 5H), 7.87 (br t, J=5.6 Hz, 1H), 7.62 (br d, J=7.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 5H), 5.10 - 4.96 (m, 3H), 4.30 - 4.24 (m, 1H), 4.10 (q, J=5.3 Hz, 3H), 3.93 - 3.84 (m, 1H), 3.80 - 3.53 (m, 13H), 3.31 - 3.23 (m, 2H), 3.17 (d, J=5.3 Hz, 7H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.35 - 2.20 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.82 - 1.71 (m, 1H), 1.42 - 1.24 (m, 20H). MS m/e 811.4 (M+H<sup>+</sup>).

трет-Бутил N5-((S)-1-((2-((2-((2,2-диметил-4,10-диоксо-3,6-диокса)-5,9)-диазаундекан-11-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-амино)-3-гидрокси-1-оксопропан-2-ил)-L-глутаминат, 15. Метанол (158 мл) добавляли одной порцией к (23S,28S)-трет-бутил 28-(((бензилокси)карбонил)амино)-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25-гептаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24-гептаазанонакозан-29-оату (6,4 г, 7,89 ммоль) и твердое вещество перемешивали в атмосфера азота до тех пор, пока не растворится амин (приблизительно 3 часа). Затем добавляли Pd/C (0,840 г, 0,789 ммоль) и затем через баллон вводили атмосферу водорода. Реакционную смесь оставляли

перемешиваться при комнатной температуре, затем фильтровали через стеклянную фильтровальную бумагу и фильтрат упаривали с получением 4,8 г (23S,28S)-трет-бутил 28-амино-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25-гептаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24-гептаазанокозан-29-оата (выход 90%) в виде грязно-белого рассыпчатого твердого вещества.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.96 (br s, 1H), 8.29 - 8.19 (m, 1H), 8.17 - 7.96 (m, 3H), 7.87 (br t, J=5.7 Hz, 1H), 5.00 (br s, 1H), 4.28 - 4.08 (m, 1H), 3.78 - 3.56 (m, 10H), 3.30 - 3.14 (m, 3H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.34 - 2.06 (m, 3H), 1.87 - 1.74 (m, 1H), 1.68 - 1.50 (m, 1H), 1.41 (d, J=4.3 Hz, 15H), 1.10 (s, 1H).

трет-Бутил (23S,28S)-28-(трет-бутоксикарбонил)-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25,30-октаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24,29-октаазатетратратан-44-оат, 16 N-метилморфолин (1,950 мл, 17,73 ммоль) добавляли по каплям к частичному раствору (23S,28S)-трет-бутил 28-амино-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4, 10, 13,16,19,22,25-гептаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24-гептаазанокозан-29-оата (4,8 г, 7,09 ммоль), 15-(трет-бутокси)-15-оксопентадекановой кислоты (2,446 г, 7,45 ммоль) и HATU (2,97 г, 7,80 ммоль) при 0°C в атмосфере азота. Добавляли дополнительно 20 мл DMF для растворения реакционной смеси, которую затем оставляли для медленного нагревания до комнатной температуры в течение ночи. Затем реакционную смесь охлаждали в порции льда, а затем гасили льдом и оставляли для расплавления при интенсивном перемешивании смеси. Затем твердое вещество фильтровали с получением твердое вещество в виде смолы (6,1 г), которое переносили в SFC для очистки. Очистка SFC обеспечила получение (23S,28S)-трет-бутил 28-(трет-бутоксикарбонил)-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25,30-октаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24,29-октааза тетратетраконтан-44-оата (2,5 г, 2,53 ммоль, выход 35,7%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.96 (br s, 1H), 8.23 - 8.02 (m, 1H), 7.97 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 7.84 (t, J=5.8 Hz, 1H), 4.96 (t, J=5.6 Hz, 1H), 4.32 - 4.21 (m, 1H), 4.17 - 4.03 (m, 1H), 3.85 (d, J=6.0 Hz, 1H), 3.76 (br d, J=5.1 Hz, 1H), 3.72 - 3.55 (m, 1H), 3.30 - 3.24 (m, 1H), 2.27 - 2.07 (m, 1H), 2.01 - 1.86 (m, 1H), 1.80 - 1.65 (m, 1H), 1.49 - 1.38 (m, 5H), 1.35 (br s, 1H), 1.29-1.16 (m, 4H). MS m/e 987.7 (M+H $^+$ ).

(17S,22S)-1-(аминокси)-22-карбоксо-17-(гидроксиметил)-4,7,10,13,16,19,24-гептаоксо-3,6,9,12,15,18,23-гептаазаоктатриаконтан-38-оая кислота, соединение А. (23S,28S)-трет-бутил 28-(трет-бутоксикарбонил)-23-(гидроксиметил)-2,2-диметил-4,10,13,16,19,22,25,30-октаоксо-3,6-диокса-5,9,12,15,18,21,24,29-октаазатетратетраконтан-44-оат (2,5 г, 2,53 ммоль) растворяли в 25 мл + 10 мл промывочной охлажденной смеси 92: 8 TFA:TIPS. Раствор добавляли непосредственно к белому твердому веществу и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 3 ч. Раствор охлаждали до 0°C и перед тем, как перенести в холодильник на ночь, добавляли 320 мл гептана:40 мл МТВЕ. Прозрачное масло отделялось и было видно на дне колбы. Супернатант удаляли и добавляли холодный диэтиловый эфир (1 л). Полученное белое твердое вещество перемешивали в течение 2 ч перед быстрой фильтрацией и сушкой в воронке Бюхнера с получением 2,1 г (17S,22S)-1-(аминокси)-22-карбоксо-17-(гидроксиметил)-4,7,10,13,16,19,24-гептаоксо-3,6,9,12,15,18,23-гептаазаоктатриаконтан-38-оая кислоты (выход 95%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.42 - 8.34 (m, 1H), 8.20 - 7.95 (m, 3H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.61 (dd, J=10.9, 4.6 Hz, 1H), 4.48 (dd, J=10.8, 7.5 Hz, 1H), 4.30 - 4.03 (m, 1H), 3.93 - 3.30 (m, 10H), 2.47 - 2.39 (m, 1H), 2.33 (dt, J=3.7, 1.9 Hz, 1H), 2.27 - 2.08 (m, 3H), 2.05 - 1.91 (m, 1H), 1.82 - 1.69 (m, 1H), 1.52 - 1.43 (m, 2H), 1.24 (s, 9H), 1.21 - 1.00 (m, 1H). Анализ HPLC с детекцией CAD показал чистоту 81%, Agilent 1100 LC/UV/CAD, ACE C18-300 300x4,6 мм ID, 5 мкм, А: Вода, 0,05%TFA;В: ACN, 0,05%TFA.

Пример 6: Синтез дополнительных РК-энхансеров в растворе

Условие А для анализ LCMS: колонка: Waters Acuity UHPLC VEN C18, 2,1x 50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 минут, затем удерживание в течение 1,0 мин при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; Детекция: масса.

Условие В для анализа LCMS: колонка: Waters Acuity UHPLC VEN C18, 2,1x 50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 mM ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 минут, затем удерживание в течение 1,0 минуты при 100% В; скорость потока: 1,0 мл/мин; обнаружение: масса.

Условие А анализ UHPLC-ELSD: условия HPLC: колонка: Waters VEN C18, 150x2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; градиентный профиль: от 10% В до 50% В от 0 мин до 15 мин, от 50% В до 60% В от 16 мин до 20 мин, от 60% В до 95% В от 21 мин до 26 мин, затем удерживание в течение 4,0 мин при 95% В; Время прогона: 4 мин (в начальных условиях подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 5 мкл образца 1 мг/мл в смеси 50/50 MeCN/вода;

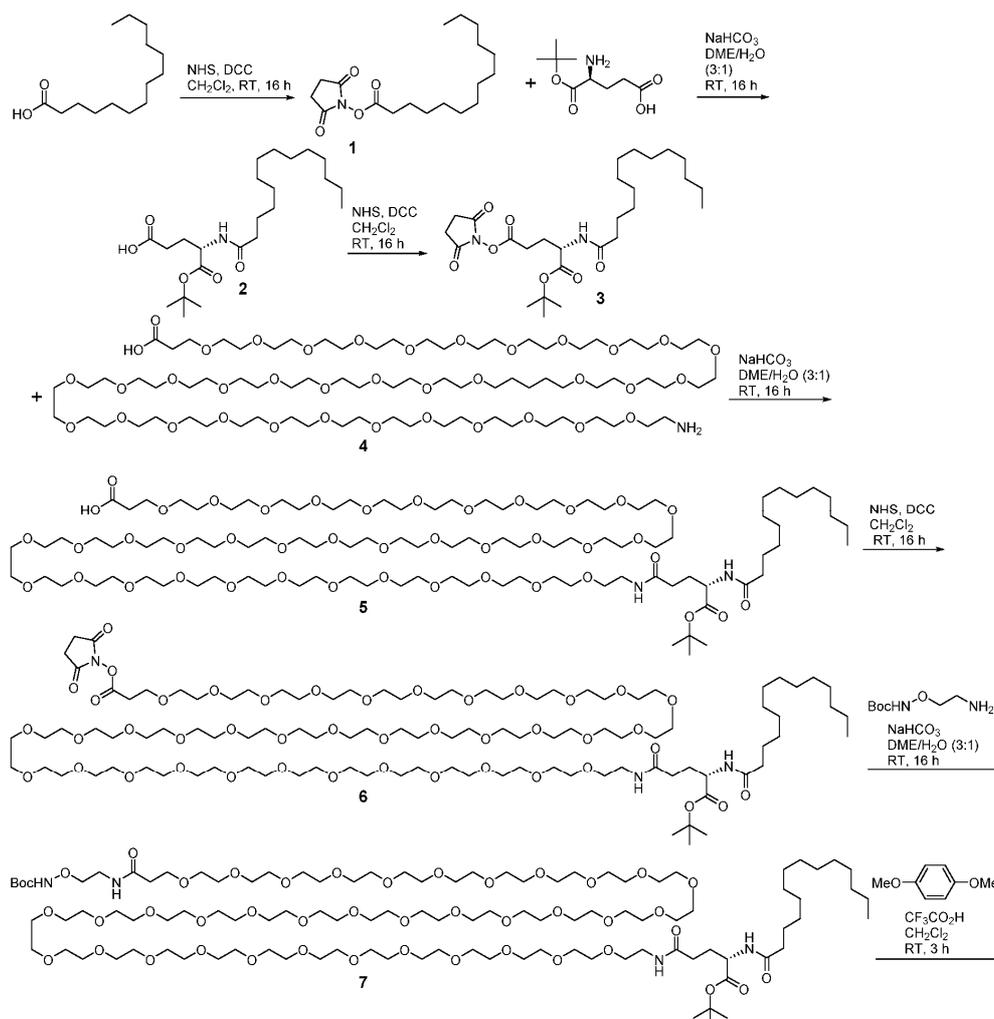
Условия MS: диапазон масс m/z 120 - 2000. Ионизация и режим: ионизация электрораспылением, режим положительных ионов. Условия ELSD: Усиление: 20. Температура трубки дрейфа: 60°C. Расход газа: 40 psi.

Условие В анализа UHPLC-ELSD: условия HPLC: колонка: Waters BEH CSH C18, 150×2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; градиентный профиль: 10% В - 95% В от 0 мин до 24 мин, затем удерживание в течение 3,0 мин при 95% В; время прогона: 4 мин (в начальных условиях подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 2 мкл образца 1 мг/мл в смеси 50/50 MeCN/вода; Условия MS: диапазон масс  $m/z$  120 - 2000. Ионизация и режим: ионизация электрораспылением, режим положительных ионов. Условия ELSD: усиление: 50. температура трубки дрейфа: 60°C. Расход газа: 40 psi

Условие С анализа UHPLC-CAD: условия HPLC: колонка: Waters BEH Phenyl, 150×2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; градиентный профиль: 10% В - 95% В от 0 до 25 минут, затем удерживание в течение 2,0 мин при 95% В; время прогона: 4 мин (в начальных условиях подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 5 мкл образца 1 мг/мл в MeOH; Условия MS: диапазон масс  $m/z$  120 - 2000. Ионизация и режим: ионизация электрораспылением, режим положительных ионов. Условия CAD: Диапазон: 100PA. Расход газа: 35 psi.

Условие D анализа UHPLC-CAD: условия HPLC: колонка: Waters BEH Phenyl, 150×2,1 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 35°C; градиентный профиль: 10% В - 35% В от 0 мин до 15 мин, 35% В - 95% В от 16 мин до 25 мин, затем удерживание в течение 2,0 мин при 95% В; время прогона: 3 минуты (в начальных условиях подвижной фазы); скорость потока: 0,35 мл/мин; объем инъекции: 2 мкл образца 1 мг/мл в смеси 50/50 MeOH/вода; Условия MS: диапазон масс  $m/z$  120 -2000. Ионизация и режим: ионизация электрораспылением, режим положительных ионов. Условия CAD: диапазон: 100PA. расход газа: 35 psi.

Синтез PEG<sub>36</sub>-Glu<sup>γ</sup>-C<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub> (8).



2,5-Диоксопирролидин-1-ил тетрадеканоат (1). DCC в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1M, 99 мл, 99 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору тетрадекановой кислоты (20,55 г, 90 ммоль) в DMF (100 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом. Полученные твердые вещества суспендировали в смеси эфир/гексаны (1:3, 80 мл) в течение 45 минут, собирали путем фильтрации и сушили с получением 2,5-диоксопирролидин-1-ил тетраде-

каноата (1) (16,96 г, 52,1 ммоль, выход 58%) в виде белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

(S)-5-(трет-Бутоксид)-5-оксо-4-тетрадеканамидопентановая кислота (2). Воду (150 мл) добавляли к перемешиваемой смеси (S)-4-амино-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентановой кислоты (10,5 г, 51,7 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-ил тетрадеканоата (1) (16,81 г, 51,7 ммоль) и  $\text{NaHCO}_3$  (5,21 г, 62,0 ммоль) в DME (450 мл). Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. DME удаляли под вакуумом, а затем добавляли водный раствор  $\text{HCl}$  (1 М, 67,2 мл, 67,2 ммоль) для доведения pH до 2-3. Полученную суспензию перемешивали при 0°C в течение 30 мин, а затем фильтровали. Полученное белое твердое вещество подвергали азеотропной сушке с DME (2х), затем суспендировали в смеси эфир/гексаны 1:3 (160 мл) при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученное белое твердое вещество собирали путем фильтрации и сушили под высоким вакуумом с получением (S)-5-(трет-бутоксид)-5-оксо-4-тетрадеканамидопентановой кислоты (2) (8,5 г, 21 ммоль, выход 40%), которую использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

(S)-1-трет-Бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-2-тетрадеканамидопентандиоат (3). DCC в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1М, 26,6 мл, 26,6 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси (S)-5-(трет-бутоксид)-5-оксо-4-тетрадеканамидопентановой кислоты (2) (10,0 г, 24,2 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (3,06 г, 26,6 ммоль) в DMF (30 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью  $\text{EtOAc}$ /гексаны (1:2) с получением (S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-2-тетрадеканамидопентандиоата (3) (8,95 г, 17,5 ммоль, выход 73%) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  6.29 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.58 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.70 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (m, 20H), 0.86 (t,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm 173.0, 170.3, 168.7, 167.6, 82.4, 51.2, 36.0, 31.5, 29.29, 29.27, 29.25, 29.11, 28.97, 28.92, 27.6, 27.15, 27.10, 25.21, 25.11, 22.3, 13.7.

Соединение 5. Воду (4,5 мл) добавляли при комнатной температуре к перемешиваемой смеси соединения 4 (750 мг, 0,448 ммоль), (S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-2-тетрадеканамидопентандиоата 3 (297 мг, 0,582 ммоль) и  $\text{NaHCO}_3$  (75 мг, 0,90 ммоль) в DME (13,5 мл). После перемешивания полученного прозрачного раствора при комнатной температуре в течение ночи добавляли водный раствор  $\text{HCl}$  (1М, 0,896 мл, 0,896 ммоль) и смесь концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}$ /водн. $\text{NH}_4\text{OAc}$  (контроль с помощью ELSD-MS).

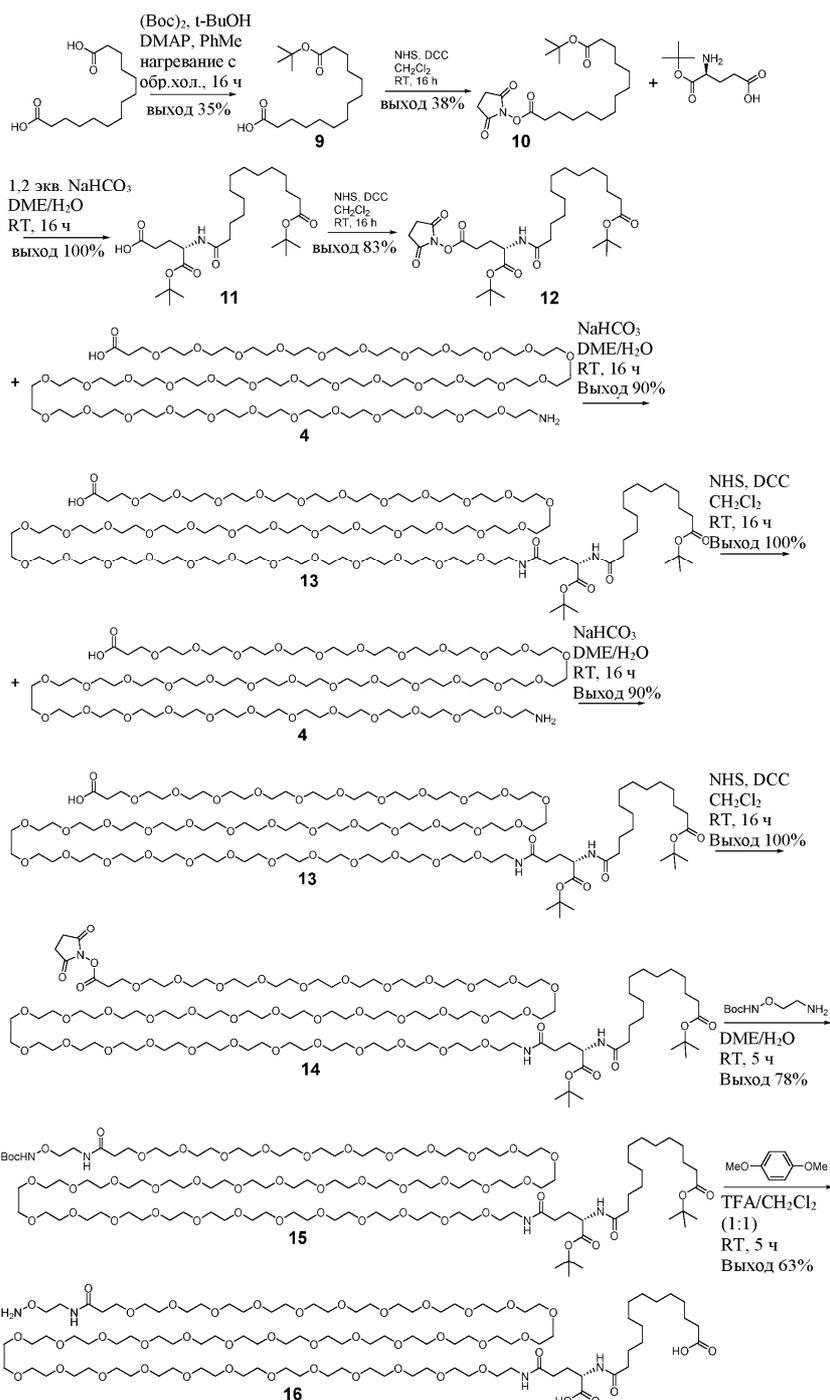
Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 5 (610 мг, выход 66%) в виде белого твердого вещества.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1036,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  691.

Соединение 6. DCC в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 М, 0,32 мл, 0,32 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 5 (550 мг, 0,266 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (36,7 мг, 0,319 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением соединения 6 в виде белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Соединение 7. Воду (2,5 мл) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 6 (577 мг, 0,266 ммоль), трет-бутил-2-аминоэтоксикарбамата (Miao, Z.; Liu, J.; Norman, T.; Driver, R. WO 2006/069246) (70,3 мг, 0,399 ммоль) и  $\text{NaHCO}_3$  (33,5 мг, 0,40 ммоль) в DME (7,5 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и концентрировали. Остаток очищали хроматографией с обращенной фазой среднего давления на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}$ /водн. $\text{NH}_4\text{Cl}$  (мониторинг методом ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 7 (360 мг, выход 61%) в виде белого твердого вещества.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1115,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  743.

Соединение 8. TFA (2 мл) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 7 (274 мг, 0,123 ммоль), 1,4-диметоксибензола (155 мг, 1,12 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч и затем концентрировали. Остаток очищали хроматографией с обращенной фазой среднего давления на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}$ /водн. $\text{NH}_4\text{Cl}$  (мониторинг методом ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 8 (228 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества. Его чистота UHPLC-ELSD была определена равной 93,3% с использованием условия А для анализа UHPLC-ELSD.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1037,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  691.

Синтез  $\text{PEG}_{36}\text{-Glu}_7\text{-C}_{13}\text{-CO}_2\text{H}$  (16).



14-(трет-Бутокси)-14-оксотетрадекановая кислота (9). В круглодонную колбу объемом 1 л, высушенную пламенем, загружали тетрадекандионовую кислоту (21 г, 81 ммоль), DMAP (9,93 г, 81 ммоль) и толуол (300 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 15 мин добавляли 2-метилпропан-2-ол (11,7 мл, 122 ммоль) и ди-трет-бутилдикарбонат (26,6 г, 122 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем нагревали при 116°C в течение 15 ч. Смесь концентрировали и остаток подвергали флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя смесью EtOAc/гексаны (1:2), содержащей 1% HOAc, с получением 14-(трет-бутокси)-14-оксотетрадекановой кислоты (9) (9,0 г, 29 ммоль, выход 35%). По данным <sup>1</sup>H-NMR материал имел чистоту приблизительно 80% (основной примесью являлся ди-трет-бутиловый эфир), и его непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

1-трет-Бутил 14- (2,5-диоксопирролидин-1-ил)тетрадекандиоат (10). DCC в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1M, 59,6 мл, 59,6 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 14-(трет-бутокси)-14-оксотетрадекановой кислоты (9) (12,5 г, 39,8 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (6,86 г, 59,6 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, с получением 1-трет-бутил 14- (2,5-диоксопирролидин-1-ил)тетрадекандиоата (10) (6,2 г, 15 ммоль, выход 38%) в виде белого твердого ве-

щества.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  2.84 (br s, 4H), 2.60 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (m, 2H), 1.26 (m, 14H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  173.4, 169.2, 168.7, 79.9, 35.6, 31.0, 29.54, 29.51, 29.47, 29.34, 29.31, 29.09, 28.8, 28.1, 25.6, 25.1.

(S)-5-(трет-Бутоксид)-4-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо)-5-оксопентановая кислота (11). Воду (40 мл) добавляли к перемешиваемой смеси (S)-4-амино-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентановой кислоты (1,600 г, 7,87 ммоль), 1-трет-бутил 14-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)тетрадекандиоата (10) (3,6 г, 7,87 ммоль) и  $\text{NaHCO}_3$  (0,794 г, 9,45 ммоль) в DME (120 мл). Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. DME удаляли под вакуумом и добавляли водный раствор  $\text{HCl}$  (1 М, 9,45 мл, 9,45 ммоль) для доведения pH до 2-3. Смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1×250 мл, 2×50 мл), в то время как водный слой насыщали твердым  $\text{NaCl}$ . Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением (S)-5-(трет-бутоксид)-4-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо)-5-оксопентановой кислоты (11) (5,14 г, 10,3 ммоль) в виде белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

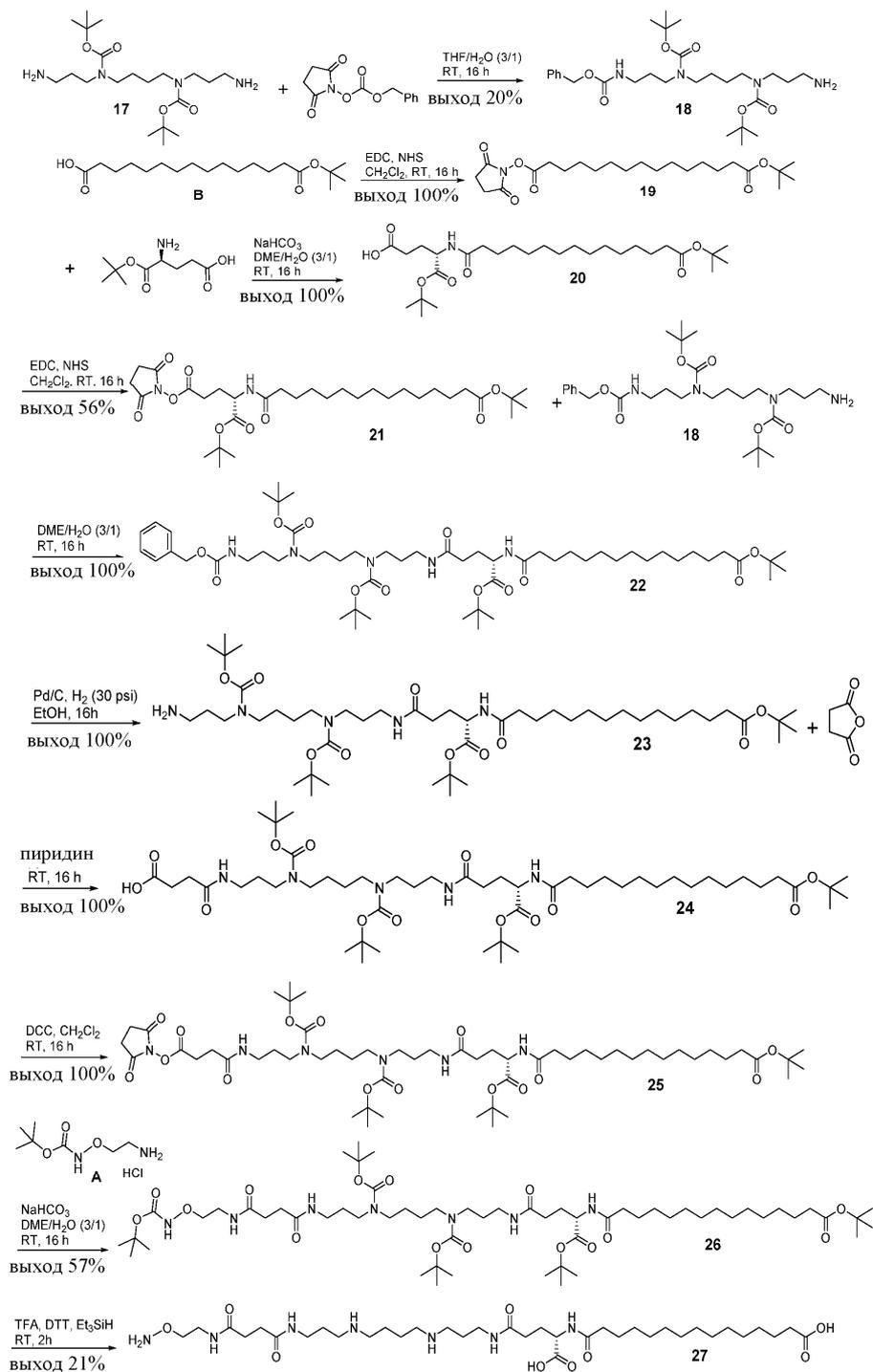
(S)-1-трет-Бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо) пентандиоат (12). DCC в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 М, 11,8 мл, 11,8 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору (S)-5-(трет-бутоксид)-4-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо)-5-оксопентановой кислоты (11) (3,93 г, 7,87 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (1,359 г, 11,81 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч и затем фильтровали. Фильтрат концентрировали под вакуумом и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:19), с получением ((S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо)-пентандиоата (12) (3,2 г, выход 68%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  6.27 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.71 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 2.22 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 2.18 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.58 (m 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (m, 16H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  173.41, 173.37, 170.7, 169.1, 168.0, 82.8, 79.9, 51.6, 36.4, 35.6, 29.58, 29.47, 29.35, 29.30, 29.10, 28.12, 27.99, 27.55, 27.50, 25.59, 25.48, 25.13.

Соединение 13. Воду (4 мл) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 4 (750 мг, 0,448 ммоль) (приобретенной у Quanta BioDesign, Powell, Ohio), (S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(14-(трет-бутоксид)-14-оксотетрадеканамидо)пентандиоата (12) (401 мг, 0,672 ммоль) и  $\text{NaHCO}_3$  (45,1 мг, 0,537 ммоль) в DME (12 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение ночи добавляли водный раствор  $\text{HCl}$  (1М, 0,537 мл, 0,537 ммоль). Смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}/\text{водн. NH}_4\text{Cl}$  (мониторинг методом ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 13 (870 мг, выход 90%) в виде белого твердого вещества.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1079,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  719.

Соединение 14. DCC в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 М, 0,605 мл, 0,605 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 13 (870 мг, 0,403 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (69,6 мг, 0,605 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением соединения 14 в виде белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Соединение 15. Воду (4 мл) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 14 (908 мг, 0,403 ммоль) и трет-бутил 2-аминоэтоксикарбамата (2) (142 мг, 0,806 ммоль) в DME (12 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, концентрировали и остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}/\text{водн. NH}_4\text{Cl}$  (колонка: Teledyne Isco C18 Redi SepRf High performance Gold; детектор: ELSD; скорость: 60 мл/мин; растворитель А: 95%  $\text{H}_2\text{O}$ , 5%  $\text{MeCN}$ , 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; растворитель В: 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 95%  $\text{MeCN}$ , 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 15 (730 мг, выход 78%) в виде белого твердого вещества.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1158,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  772.

Соединение 16. TFA (8 мл, 104 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси соединения 15 (420 мг, 0,181 ммоль) и 1,4-диметоксибензола (201 мг, 1,41 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, концентрировали и остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью  $\text{MeCN}/\text{водн. NH}_4\text{Cl}$  (мониторинг методом ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и удаляли летучие органические вещества с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения 16 (240 мг, выход 63%) в виде белого твердого вещества. Его чистота UHPLC-ELSD была определена равной 75,2% с использованием Условия В для анализа UHPLC-ELSD.  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  1052,  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$  701.

Синтез Spermine-Glu<sup>γ</sup>-C<sub>14</sub>-CO<sub>2</sub>H (27)

трет-Бутил (4-((3-аминопропил)трет-бутоксикарбонил)амино)бутил(3-(((бензилокси)карбонил)амино)пропил)карбамат (18). Воду (100 мл) добавляли к смеси N-(бензилоксикарбонил)оксисукцинимид (16,6 г, 66,4 ммоль), ди-трет-бутил бутан-1,4-диилбис((3-аминопропил)карбамата) (17) (Strømgaard, K; Bjørnsdottir, I; Andersen, K; Brierley, M. I; Rizoli, S.; Eldursi, N; Mellor, I. R.; 4 Peter N.R. Usherwood, P. N. R.; Hansen, S. H.; Krogsgaard-Larsen, P.; Jaroszewski, J. W. Chirality, 2000, 12, 93) (19,1 г, 47,4 ммоль) в THF (300 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи весь THF удаляли под вакуумом и смесь экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (350 мл, 100 мл×2), при этом водный слой насыщали твердым NaCl. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали под вакуумом и очищали флэш-хроматографией, элюируя смесью 2M NH<sub>3</sub>-MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (от 1:19 до 1:9), с получением трет-бутил (4-((3-аминопропил)трет-бутоксикарбонил)амино)-бутил(3-(((бензилокси)карбонил)амино)пропил)карбамата (18) (5,19 г, 9,67 ммоль, выход 20,4%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.22 - 7.40 (m, 5H), 5.01 - 5.12 (m, 2H), 3.34 - 3.48 (m, 4H), 3.01 - 3.31 (m, 5H), 2.65 (br t, J=6.60 Hz, 2H), 1.86 - 2.19 (m, 4H), 1.55 - 1.75 (m, 4H), 1.43 - 1.50 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.42 (s, 9H). Спектр <sup>13</sup>C-NMR был очень

сложным из-за присутствия ротамеров.

1-(трет-Бутил) 15-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)пентадекандиоат (19). Смесь 15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадекановой кислоты (соединение 1 в примере 4) (3,28 г, 10,0 ммоль), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (1,73 г, 15,0 ммоль) и EDC (2,88 г, 15,0 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем ее разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 мл) и дважды промывали смесью раствор/вода (1:1), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением 1-трет-бутил 15-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)пентадекандиоата (19) (4,26 г, 10,0 ммоль, выход 100%), который использовали непосредственно на следующей стадии.

(S)-5-(трет-Бутоксид)-4-(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканамидо)-5-оксопентановая кислота (20). Раствор  $\text{NaHCO}_3$  (1,01 г, 12,0 ммоль) в воде (30 мл) добавляли к смеси (S)-4-амино-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентановой кислоты (2,44 г, 12,0 ммоль) и 1-трет-бутил 15-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)пентадекандиоата (19) (4,26 г, 10,0 ммоль) в DME (90 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 16 ч весь DME удаляли под вакуумом, pH доводили до 2-3, и смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (350 мл, 150 мл). Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением (S)-5-(трет-бутоксид)-4-(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканамидо)-5-оксопентановой кислоты (20) (5,14 г, 10,0 ммоль, выход 100%), которую использовали непосредственно на следующей стадии.

1-(трет-Бутил) 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканойл)-L-глутамат (21). Смесь (S)-5-(трет-бутоксид)-4-(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканамидо)-5-оксопентановой кислоты (20) (5,14 г, 10,0 ммоль), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (1,73 г, 15,0 ммоль), EDC (2,88 г, 15,0 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 мл) и дважды промывали смесью раствор/вода (1:1). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, концентрировали под вакуумом и остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением (S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканамидо)пентандиоата (21) (3,41 г, 5,58 ммоль, выход 55,8%) (выход 55,8% за 3 стадии) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.20 (br d, J=7.82 Hz, 1H), 4.62 (td, J=7.95, 4.89 Hz, 1H), 2.80 - 2.91 (m, 4H), 2.56 - 2.79 (m, 2H), 2.29 - 2.42 (m, 1H), 2.17 - 2.28 (m, 4H), 2.02 - 2.16 (m, 1H), 1.54 - 1.69 (m, 4H), 1.48 - 1.53 (m, 9H), 1.44 - 1.48 (m, 9H), 1.21 - 1.39 (m, 18H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 173.35, 173.33, 170.66, 168.95, 168.01, 82.82, 79.85, 51.66, 36.46, 35.66, 29.61, 29.49, 29.35, 29.31, 29.12, 28.15, 28.00, 27.62, 27.54, 25.60, 25.48, 25.15.

Трет-бутил (S)-8,13,21-трис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-1-фенил-2-окса-4,8,13,17,22-пентаазагептатриаконтан-37-оат (22). Воду (20 мл) добавляли к смеси трет-бутил 4-((3-аминопропил)трет-бутоксикарбонил)амино-бутил(3-((бензилокси)карбонил)амино)пропилкарбамата (18) (1,42 г, 2,65 ммоль), (S)-1-трет-бутил 5-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(15-(трет-бутоксид)-15-оксопентадеканамидо)пентандиоата (21) (1,62 г, 2,65 ммоль) в DME (60 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение ночи все летучие компоненты (включая воду) удаляли под высоким вакуумом и остаток подвергали азеотропной сушке с  $\text{MeOH}$  (2x). Остаток растворяли в смеси  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:9, <10 мл) и подвергали флэш-хроматографии, элюируя смесью  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , с получением (S)-трет-бутил 8,13,21-трис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-1-фенил-2-окса-4,8,13,17,22-пентаазагептатриаконтан-37-оата (22) (2,74 г, 2,65 ммоль, выход 100%) в виде вязкой жидкости.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.29 - 7.39 (m, 5H), 7.12 - 7.25 (m, 1H), 6.69 - 6.89 (m, 1H), 5.67 - 5.95 (m, 1H), 5.03 - 5.15 (m, 2H), 4.30 - 4.47 (m, 1H), 3.38 - 3.54 (m, 8H), 3.05 - 3.32 (m, 8H), 2.12 - 2.35 (m, 6H), 1.86 - 2.05 (m, 1H), 1.51 - 1.76 (m, 7H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 27H), 1.17 - 1.33 (m, 20H). Спектр  $^{13}\text{C-NMR}$  был очень сложным из-за присутствия ротамеров.

трет-Бутил (S)-5-(3-аминопропил)-10,18-бис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,15,20-триоксо-3-окса-5,10,14,19-тетраазатетрааконтан-34-оат (23). Смесь (S)-трет-бутил 8,13,21-трис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-1-фенил-2-окса-4,8,13,17,22-пентаазагептатриаконтан-37-оата (22) (1,36 г, 1,32 ммоль) и Pd-C (0,140 г, 10 масс.%) в этаноле (100 мл) гидрировали в шейкере Парра ( $\text{H}_2$ , 30 psi) в течение 18 ч при РТ. Смесь фильтровали, промывали  $\text{EtOH}$ , концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением (S)-трет-бутил 5-(3-аминопропил)-10,18-бис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,15,20-триоксо-3-окса-5,10,14,19-тетраазатетра-триаконтан-34-оата (23) (1,19 г, 1,32 ммоль, выход 100%), который использовали непосредственно на следующей стадии.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.91 - 7.09 (m, 1H), 6.46 - 6.73 (m, 1H), 4.34 - 4.54 (m, 1H), 3.66 - 3.81 (m, 1H), 3.10 - 3.36 (m, 10H), 2.82 - 2.93 (m, 2H), 2.58 - 2.67 (m, 3H), 2.13 - 2.36 (m, 6H), 1.55 - 1.72 (m, 6H), 1.49 - 1.53 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 1.47 (d, J=3.18 Hz, 27H), 1.22 - 1.37 (m, 20H). Спектр  $^{13}\text{C-NMR}$  был очень сложным из-за присутствия ротамеров.

(S)-20,28,33-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,18,23,38-тетраоксо-3-окса-19,24,28,33,37-пентаазагептатетрааконтан-41-оая кислота (24). Пиридин (13 мл) добавляли к смеси (S)-трет-бутил 5-(3-аминопропил)-10,18-бис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,15,20-триоксо-3-окса-5,10,14,19-тетраазатетрааконтан-34-оата (23) (1,19 г, 1,32 ммоль) и дигидрофуран-2,5-диона (0,66 г, 6,6 ммоль). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 16 ч все летучие компоненты удаляли под

вакуумом и остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя смесью MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, содержащей 0,5% AcOH, с получением (S)-20,28,33-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,18,23,38-тетраоксо-3-окса-19,24,28,33,37-пентаазагептетраконтан-41-оевой кислоты (24) (1,32 г, 1,32 ммоль, выход 100%) в виде вязкой жидкости. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 4.38 - 4.50 (m, 1H), 3.47 - 3.58 (m, 1H), 3.09 - 3.32 (m, 9H), 2.75 (s, 4H), 2.64 - 2.73 (m, 2H), 2.46 - 2.59 (m, 2H), 2.27 - 2.35 (m, 2H), 2.17 - 2.27 (m, 4H), 2.07 - 2.14 (m, 4H), 1.83 - 2.04 (m, 1H), 1.67 - 1.80 (m, 3H), 1.55- 1.66 (m, 4H), 1.41 - 1.54 (m, 38H), 1.19 - 1.37 (m, 20H).

21,36-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) (S)-8,13-бис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-4,8,13,17,22-пентаазагексатриаконтан-1,21,36-трикарбоксилат (25). DCC в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,0 М, 2,0 мл, 2,0 ммоль) добавляли к смеси (S)-20,28,33-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,18,23,38-тетраоксо-3-окса-19,24,28,33,37-пентаазагептетраконтан-41-оевой кислоты (24) (1,32 г, 1,32 ммоль), 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (0,23 г, 2,0 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 16 ч ее фильтровали, концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением 21,36-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) (S)-8,13-бис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-4,8,13,17,22-пентаазагексатриаконтан-1,21,36-трикарбоксилата (25) (1,45 г, 1,32 ммоль, выход 100%), который использовали непосредственно на следующей стадии.

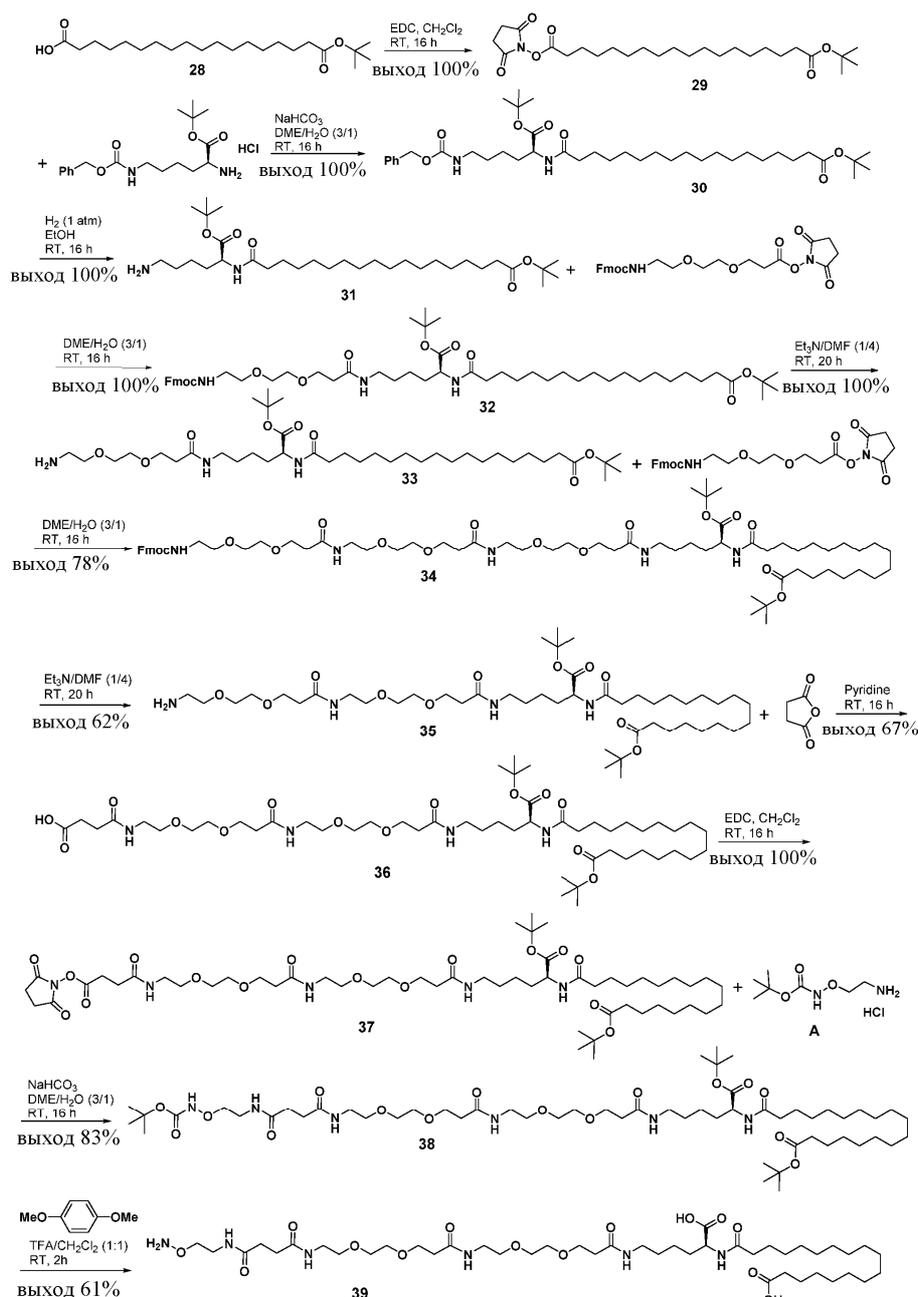
трет-Бутил (S)-18,23,31-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,28,33-пентаоксо-3,6-диокса-5,9,14,18,23,27,32-гептаазагептетраконтан-47-оат (26). Раствор NaHCO<sub>3</sub> (0,233 г, 2,77 ммоль) в воде (4 мл) добавляли к смеси (S)-21,36-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-8,13-бис(трет-бутоксикарбонил)-3,18,23-триоксо-4,8,13,17,22-пентаазагексатриаконтан-1,21,36-трикарбоксилата (25) (1,45 г, 1,32 ммоль) и трет-бутил 2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (0,561 г, 2,64 ммоль) в DME (12 мл) при комнатной температуре. После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 6 ч все летучие компоненты, включая воду, удаляли под вакуумом и остаток подвергали азеотропной сушке с THF. Остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя смесью MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с получением трет-бутил (S)-18,23,31-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,28,33-пентаоксо-3,6-диокса-5,9,14,18,23,27,32-гептаазагептетраконтан-47-оата (26) (0,87 г, 0,75 ммоль, выход 57%) в виде вязкой жидкости. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 4.33 - 4.48 (m, 1H), 3.80 - 3.94 (m, 4H), 3.42 - 3.55 (m, 14H), 3.08 - 3.32 (m, 7H), 2.68 - 2.77 (m, 4H), 2.50 - 2.63 (m, 4H), 2.13 - 2.34 (m, 4H), 1.54 - 1.74 (m, 6H), 1.43 - 1.53 (m, 45H), 1.22 - 1.35 (m, 20H). Спектр <sup>13</sup>C-NMR был очень сложным из-за присутствия ротамеров.

(S)-1-(Аминоокси)-25-карбоксо-4,7,22,27-тетраоксо-3,8,12,17,21,26-гексаазагептетраконтан-41-оевая кислота (27). К смеси (S)-трет-бутил-18,23,31-трис(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,28,33-пентаоксо-3,6-диокса-5,9,14,18,23,27,32-гептаазагептетраконтан-47-оата (26) (0,50 г, 0,43 ммоль) и DTT (0,067 г, 0,43 ммоль) в TFA (1,5 мл) добавляли триэтилсилан (0,10 мл, 0,63 ммоль) и воду (0,10 мл, 5,6 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем все летучие компоненты удаляли с использованием потока N<sub>2</sub> в течение ночи. Остаток подвергали очистке препаративной LC/MS с использованием следующих условий: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, частицы 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 0-35% В в течение 25 минут, затем удерживание в течение 5 минут при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли, и летучие органические компоненты удаляли с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, охлаждали до -78°C в потоке азота и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (27) в виде белого твердого вещества (72 мг, выход 21%). Его чистота по LC-CAD была определена равной 94,9% с использованием условия С для анализа UHPLC-CAD. [MH]<sup>+</sup> 745.09.

Условие А анализа: время удерживания = 1,27 мин; ESI-MS (MH)<sup>+</sup> = 744.55.

Условия В анализа: время удерживания = 1,20 мин; ESI-MS (MH)<sup>+</sup> = 744.40.

Синтез соединения 39:



1-(трет-Бутил) 18-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)октадекандиоат (29). EDC (1,406 г, 7,33 ммоль) добавляли к смеси 18-(трет-бутокс)-18-оксооктадекановой кислоты (28) (полученной способом, аналогичным способу, использованному для получения соединения 1 в примере 4) (2,09 г, 5,64 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-диона (0,844 г, 7,33 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, разбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл) и промывали NaHCO<sub>3</sub>. После отделения водный слой экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 мл×2). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с получением 1-трет-бутил 18-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)октадекандиоата (29) (2,13 г, 4,55 ммоль, выход 81%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H-NMR (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.85 (br s, 4H), 2.62 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.22 (t, J=7.6 Hz, 2H), 1.77 (quin, J=7.5 Hz, 2H), 1.67 - 1.54 (m, 3H), 1.50 - 1.37 (m, 10H), 1.37 - 1.21 (m, 22H). <sup>13</sup>C-NMR (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 173.33, 169.12, 168.67, 79.85, 35.67, 30.98, 29.65 (br s), 29.62 (br s), 25.61, 29.55, 29.50, 29.36, 29.31, 29.12, 29.09, 28.81, 28.15, 25.15, 24.60.

трет-Бутил (S)-18-(((6-(((бензилокси)карбонил)амино)-1-(трет-бутокс)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканеоат (30). NaHCO<sub>3</sub> (0,41 г, 4,83 ммоль) добавляли к смеси 1-трет-бутил 18-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)октадекандиоата (29) (1,13 г, 2,416 ммоль) и Lys(N<sup>ε</sup>-CBZ)-O<sup>t</sup>Bu гидрохлорида (1,17 г, 3,14 ммоль) в DME (60 мл) и воде (20 мл). Полученную легкую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. DME удаляли под вакуумом, а затем добавляли водный раствор HCl (1 М, 4,83 мл, 4,83 ммоль) для доведения pH до 2-3. Смесь экстрагировали EtOAc (200 мл, 100 мл×2).

Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, концентрировали под вакуумом и подвергали флэш-хроматографии, элюируя смесью  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением (S)-трет-бутил 18-(((6-(((бензилокси)карбонил)амино)-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканоата (30) (1,66 г, 2,42 ммоль, выход 100%) в виде бесцветной вязкой жидкости.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.29 - 7.38 (m, 5H), 6.08 (br d,  $J=7.34$  Hz, 1H), 5.06 - 5.19 (m, 2H), 4.84 - 5.02 (m, 1H), 4.48 (td,  $J=7.70, 5.14$  Hz, 1H), 3.07 - 3.27 (m, 2H), 2.15 - 2.24 (m, 4H), 1.75 - 1.88 (m, 1H), 1.49 - 1.70 (m, 7H), 1.46 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.20 - 1.34 (m, 26H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 173.30, 172.87, 171.81, 171.05, 156.49, 136.67, 128.47, 128.03, 82.03, 79.82, 66.55, 60.35, 52.24, 40.66, 36.65, 35.64, 32.35, 29.67, 29.64, 29.61, 29.50, 29.48, 29.44, 29.33, 29.29, 29.10, 28.13, 28.00, 25.63, 25.13, 22.25, 21.00, 14.19.  $[\text{M}]^+$  689.62.

трет-Бутил (S)-18-(((6-амино-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканоат (31). Смесь (S)-трет-бутил 18-(((6-(((бензилокси)карбонил)амино)-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканоата (30) (1,060 г, 1,2 ммоль) и Pd-C (0,128 г, 1,200 ммоль) в EtOH (50 мл) гидрировали (баллон) в течение ночи при комнатной температуре. После нескольких циклов продувки азотом под вакуумом реакционную смесь тщательно фильтровали и промывали EtOH. Фильтрат концентрировали и сушили под высоким вакуумом с получением (S)-трет-бутил 18-(((6-амино-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканоата (0,67 г, 1,2 ммоль, выход 100%) в виде бесцветной жидкости, которую использовали непосредственно на следующей стадии.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.40 - 6.59 (m, 1H), 4.30 - 4.50 (m, 1H), 3.16 - 3.37 (m, 2H), 2.65 - 2.81 (m, 2H), 2.10 - 2.25 (m, 4H), 1.72 - 1.84 (m, 1H), 1.47 - 1.67 (m, 7H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.22 - 1.36 (m, 26H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 173.53, 173.48, 171.90, 82.10, 79.95, 52.47, 50.19, 40.80, 36.50, 35.62, 32.11, 30.66, 29.63, 29.60, 29.56, 29.48, 29.44, 29.33, 29.25, 29.05, 28.07, 27.94, 25.66, 25.09, 22.41.  $[\text{M}]^+$  555.63.

трет-Бутил (S)-19-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,21-триоксо-2,7,10-триокса-4,14,20-триазаоктатриаконтан-38-оат (32).  $\text{NaHCO}_3$  (0,202 г, 2,40 ммоль) добавляли к смеси 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10-триокса-4-азатридекан-13-оата (0,715 г, 1,44 ммоль), (S)-трет-бутил 18-(((6-амино-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)амино)-18-оксооктадеканоата (31) (0,67 г, 1,2 ммоль) в DME (15 мл) и воде (5). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи все летучие компоненты удаляли под вакуумом и остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением (S)-трет-бутил 19-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,21-триоксо-2,7,10-триокса-4,14,20-триазаоктатриаконтан-38-оата (32) (1,12 г, 1,20 ммоль, выход 100%) в виде бесцветной вязкой жидкости.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.78 (d,  $J=7.58$  Hz, 2H), 7.63 (d,  $J=7.34$  Hz, 2H), 7.37 - 7.47 (m, 2H), 7.30 - 7.36 (m, 2H), 6.21 - 6.37 (m, 1H), 6.00 - 6.17 (m, 1H), 5.43 - 5.63 (m, 1H), 4.40 - 4.54 (m, 3H), 4.19 - 4.33 (m, 1H), 3.75 (t,  $J=5.87$  Hz, 2H), 3.53 - 3.68 (m, 6H), 3.42 (br d,  $J=4.89$  Hz, 2H), 3.22 (q,  $J=6.28$  Hz, 2H), 2.44 (br t,  $J=5.38$  Hz, 2H), 2.22 (t,  $J=7.58$  Hz, 4H), 1.75 - 1.89 (m, 1H), 1.55 - 1.69 (m, 7H), 1.47 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.20 - 1.35 (m, 26H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 173.34, 173.01, 171.82, 171.38, 156.56, 143.99, 141.34, 127.70, 127.05, 125.06, 119.98, 82.07, 79.87, 70.25, 70.12, 70.05, 67.29, 66.63, 52.27, 47.33, 40.86, 38.99, 37.03, 36.67, 35.67, 32.45, 29.70, 29.67, 29.64, 29.63, 29.53, 29.51, 29.38, 29.33, 29.13, 29.03, 28.15, 28.04, 25.68, 25.16, 22.47.  $[\text{M}]^+$  936.80.

трет-Бутил (S)-1-амино-15-(трет-бутоксикарбонил)-9,17-диоксо-3,6-диокса-10,16-диазатетратриаконтан-34-оат (33).  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,5 мл, 18 ммоль) добавляли к смеси (S)-трет-бутил 19-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,21-триоксо-2,7,10-триокса-4,14,20-триазаоктатриаконтан-38-оата (32) (1,12 г, 1,20 ммоль) в DMF (10 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение ночи добавляли дополнительное количество  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,0 мл, 7,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 7 часов. Все летучие компоненты удаляли в вакууме и остаток сушили под высоким вакуумом с получением (S)-трет-бутил 1-амино-15-(трет-бутоксикарбонил)-9,17-диоксо-3,6-диокса-10,16-диазатетратриаконтан-34-оата (33) (0,857 г, 1,20 ммоль, выход 100%) в виде бесцветной жидкости, которую использовали непосредственно на следующей стадии.  $[\text{M}]^+$  714.70.

трет-Бутил (S)-39-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,23,33,41-пентаоксо-2,7,10,17,20,27,30-гептаокса-4,14,24,34,40-пентаазаокта-пентаконтан-58-оат (34).  $\text{NaHCO}_3$  (0,20 г, 2,4 ммоль) добавляли к смеси 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10-триокса-4-азатридекан-13-оата (0,715 г, 1,44 ммоль), (S)-трет-бутил-1-амино-15-(трет-бутоксикарбонил)-9,17-диоксо-3,6-диокса-10,16-диазатетратриаконтан-34-оата (33) (0,857 г, 1,20 ммоль) в DME (15 мл) и воде (5 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение ночи все летучие компоненты удаляли под вакуумом и добавляли водный раствор HCl (1 M, 2,4 мл, 2,4 ммоль) для доведения pH до 2-3. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (200 мл, 100 мл $\times$ 2). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток подвергали флэш-хроматографии (силикагель), элюируя смесью  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением (S)-трет-бутил 29-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,23,31-тетраоксо-2,7,10,17,20-пентаокса-4,14,24,30-тетраазаоктатетраоктатриаконтан-48-оата (34) (1,03 г, 0,940 ммоль, выход 78%) в виде бесцветной вязкой жидкости.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.78 (d,  $J=7.58$  Hz, 2H), 7.63 (br d,  $J=7.34$  Hz, 2H), 7.39 - 7.46 (m, 2H), 7.30 - 7.36 (m, 2H), 6.74 (br s, 1H), 6.27 - 6.39 (m, 1H), 6.05 - 6.24 (m, 1H), 5.60 - 5.78 (m, 1H), 5.19 - 5.40 (m, 3H),

4.38 - 4.55 (m, 3H), 4.17 - 4.32 (m, 1H), 3.74 - 3.79 (m, 2H), 3.72 (t, J=5.99 Hz, 2H), 3.61 - 3.67 (m, 4H), 3.54 - 3.61 (m, 8H), 3.48 - 3.54 (m, 6H), 3.37 - 3.47 (m, 4H), 3.17 - 3.29 (m, 2H), 2.49 (br t, J=5.87 Hz, 2H), 2.43 (t, J=5.87 Hz, 2H), 2.18 - 2.26 (m, 4H), 1.76 - 1.90 (m, 1H), 1.51 - 1.73 (m, 7H), 1.48 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.18 - 1.37 (m, 26H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 173.34, 173.04, 171.80, 171.43, 171.34, 156.62, 144.00, 141.35, 127.69, 127.05, 125.04, 119.97, 82.05, 79.87, 77.55, 70.22, 70.18, 70.16, 70.07, 69.92, 67.23, 66.51, 53.40, 52.29, 50.86, 47.34, 40.99, 39.18, 39.04, 37.04, 36.95, 36.67, 35.67, 32.42, 29.70 (br s), 29.68 (br s), 29.65 (br s), 29.63 (br s), 29.54, 29.51, 29.38, 29.34, 29.32, 29.12, 29.01, 28.15, 28.0, 25.68, 25.16, 22.51. [MН]<sup>+</sup> 1254.90.

трет-Бутил (S)-1-амино-25-(трет-бутоксикарбонил)-9,19,27-триоксо-3,6,13,16-тетраокса-10,20,26-триазатетратетраоктан-44-оат (35). Et<sub>3</sub>N (1,2 мл, 8,61 ммоль) добавляли к смеси (S)-трет-бутил 29-(трет-бутоксикарбонил)-1-(9H-флуорен-9-ил)-3,13,23,31-тетраоксо-2,7,10,17,20-пентаокса-4,14,24,30-тетраазаоктатетраоктан-48-оата (34) (330 мг, 0,301 ммоль) в DMF (3 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 20 ч все летучие компоненты удаляли под высоким вакуумом. Остаток подвергали флэш-хроматографии, элюируя смесью 2M NH<sub>3</sub>-MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:9) с получением (S)-трет-бутил 1-амино-25-(трет-бутоксикарбонил)-9,19,27-триоксо-3,6,13,16-тетраокса-10,20,26-триаза тетратетраоктан-44-оата (35) (164 мг, 0,188 ммоль, выход 62,3%) в виде бесцветной жидкости. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 6.78 - 6.92 (m, 1H), 6.48 - 6.62 (m, 1H), 6.15 - 6.35 (m, 1H), 4.35 - 4.53 (m, 1H), 3.75 (q, J=6.11 Hz, 4H), 3.59 - 3.68 (m, 8H), 3.54 - 3.59 (m, 2H), 3.49 - 3.54 (m, 2H), 3.40 - 3.48 (m, 3H), 3.16 - 3.29 (m, 2H), 2.80 - 2.92 (m, 2H), 2.38 - 2.57 (m, 4H), 2.12 - 2.32 (m, 4H), 1.75 - 1.87 (m, 1H), 1.49 - 1.75 (m, 8H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.20 - 1.38 (m, 26H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 173.32, 173.04, 171.80, 171.47, 171.37, 81.99, 79.85, 74.86, 73.34, 70.30, 70.23, 70.12, 70.08, 69.88, 67.30, 52.31, 50.60, 41.74, 39.18, 39.00, 37.05, 37.00, 36.64, 35.65, 32.35, 29.67, 29.66, 29.61, 29.52, 29.48, 29.33, 29.31, 29.31, 29.11, 29.04, 28.13, 28.03, 25.68, 25.13, 22.51. [MН]<sup>+</sup> 873.75.

(S)-23-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,21,29,39,49-пентаоксо-3,32,35,42,45-пентаокса-22,28,38,48-тетраазадопентаоктан-52-ойная кислота (36). Пиридин (5,0 мл) добавляли к смеси (S)-трет-бутил 1-амино-25-(трет-бутоксикарбонил)-9,19,27-триоксо-3,6,13,16-тетраокса-10,20,26-триазатетраоктан-44-оата (35) (164 мг, 0,188 ммоль) и дигидрофуран-2,5-диона (94 мг, 0,939 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение ночи все летучие компоненты удаляли под высоким вакуумом. Остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью MeCN/водн.TFA (контролируется ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли, и летучие органические компоненты удаляли с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (S)-23-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,21,29,39,49-пентаоксо-3,32,35,42,45-пентаокса-22,28,38,48-тетраазадопентаоктан-52-ойной кислоты (36) (123 мг, 0,126 ммоль, выход 67,3%) в виде бесцветной жидкости. [MН]<sup>+</sup> 973.81.

29,47-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) (S)-3,13,23,31-тетраоксо-7,10,17,20-тетраокса-4,14,24,30-тетраазагептатетраоктан-1,29,47-трикарбоксилат (37). К смеси (S)-23-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,21,29,39,49-пентаоксо-3,32,35,42,45-пентаокса-22,28,38,48-тетраазадопентаоктан-52-ойной кислоты (36) (123 мг, 0,126 ммоль), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (21,8 мг, 0,190 ммоль) и EDC (31,5 мг, 0,164 ммоль) добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл). После перемешивания полученного прозрачного раствора при комнатной температуре в течение ночи анализ LC/ELSD-MS показал превращение, составляющее приблизительно 70%. Добавляли дополнительное количество 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (21,8 мг, 0,190 ммоль) и EDC (31,5 мг, 0,164 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 ч. Анализ LC/ELSD-MS показал полное превращение. Смесь разбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 мл) и промывали смесью вода/рассол (2:1), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали под высоким вакуумом с получением (S)-29,47-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-3,13,23,31-тетраоксо-7,10,17,20-тетраокса-4,14,24,30-тетраазагептатетраоктан-1,29,47-трикарбоксилата (37) (135 мг, 0,126 ммоль, выход 100%) в виде бесцветной жидкости, которую использовали непосредственно на следующей стадии. [MН]<sup>+</sup> 1070.93.

трет-Бутил (S)-39-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,23,33,41-гексаоксо-3,6,17,20,27,30-гексаокса-5,9,14,24,34,40-гексаазаоктапентаоктан-58-оат (38). NaHCO<sub>3</sub> (21,2 мг, 0,252 ммоль) добавляли к смеси (S)-29,47-ди-трет-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-3,13,23,31-тетраоксо-7,10,17,20-тетраокса-4,14,24,30-тетраазагептатетраоктан-1,29,47-трикарбоксилата (37) (135 мг, 0,126 ммоль) и трет-бутил 2-аминоэтоксикарбамата гидрохлорида (53,6 мг, 0,252 ммоль) в DME (4,5 мл) и воде (1,5 мл). Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Все летучие компоненты удаляли под вакуумом, а остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя смесью MeCN/водн.TFA (контроль ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли, и летучие органические компоненты удаляли с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (S)-трет-бутил-39-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,23,33,41-гексаоксо-3,6,17,20,27,30-гексаокса-5,9,14,24,34,40-гексаазаоктапентаоктан-58-оата (38)

(118 мг, 0,104 ммоль, выход 83,0%).  $[Mn]^+$  1131.99.

(S)-1-(аминоокси)-33-карбокси-4,7,17,27,35-пентаоксо-11,14,21,24-тетраокса-3,8,18,28,34-пентааза допентаконтан-52-ойная кислота (39). TFA (2 мл) добавляли при 0°C к смеси (S)-трет-бутил 39-(трет-бутоксикарбонил)-2,2-диметил-4,10,13,23,33,41-гексаоксо-3,6,17,20,27,30-гексаокса-5,9,14,24,34,40-гексаазаокта-пентаконтан-58-оата (38) (118 мг, 0,104 ммоль) и 1,4-диметоксибензола (144 мг, 1,043 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (2 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 5 минут и затем при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь концентрировали и затем сушили под высоким вакуумом в течение 30 мин. Остаток очищали хроматографией со средним давлением с обращенной фазой на колонке C-18, элюируя MeCN/водн.TFA (контроль ELSD-MS). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли, и летучие органические компоненты удаляли с использованием потока азота. Полученный водный раствор, содержащий желаемый продукт, охлаждали до -78°C в потоке азота и лиофилизировали с получением (S)-1-(аминоокси)-33-карбокси-4,7,17,27,35-пентаоксо-11,14,21,24-тетраокса-3,8,18,28,34-пентаазадопентаконтан-52-ойной кислоты (39) (60,0 мг, 0,064 ммоль, выход 61,3%) в виде белого твердого вещества. Его чистота по данным LC-CAD составила 98,0% с использованием условия D для анализа UHPLC-CAD.  $[Mn]^+$  919.88,  $[M+2H]^+/2$  460.69.

Пример 7: Анализ внутриклеточного накопления сАМР Эффекты релаксина H2 опосредуются через его родственный рецептор, сопряженный с G-белком, пептидный рецептор семейства релаксина (RXFP1), что приводит к стимуляции комбинации клеточных сигнальных путей, которые зависят от типа клеток и могут включать аденилатциклазу, протеинкиназу A, протеинкиназу C, фосфатидилинозитол-3-киназу и киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (Erk1/2). Bathgate, et al., 2006. Pharmacol. Rev. 58, 7-31. Описанный в настоящем документе анализ внутриклеточного накопления сАМР использовали для оценки биологической активности и активности релаксина. Тестируемые соединения были основаны на WT-RLX (Фиг. 1), AQ1 (Фиг. 2) и BM25/AN1 (Фиг. 3). РК-экстендеры, как показано, были конъюгированы с пара-ацетил-фенилаланином, содержащимся в AQ1 и BM25/AN1, через оксимную связь, как описано в примере 3.

Клетки CHO-K1 (ATCC; номер по каталогу CRL-9618), стабильно экспрессирующие рецептор RXFP1 человека (номер локуса LOC59350) (10000/лунку), высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение ночи при 37°C и 5%  $CO_2$ . На следующий день среду удаляли из лунок и клетки стимулировали добавлением лиганда (полипептида релаксина) в 50 мкл буфера (1X HBSS, 5 mM HEPES (7,2), 0,5 mM IBMX, 0,1% BSA); инкубацию проводили в течение 10 мин при 37°C. Нестимулированные клетки использовали в качестве контролей. Реакции прекращали и клеточные уровни сАМР измеряли с использованием набора сАМР Dynamic 2 HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением) kit (CisBio, #62AM4PEC) в соответствии с протоколом производителя. Планшеты анализировали с использованием ридера EnVision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer). Сигнал выражали в виде отношения интенсивности флуоресценции при 665 нм/интенсивности флуоресценции при 620 нм  $\times$  10000. Концентрацию сАМР в образце определяли путем сравнения со стандартными кривыми, генерированными из известных концентраций сАМР. Активность каждого релаксина определяли с использованием кривых концентрация-ответ, построенных по десяти точкам, которые были выполнены в в двух повторах. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Microsoft Excel версии 2013 Xlfit. Значения эффективной концентрации 50 ( $EC_{50}$ ), точка, в которой ответ был наполовину максимальным, рассчитывали с использованием четырехпараметрического логистического уравнения, которое учитывало переменный наклон (Табл. 3).

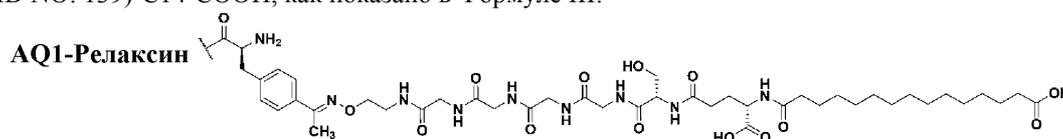
Сокращения, используемые в табл.3: dK: D-лизин; Sar: саркозин (N-метилглицин); dGlu: D-глутаминовая кислота; PEG 20 кДа: поли(этиленгликоль), молекулярная масса 20 кДа; PEGn (например, n равно 2, 12, 24 или 36): -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-; -C13-: -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-; -C14-: -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-; -C15-: -(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>- (эти сокращения иллюстрируют, но без ограничения, -Cn- формулы I или использование этих терминов вне этой таблицы). В Glu<sup>γ</sup>-C13-, Glu<sup>γ</sup>-C14-, Glu<sup>γ</sup>-C15- и Glu<sup>γ</sup>-C17- в табл. 3 первый карбонильный углерод жирной кислоты связан с (гамма) Glu остатком посредством амидной связи.

Таблица 3  
 Результаты анализа внутриклеточного накопления с AMP.

Название конъюгата релаксина	hRXFP1/CHO-K1 сAMP EC50 (нМ, средняя)	Пептидный компонент SEQ ID NO:
WT-RLX	0.12	
BM25/AN1	0.09	
BM25/AN1-C13-CH3	1.85	
AQ1	0.11	
AQ1-20kDa PEG	3.22	
AQ1-Glu-C13-CH3	0.95	
AQ1-Glu-C13-COOH	0.18	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	0.15	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	0.25	
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.14	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	0.32	102
AQ1-KKKKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.08	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.29	104
AQ1-GGGEEE-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.22	105
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.31	106
AQ1-KKKGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.09	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.65	108
AQ1-GGGKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.19	109
AQ1-GSHHHHGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.28	110
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.39	111
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.32	112
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.59	113
AQ1-KKSGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.34	114
AQ1-KKSGSGG-Glu <sup>α</sup> -C13-COOH	0.27	115
AQ1-KKSAGSAG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.27	116
AQ1-KSGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.24	117
AQ1-KKSGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.14	118
AQ1-KKSGSGGEE-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.16	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.10	120
AQ1-EESGGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.83	121
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.55	122
AQ1-GSGSGSGS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	2.79	123
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	5.26	124
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C17-COOH	10.52	125
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-CH3	0.38	126
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-CH3	0.46	127

AQ1-EEEGGG-dGlu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.91	128
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.88	129
AQ1-EGGGGSK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.31	130
AQ1-EEEEEE-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	11.06	131
AQ1-Соединение 39	2.23	
AQ1-EEEEPEEEEEPEEEEEPEEEEE-Glu <sup>γ</sup> -C14-CH <sub>3</sub>	0.33	133
AQ1-EEEEPEEEEEPEEEEEPEEEEE-Glu <sup>γ</sup> -C15-CH <sub>3</sub>	0.34	134
AQ1-EEEEPEEEEEPEEEEEPEEGGG-C14-CH <sub>3</sub>	0.16	135
AQ1-EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Glu <sup>γ</sup> -C14-CH <sub>3</sub>	0.67	136
AQ1-KGGEEKKKEKKEKPKGGEEKKKEKEK-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.81	137
AQ1- EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	4.96	138
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH <sup>a</sup>	0.28	139
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.10	140
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.34	141
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	0.40	142
AQ1-EEEEEE-Glu <sup>γ</sup> -C14-CH <sub>3</sub>	0.38	143
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C14-CH <sub>3</sub>	0.35	144
AQ1-KGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.27	145
AQ1-KGPKGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.23	146
AQ1-SGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.32	147
AQ1-KGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.34	148
AQ1-KGGGSE-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.37	149
AQ1-GSPGSP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.29	150
AQ1-GGGGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.39	151
AQ1-EGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.33	152
AQ1-EGGGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.44	153
AQ1-KGPGSE-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.60	154
AQ1-Spermine-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	0.39	
AQ1-KKGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.36	156

<sup>a</sup>Конъюгат релаксина AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH содержит полипептид релаксина А-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35 и полипептид релаксина В-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 6, при этом модифицированный пара-ацетил-L-фенилаланин, расположенный на N-конце указанного полипептида релаксина А-цепи, связан с РК-энхансером, содержащим GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, как показано в Формуле III:



(Формула III)

Пример 8. Фармакокинетические (ПК) исследования *in vivo*.

Самцы крыс Sprague-Dawley (n = 3) получали однократную внутривенную (IV) или подкожную (SC) дозу (1 мг/кг) конструкций релаксина (как описано в примере 7 выше), составленных в подходящем буфере (например, 20 мМ гистидин, 750 мМ NaCl, pH 6,0). Образцы крови собирали через яремную вену в разные моменты времени до 72 часов. Образцы крови оставляли для коагуляции при комнатной температуре (30-60 мин) и затем центрифугировали (1500-2000) при 4°C для получения сыворотки. После центрифугирования образцы сыворотки переносили в 96-луночные планшеты и хранили при -80°C до биоанализа. Концентрации релаксина измеряли в сыворотке с помощью ELISA.

Для анализа использовали профили концентрации релаксина-времени от отдельных животных. Фармакокинетические параметры рассчитывали некомпартментными методами с использованием Phoenix WinNonlin (версия 6.4) или Kinetica (версия 5). Представляли средние фармакокинетические параметры C<sub>max</sub>, A<sub>Udnf</sub>, C<sub>24</sub> и период полувыведения (Табл. 4).

Таблица 4  
Данные PK in vivo (сокращения как в табл. 3)

Название конъюгата релаксина	PK крыс Доза SC (мг/кг)	PK крыс Общая AUC ч*нмоль/л	PK крыс C24 (нМ)	SEQ ID NO: пептидного компонента
AQ1-20kDa PEG	1.0 <sup>a</sup>	1475	39	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	1.0	1003	9.7	
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	0.8	1096	1.52	101
AQ1-DRDDR-C13-COOH	1.0	1008	0.38	102
AQ1-KKKKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	38	0.05	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	987	0.10	104
AQ1-GGGEEE-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	866	0.18	105
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	1381	0.29	106
AQ1-KKGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	258	0.24	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	1112	0.28	108
AQ1-GGGKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	231	0.10	109
AQ1-GSHHHHGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	582.0	0.46	110
AQ1-KSGGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	814	0.73	117
AQ1-KKSGGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	264	0.21	118
AQ1-KKSGGSGGEE-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	676	0.09	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	1.0	31.2	0.06	120
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.0 <sup>b</sup>	5526	44	122
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.0	3553	22	124
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-CH <sub>3</sub>	1.0	274	0.4	126
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-CH <sub>3</sub>	1.0	370	0.89	127
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.0 <sup>c</sup>	2137	5.2	129
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.0	2308	17	139
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.0	451	1.5	141
AQ1-KK-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	1.0	820	8.8	142
AQ1-GSPGSP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.0	1979	5	150
AQ1-GGGGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	1.0	2179	3.9	151

<sup>a</sup>C поправкой на 0,2 мг/кг массы тела <sup>b</sup>C поправкой на 0,3 мг/кг массы тела <sup>c</sup>C поправкой на 0,5 мг/кг массы тела

Пример 9: Исследование почечного кровотока у крыс

Самцов крыс Sprague Dawley (~250-300 г) анестезировали пентобарбиталом натрия (50 мг/кг), трахею канюлировали трубкой PE-205 для поддержания проходимости дыхательных путей, и температуру поддерживали на уровне 37°C с помощью нагретой хирургической пластины. Катетер измерения давления 1,4F (Millar Inc., Houston, TX) вводили в правую сонную артерию для измерения давления в аорте. Правую яремную вену канюлировали трубкой PE-50 для введения тестируемых препаратов. Левую почку вскрывали путем ретроперитонеального разреза, и датчик Doppler flow probe (Model 0.5 VB, Transonic System Inc., Ithaca, NY) прикрепляли к левой почечной артерии для контроля кровотока. Пентобарбитал натрия (15 мг/кг, интраперитонеально) добавляли после завершения этих хирургических процедур. После уравнивания в течение 10-15 мин релаксин вводили при 1 мг/кг внутривенно в дозируемом объеме 0,15-1,82 мл/кг в течение 30 секунд с помощью инфузионного насоса (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Кровяное давление, частоту сердечных сокращений и почечный кровоток непрерывно регистрировали в течение 45 минут после введения релаксина, используя устройство Millar MPVS Ultra Signal Conditioning unit, подключенное к настольному компьютеру, на котором установлено программное обеспечение для сбора данных LabChart 7-Pro (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) (Табл. 5).

Таблица 5

Изменения почечного кровотока у крыс (сокращения, как в табл. 3).

Конъюгат релаксина	% изменение	SEQ ID NO: OF
--------------------	-------------	---------------

	RBF от исходного уровня	Пептидный компонент
WT-RLX	+25	
AQ1-20kDa PEG	+21	
BM25/AN1	-20	
BM25/AN1-C13-CH3	-100 <sup>a</sup>	
BM25/AN1- PEG36-C13-CH3	-90	
BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3	-25	
AQ1	-17	
AQ1-Glu-C13-CH3	-27 <sup>b</sup>	
AQ1-Glu-C13-COOH	+14 <sup>b</sup>	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	+20 <sup>b</sup>	
AQ1-PEG36-C13-COOH	+22	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	+24	
AQ1-PEG36-Glu-C15-COOH	+30	
AQ1-PEG24-Glu-C13-COOH	+15	
AQ1-PEG12-Glu-C13-COOH	+5	
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+2	101
AQ1-DRDDR-C13-COOH	+11	102
AQ1-KKKKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+12	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+19	104
AQ1-GGGEEE-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+11	105
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+7 <sup>b</sup>	106
AQ1-KKKGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+10 <sup>b</sup>	107
AQ1-GGGKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+9	109
AQ1-GSHHHHGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+16	110
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+6	157
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+5	158
AQ1-KSGSGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	+17	117
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-CH3	+1	126
AQ1-EEEGGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-CH3	+18	127
AQ1-GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	+10	139

<sup>a</sup>Животные умерли вскоре после введения соединения. Вскрытие показало бледное окрашивание почек, что указывает на полную утрату кровотока. <sup>b</sup>Было обнаружено, что соединение является слабо-растворимым.

Результаты, представленные в таблице, иллюстрируют сложную взаимосвязь между структурой и положением конъюгата, и результирующим почечным кровотоком. Взятый в отдельности WT-RLX вызвал увеличение почечного кровотока приблизительно на 25% по сравнению с исходным уровнем, что ожидалось с учетом известной сосудистой активности релаксина. Ожидалось, что различные тестируемые соединения, являющиеся агонистами релаксина (см. пример 7), также должны вызывать увеличение почечного кровотока. Однако удивительным образом наблюдалось, что некоторые из соединений вызвали снижение почечного кровотока. Такое нарушение почечного кровотока может быть клинически значимым противопоказанием, особенно при сердечной недостаточности, при которой часто наблюдается почечная недостаточность. Соединения BM25/AN1, BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3, AQ1 AQ1-Glu-C13-CH3 все привели к нарушению почечного кровотока (Табл. 5 выше).

Эти результаты были неожиданными и непредсказуемыми. Структурно родственные соединения проявляли различные эффекты на почечный кровоток. LEVEMIR®, одобренный FDA, выпускаемая на рынке форма инсулина длительного действия для лечения диабета, представляет собой конъюгат инсулин-C13-CH3, который продемонстрировал безопасность (NDA 21-878 компании Novo Nordisk A/S, стр. 1). В противоположность этому, введение BM25/AN1-C13-CH3, который является схожим по структуре с LEVEMIR®, был фатальным у крыс, и аутопсия показала бледные почки, что указывает на то, что почечный кровоток был заблокирован. Кроме того, релаксин AQ1, который содержит одну аминокислотную замену пара-ацетил-фенилаланином в положении 1 цепи А, снижал почечный кровоток, в то время как соединение AQ1-20 кДа PEG, которое содержит такую же неприродную аминокислотную замену, но конъюгирован с 20 кДа PEG, повышало почечный кровоток. Кроме того, BM25/AN1-PEG36-Glu-C13-CH3 уменьшало почечный кровоток, а AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3 повышало почечный кровоток. Некоторые из вышеупомянутых соединений, вызывающих уменьшение почечного кровотока, содержали РК-энхансер, оканчивающийся метильной группой, например, BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-

C13-CH<sub>3</sub> и AQ1-Glu-C13-CH<sub>3</sub>. Однако животные, обработанные AQ1-EEEEGGG-Glu<sup>γ</sup>-C15-CH<sub>3</sub> и AQ1-PEG36-Glu-C13-CH<sub>3</sub>, показали хороший почечный кровоток, что указывает на то, что метильная группа не всегда вызывает слабый почечный кровоток. Напротив, AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH и другие протестированные молекулы релаксина AQ1, конъюгированные с РК-энхансером, содержащие пептидный компонент и жирную кислоту -C13-COOH, -C14-COOH или -C15-COOH, в целом, показали улучшение почечного кровотока (Табл. 5 выше).

Пример 10: Исследования токсичности на крысах

AQ1-20 кДа-PEG вводили крысам подкожно в дозах 1, 5 и 15 мг/кг/сутки в течение 10 дней. После получения последней дозы животных подвергали эвтаназии, иссекали и проводили гистопатологию почек. Вакуоли наблюдали в эпителиальных клетках почечных канальцев при всех дозах (Фиг. 7С). Напротив, вакуоли не наблюдались в эпителиальных клетках почечных канальцев крыс, которым подкожно вводили носитель (150 мМ Arg в 10 мМ цитратном буфере, pH 5,5) в течение 10 дней (Фиг. 7А).

AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH вводили крысам подкожно в дозах 10 и 40 мг/кг/сутки в течение 7 дней. После последней дозы животных подвергали эвтаназии, иссекали и проводили гистопатологию почек. Вакуоли наблюдались в эпителиальных клетках почечных канальцев при всех дозах (Фиг. 7В).

AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH вводили крысам подкожно в дозах 5, 20 и 40 мг/кг/сутки в течение 7 дней. После последней дозы животных подвергали эвтаназии, иссекали и проводили гистопатологию почек. При всех дозах эпителиальные клетки почечных канальцев выглядели нормальными без каких-либо признаков вакуолей, связанных с исследуемым продуктом (Фиг. 7D).

Соединение AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH также показало хорошие результаты почечного кровотока (пример 9), благоприятный профиль растворимости (данные не показаны) и значительно более низкую вязкость, чем AQ1-20 кДа PEG.

Пример 11. Эффект релаксина на первичные фибробласты сердца человека.

Первичные фибробласты сердца человека (NHCF-V) приобретали у Lonza, Fairlawn, NJ (Cat.#: CC-2904). Клетки NHCF-V выделяли из желудочка нормальной ткани сердца взрослого человека. Клетки окрашивались положительно на α-актин гладких мышц и экспрессировали ≥ 90% коллагена I и ≤ 10% фактора VIII фон Виллебранда. Клетки при пассажах с 3 по 6 использовали для исследований методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном режиме времени (qRT-PCR). Клетки культивировали в полной среде FGM<sup>TM</sup>-3 BulletKit<sup>TM</sup> (Cat. #: CC-4526, Lonza), содержащей 10% FBS. При слиянии клетки разделяли и культивировали в 6-луночных планшетах с плотностью 150000/луночку в течение 24 ч в полной среде. Затем клетки заменяли на бессывороточную среду (Cat. #: CC-3131, Fibroblast Basal Medium, Lonza) в течение 24 ч, затем обрабатывали человеческим H2-релаксином (Cat. #: 3596-RN, R&D Systems) или AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH в присутствии 0,5 нг/мл TGF-β (Cat. #: 240-B, R&D Systems) в течение еще 24 ч. Выбор концентраций TGF-β для профилирования и продолжительности лечения был основан на предыдущих данных. Клетки в 6-луночных планшетах собирали для выделения тотальной РНК и анализа qRT-PCR.

Тотальную РНК экстрагировали с использованием RNeasy Mini Kit (Cat. #: 74106, Qiagen) в соответствии с протоколами производителя, включая удаление геномной кДНК на колонке. qRT-PCR в реальном времени выполняли в два этапа; синтез кДНК и детекцию в реальном времени проводили в PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) и ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), соответственно. TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) использовали в последующих реакциях PCR в соответствии с протоколами производителя. Все реакции qRT-PCR выполняли в двух повторах. Специфичные для последовательности праймеры для гладкомышечного альфа-актина (смысловой: 5'-AAATACTCTGTCTGGATCGGTGGCTCC-3' (SEQ ID NO:51); антисмысловой: 5'-CACATAGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGCTA-3' (SEQ ID NO:52)) и ген "домашнего хозяйства" L30 (смысловой: 5'-GCTGGAGTCGATCAACTCTAGG-3' (SEQ ID NO:53); антисмысловой: 5'-ССААТТТСГСТТТГССТТГТС-3' (SEQ ID NO:54)) были разработаны с использованием программного обеспечения Primer Express Version 2 (Applied Biosystems) на основе опубликованных последовательностей ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Уровни экспрессии альфа-актина гладких мышц были нормализованы до уровней экспрессии гена "домашнего хозяйства" L30. Человеческие фибробласты сердца, обработанные AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, анализировали на значительные различия от клеток, обработанных носителем, с использованием критерия Стьюдента (Microsoft Excel, Version 2013), при этом значение  $P \leq 0,05$  считается значимым.

Было продемонстрировано, что AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH снижает экспрессию профибротического гена, альфа-актина гладких мышц, в обработанных TGF-бета (0,5 нг/мл; 24 ч) первичных фибробластах сердца человека. Как показано на фигурах 6А-6В, снижения экспрессии генов было зависимым от концентрации и одинаково устойчивым как для человеческого релаксина H2, так и для AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH. AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH можно применять в качестве антифибротического агента для лечения фиброзных заболеваний, например, фиброза сердца.

Пример 12: Дополнительные примеры РК-энхансеров

РК-энхансеры, показанные ниже в таблице 6, получена, в целом, в соответствии со способами, описанными выше в примерах 4, 5 и 6. Эти РК-энхансеры конъюгированы с модифицированными полипептидами релаксина, содержащими не кодируемую в природных условиях аминокислоту (например, в положении 1 цепи А, такую как RLX-AQ1), с использованием способов, описанных в примере 3, и охарактеризованы, включая тестирование на биологическую активность, фармакокинетические свойства, эффекты на почечный кровоток, образование вакуолей и эффекты на фибробласты сердца, как описано в примерах 7-11.

Таблица 6  
Иллюстративные РК-энхансеры (сокращения, как в табл. 3, и как указано ниже).

Структура РК-энхансера	Пептидный компонент SEQ ID NO:
AAAAAS-X-FA	159
AAAAS-X-FA	160
AAAS-X-FA	161
AASAASAASAA-X-FA	162
AASAASAAS-X-FA	163
AASAAS-X-FA	164
AASSA-X-FA	165
AAS-X-FA	166
AGAGS-X-FA	167
AGAGS-X-FA	168
AGAS-X-FA	169
AGAS-X-FA	170
AGGAS-X-FA	171
AGGAS-X-FA	172
AGGGS-X-FA	173
AGGGS-X-FA	174
AS-X-FA	175
A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> S-X-FA	176
A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> S-X-FA	177
A <sup>β</sup> A <sup>β</sup> S-X-FA	178
A <sup>β</sup> S-X-FA	179
EGGEGG-Z-FA	180
EGGEGP-Z-FA	181
EGPEGP-Z-FA	182
GGAAS-X-FA	183
GGAAS-X-FA	184
GGAS-X-FA	185

GGAS-X-FA	186
GGGAS-X-FA	187
GGGAS-X-FA	188
GGGGGS-X-FA	189
GGGGGS-X-FA	190
GGGGS-FA	191
GGGGS-PEG2-PEG2-X-FA	192
GGGGS-X-C14-COOH	193
GGGGS-X-FA-хвост малоновой кислоты	194
GGGGS-X-FA-хвост янтарной кислоты	195
GGGGS-Z-FA	196
GGGGS-Z-FA	197
GGGGT-FA	198
GGGSG-X-FA	199
GGSSS-X-FA	200
GGSS-X-FA	201
GGSS-X-FA	202
GGGS-X-FA	203
GGTTTT-X-FA	204
GGSGGGG-X-FA	205
GGSGSGSGG-X-FA	206
GGSGSGGS-X-FA	207
GGSGGS-X-FA	208
GGSGG-X-FA	209
GGSGS-X-FA	210
GGSSG-X-FA	211
GGSSS-X-FA	212
GGSSS-X-FA	213
GGSS-X-FA	214
GGSS-X-FA	215
GGSS-X-FA	216
GGZ-FA	217
GGTTTT-X-FA	218
GGTTT-X-FA	219
GGTT-X-FA	220
GSGGG-X-FA	221
GSGGS-X-FA	222
GSGSGSGGS-X-FA	223
GSGSGSGS-X-FA	224
GSGSGS-X-FA	225
GSGSG-X-FA	226
GSGS-X-FA	227
GSP-Z-FA	228
GSSSS-X-FA	229
GSSS-X-FA	230
GSS-X-FA	231

GS-Z-FA	232
GTTT-X-FA	233
GTT-X-FA	234
KGGGS-Z-FA	235
KGGKGG-Z-FA	236
KK-PEG2-PEG2-X-FA	237
KKS-FA	238
KKS-Z-FA	239
KKT-FA	240
KKT-Z-FA	241
KK-X-хвост малоновой кислоты	242
KK-X-хвост янтарной кислоты	243
KK-Z-FA	244
KPKS-Z-FA	245
KSGGSK-Z-FA	246
KSGKSG-Z-FA	247
SGGGGG-X-FA	248
SGGGG-X-FA	249
SGGGG-X-FA	250
SGGGS-X-FA	251
SGGG-X-FA	252
SGG-X-FA	253
SG-X-FA	254

X = Glu<sup>γ</sup>, (D)-Glu<sup>γ</sup>, Asp<sup>α</sup>, Asp<sup>β</sup>, (D)-Asp<sup>α</sup>, or (D)-Asp<sup>β</sup>

Z = (D)-Glu<sup>γ</sup>, Asp<sup>α</sup>, Asp<sup>β</sup>, (D)-Asp<sup>α</sup>, or (D)-Asp<sup>β</sup>

FA = Fatty Acid = e.g., C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH;

PK-Энхансеры, показанные в табл. 7 ниже, синтезировали, в целом, в соответствии со способами, описанными в примерах 3-5 в настоящем документе. Эти PK-энхансеры конъюгировали с модифицированными полипептидами релаксина, содержащими не кодируемую в природных условиях аминокислоту (например, в положении 1 цепи A, например в RLX-AQ1), с использованием способов, описанных в примере 3, и снимали характеристики, включая тестирование на биологическую активность, фармакокинетические свойства, влияние на почечный кровоток, образование вакуолей и влияние на сердечные фибробласты, как описано в примерах 7-11.

Таблица 7

Иллюстративные PK-энхансеры

(сокращения: N-MeK: 6-N-метиллизин; Dar: 2,3-диаминопропионовая кислота; другие, как в табл. 3).

Структура PK-энхансера	Пептидный компонент SEQ ID NO:
GS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	255

GGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	256
GSP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	257
EGGEGG-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	258
Glu <sup>γ</sup> GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	259
EGGEGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	260
EGPEGP-Glu <sup>γ</sup> -C14-COOH	261
Spermine-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	
KGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	262
KSGGGSK-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	263
KSGKSG-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	264
KGGKGG-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	265
KPKS-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	266
dKdKdKdKdKdK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	267
DapDapDapDapDapDap-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	268
N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	269
dKdKdKGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	270
GGGEEE-Glu <sup>γ</sup> -C15-COOH	271
GGGEEE-Glu <sup>γ</sup> -C17-COOH	272
KKKKP-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	273
KKKKKK-C13-COOH	274
KAQKAQA-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	275
KKKKP-KKKK-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	276
KKKKKKGGG-Glu <sup>γ</sup> -C13-COOH	277
EEEGGG-dGlu <sup>γ</sup> -C13-CH <sub>3</sub>	278
GGGGS-Glu <sup>γ</sup> -C13-CH <sub>3</sub>	279

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, служат только для иллюстративных целей и что в свете этого различные модификации или изменения будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в сущность и сферу действия данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Также, следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена для описания только иллюстративных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы, процитированные в этой заявке, включены в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент и/или другой документ указывались как индивидуально включенные путем ссылки для всех целей.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, где

(a) модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи, и необязательно имеющий до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок и/или делеций в указанной А-цепи релаксина и/или указанной В-цепи релаксина;

(b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-замещенный, орто-замещенный или мета-замещенный фенилаланин;

(c) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с фармакокинетическим энхансером, содержащим пептидный компонент и фрагмент, удлиняющий период полувыведения, который содержит жирную кислоту или ее производное; и

(d) указанный пептидный компонент содержит GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139), DRDDR (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 103), RGGEKKKEKEK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 104), GGEEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 107), GGGKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 109), GSHHHHGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 113), KSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 117) или Glu<sup>γ</sup>.

2. Модифицированный полипептид релаксина по п.1, отличающийся тем, что указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-ацетил-L-фенилаланин.

3. Модифицированный полипептид релаксина по п.1 или 2, отличающийся тем, что:

(a) указанный пептидный компонент содержит от 3 до 10 аминокислот; или

(b) указанный пептидный компонент содержит от 4 до 8 аминокислот.

4. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный пептидный компонент содержит GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139).

5. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что:

(a) указанный увеличивающий период полувыведения фрагмент, который содержит жирную кислоту или ее производное, ковалентно связан с пептидным компонентом;

(b) указанный увеличивающий период полувыведения фрагмент содержит насыщенную жирную кислоту или ее производное;

(c) указанный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, который содержит жирную кислоту или ее производное, содержит жирную кислоту с концевой карбоновой кислотой;

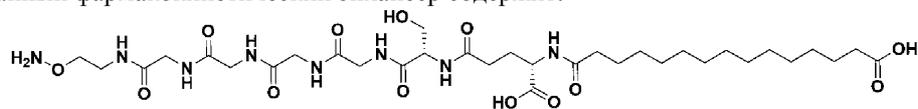
(d) указанный увеличивающий период полувыведения фрагмент, который содержит жирную кислоту или ее производное, включает жирную кислоту Формулы I:

-C<sub>n</sub>-COOH (Формула I),

где n равен от 10 до 18, при этом необязательно (i) n равен от 12 до 17; или (ii) n равен 13, 14 или 15;

(e) указанный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, который содержит жирную кислоту или ее производное, содержит -C<sub>14</sub>-COOH;

(f) указанный фармакокинетический энхансер содержит:



GGGGS-Glu<sup>γ</sup>-C<sub>14</sub>-COOH

(Формула II),

где аминоксигруппа связана с неприродной аминокислотой в указанном модифицированном полипептиде релаксина;

(g) указанный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, конъюгирован с указанным пептидным компонентом посредством амидной связи;

(h) указанный полипептид А-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 35 и указанный полипептид В-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и при этом указанная А-цепь или В-цепь релаксина необязательно имеет до двух дополнительных аминокислотных замен, вставок или делеций.

6. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, где

(a) модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи и имеющий ноль, одно или два дополнительных аминокислотных изменения в указанной А-цепи релакси-

на, и имеющий ноль, одно или два дополнительных аминокислотных изменения в указанной В-цепи релаксина, при этом каждое из указанных аминокислотных изменений независимо представляет собой замену, вставку или делецию;

(b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-замещенный, орто-замещенный или мета-замещенный фенилаланин, и

(c) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с фармакокинетическим энхансером, содержащим пептидный компонент, содержащий от 4 до 8 аминокислот, и фрагмент, удлиняющий период полувыведения, содержащий жирную кислоту Формулы I:

-C<sub>n</sub>-COOH (Формула I),

где n равен от 12 до 16, и указанный пептидный компонент содержит Glu<sup>γ</sup>.

7. Модифицированный полипептид релаксина по п.6, отличающийся тем, что указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-ацетил-L-фенилаланин.

8. Модифицированный полипептид релаксина по п.6 или 7, отличающийся тем, что указанный пептидный компонент содержит GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139), KKKKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 103), RGGEKKKKEK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 104), GGEEEE-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 107), GGGKKK-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 109), GSHHHHGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 113), KSGGSGG-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 117) или Glu<sup>γ</sup>.

9. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.6, 7 или 8, отличающийся тем, что:

(a) указанная жирная кислота ковалентно связана с указанным пептидным компонентом;

(b) указанный фрагмент, удлиняющий период полувыведения, содержит -C14-COOH; и/или

(c) n равен от 12 до 14.

10. Модифицированный полипептид релаксина по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что:

(a) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным пептидным компонентом; или

(b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь или триазольную связь, предпочтительно оксимную связь.

11. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что

(a) указанный полипептид А-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 4, замещенную указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 и необязательно имеющую одну дополнительную аминокислотную замену, вставку или делецию;

(b) указанный полипептид В-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, необязательно имеющую одну дополнительную аминокислотную замену, вставку или делецию; или

(c) указанный полипептид А-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 4, замещенную указанной не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1, и указанный полипептид В-цепи релаксина содержит SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

12. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что

(a) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь, и модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

(b) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь, и модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

(c) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь, и модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; или

(d) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером через оксимную связь, и модифицированный полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина, содержащий SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина, содержащий SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

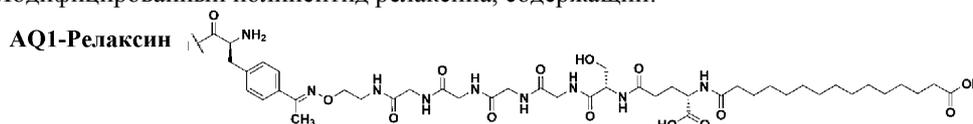
13. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи, при этом указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота

связана с указанным фармакокинетическим энхансером, и указанный фармакокинетический энхансер содержит пептидный компонент GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139).

14. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что полипептид релаксина содержит полипептид А-цепи релаксина с SEQ ID NO: 4 и полипептид В-цепи релаксина с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, замещенный не кодируемой в природных условиях аминокислотой в остатке 1 А-цепи;

при этом указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит пара-ацетил-L-фенилаланин, связанный с указанным фармакокинетическим энхансером, который содержит пептидный компонент, содержащий GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139); и фрагмент, увеличивающий период полувыведения, содержащий -C14-COOH.

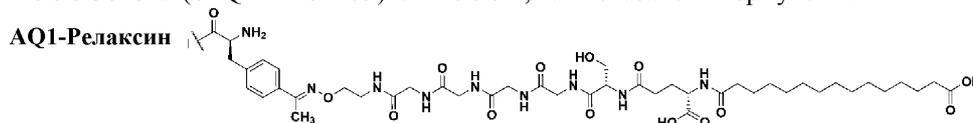
15. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий:



(Формула III).

где указанный AQ1-Релаксин содержит полипептид А-цепи релаксина с SEQ ID NO: 35, и полипептид В-цепи релаксина с SEQ ID NO: 6, при этом модифицированный пара-ацетил-фенилаланин, показанный в Формуле III, расположен на N-конце указанного полипептида релаксина А-цепи.

16. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий AQ1-GGGGS-Glu<sup>γ</sup>-C14-COOH, который содержит структуру, показанную на фиг. 8, которая содержит структуру, показанную на фиг. 9, или который содержит полипептид А-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 35 и полипептид В-цепи релаксина с последовательностью SEQ ID NO: 6, при этом модифицированный пара-ацетил-фенилаланин, расположенный на N-конце указанного полипептида А-цепи релаксина, связан с РК-энхансером GGGGS-Glu<sup>γ</sup> (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, как показано в Формуле III:



(Формула III).

17. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что:

- (а) указанный модифицированный полипептид релаксина является биологически активным;
- (б) указанный модифицированный полипептид релаксина является терапевтически эффективным для лечения одного или нескольких заболеваний или состояний, связанных с релаксином;
- (с) указанный модифицированный полипептид релаксина приводит к меньшему образованию почечной вакуоли по сравнению с AQ1-20 кДа PEG;
- (d) указанный модифицированный полипептид релаксина приводит к отсутствию или уменьшенному нарушению почечной функции по сравнению с AQ1-20 кДа PEG, необязательно при этом указанную функцию почек измеряют путем определения одного или нескольких из расчетной скорости клубочковой фильтрации, клиренса креатина, скорости клубочковой фильтрации инсулина или изотопной скорости клубочковой фильтрации;
- (е) указанный модифицированный полипептид релаксина не уменьшает почечный кровоток после введения, необязательно при этом указанный почечный кровоток измеряют путем определения клиренса пара-аминогиппурата;
- (f) указанный модифицированный полипептид релаксина способен увеличивать почечный кровоток после введения, необязательно при этом указанный почечный кровоток измеряют путем определения клиренса пара-аминогиппурата;
- (g) указанный модифицированный полипептид релаксина проявляет увеличенный период полувыведения *in vivo*; и/или
- (h) указанный период полувыведения *in vivo* увеличивается по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз или по меньшей мере в 50 раз.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, причем указанная фармацевтическая композиция содержит эффективное количество указанного модифицированного полипептида релаксина для лечения нарушения, связанного с релаксином.

20. Способ лечения заболевания, связанного с релаксином, включающий введение эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-17 или композиции по п.18

или 19 пациенту, нуждающемуся в этом, необязательно при этом указанное заболевание представляет собой:

(а) сердечно-сосудистое заболевание, такое как ишемическая болезнь сердца, сердечный приступ, аритмия, сердечная недостаточность, кардиомиопатия и сосудистое заболевание; или

(б) симптом сердечной недостаточности, такой как прогрессирующая сердечная недостаточность, кардиоренальный синдром, сердечную недостаточность с нарушением функции почек, хроническую сердечную недостаточность, хроническую сердечную недостаточность с фракцией среднего выброса (HFmEF), острую сердечную недостаточность, постострую сердечную недостаточность, компенсированную сердечную недостаточность, декомпенсированную сердечную недостаточность, недостаточность правого желудочка, недостаточность левого желудочка, глобальную сердечную недостаточность, ишемическую кардиомиопатию, дилатационную кардиомиопатию, сердечную недостаточность, связанную с врожденными пороками сердца, сердечную недостаточность, связанную с дефектами сердечного клапана, сердечную недостаточность, связанную с сочетанными дефектами сердечного клапана, диабетическую сердечную недостаточность, алкогольную кардиомиопатию, сердечную недостаточность, связанную с нарушениями сердечной памяти, диастолическую сердечную недостаточность, систолическую сердечную недостаточность, ремоделирование после миокарда, сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFGrEF), стенокардию, гипертензию, легочную гипертензию и легочную артериальную гипертензию, предпочтительно (i) хроническую сердечную недостаточность, острую сердечную недостаточность, постострую сердечную недостаточность, хроническую сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFGrEF), хроническую сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), хроническую сердечную недостаточность с фракцией среднего выброса (HFmEF), диастолическую сердечную недостаточность, систолическую сердечную недостаточность, ремоделирование после миокарда, стенокардию, гипертензию, легочную гипертензию и легочную артериальную гипертензию; или (ii) постострую сердечную недостаточность, прогрессирующую сердечную недостаточность, кардиоренальный синдром и сердечную недостаточность с нарушением функции почек, при этом необязательно указанный способ, кроме того, включает введение в комбинации, одновременно или последовательно с указанным модифицированным полипептидом релаксина по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбранного из ингибиторов АСЕ,  $\beta$ -блокаторов, диуретиков, антагонистов минералокортикоидных рецепторов, модуляторов рианодиновых рецепторов, активаторов SERCA2a, ингибиторов ренина, блокаторов кальциевых каналов, агонистов аденозиновых рецепторов A<sub>1</sub>, частичных агонистов аденозиновых рецепторов A<sub>1</sub>, ингибиторов дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, антагонистов рецептора ангиотензина II, антагонистов рецептора ангиотензина II со смещенным агонизмом по отношению к выбранным клеточным сигнальным путям, комбинаций антагонистов рецепторов ангиотензина II и ингибиторов фермента неприлизина, ингибиторов фермента неприлизина, активаторов растворимой гуанилатциклазы, активаторов АТФазы миозина, ингибиторов Rho-киназы 1, ингибиторов Rho-киназы 2, агонистов рецептора апелина, соединений, служащих донором нитроксила, ингибиторов кальций-зависимой киназы II, антифибротических агентов, ингибиторов галектина-3, антагонистов рецепторов вазопрессина, модуляторов FPR2 рецептора, агонистов рецептора натрийуретических пептидов, блокаторов каналов ваниллоида-4 с транзитным рецепторным потенциалом, антиаритмических средств, блокаторов канала I<sub>f</sub> "funny current", нитратов, соединений наперстянки, инотропных агентов и агонистов  $\beta$ -рецепторов, средств для восстановления клеточных мембран, например, Полосамера 188, антигиперлипидемических агентов, повышающих уровень HDL в плазме агентов, антигиперхолестеринемических агентов, ингибиторов биосинтеза холестерина (таких как ингибиторы HMG CoA редуктазы), агониста LXR, агониста FXR, пробукола, ралоксифена, никотиновой кислоты, ниацинамида, ингибиторов абсорбции холестерина, секвестрантов желчных кислот, анионообменных смол, четвертичных аминов, холестирамина, колестиопола, индукторов рецепторов липопротеинов низкой плотности, клофибрата, фенофибрата, безафибрата, ципрофибрата, гемфибризола, витамина B6, витамина B12, антиоксидантных витаминов, агентов против диабета, ингибиторов агрегации тромбоцитов, антагонистов рецепторов фибриногена, аспирина и производных фибриновой кислоты, ингибиторов PCSK9, аспирина и ингибиторов P2Y<sub>12</sub>, таких как клопидогрел.

21. Способ лечения заболевания, связанного с фиброзом, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-17 или композиции по п.18 или 19 пациенту, нуждающемуся в этом, необязательно при этом (а) указанное заболевание, связанное с фиброзом, включает фиброз сердца, легкого, почки, костного мозга или печени, дерматологический фиброз или фиброзное нарушение зрения, и/или (б) указанное заболевание, связанное с фиброзом, выбрано из фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза, прецирроза, диффузного паренхиматозного заболевания легких, кистозного фиброза, легочного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, идиопатического легочного фиброза, инъекционного фиброза, почечного фиброза, хронического фиброза почек, диабетического заболевания почек, очагового сегментного гломерулосклероза, мембранной нефропатии, нефропатии IgA, миелофиброза, сердечной недостаточности,

метаболической сердечной недостаточности, фиброза сердца, катаракты с фиброзом, катаракты, рубцов глаз, фиброза поджелудочной железы, фиброза кожи, кишечного фиброза, интестинального стеноза, эндомикардиального фиброза, атриального фиброза, медиастинального фиброза, болезни Крона, фиброза забрюшинного пространства, келоида, нефрогенного системного фиброза, склеродермии, системного склероза, артрофиброза, синдрома Пейрони, контрактуры Дюбюйтрена, диабетической невропатии, адгезивного капсулита, алкогольной болезни печени, гепатостеатоза, вирусного гепатита, заболевания желчевыводящих путей, первичного гемохроматоза, связанного с лекарственными средствами цирроза, криптогенного цирроза, болезни Вильсона, недостаточности альфа-1-антитрипсина, интерстициальной болезни легких (ILD), фиброзного заболевания легких человека, дегенерации желтого пятна, ретинопатии сетчатки, витреальной ретинопатии, миокардиального фиброза, офтальмопатии Грейвса, вызванного лекарственными средствами эрготизма, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза, воспалительного заболевания кишечника и коллагенозного колита, при этом необязательно указанный способ, кроме того, включает введение в комбинации, одновременно или последовательно с указанным модифицированным полипептидом релаксина по меньшей мере одного антифибротического агента указанному пациенту, такого как нинтеданиб, пирфенидон, антагонисты LPA1, антагонисты рецептора LPA1, аналоги GLP1, тралокинумаб (IL-13, AstraZeneca), висмодегиб (антагонист hedgehog, Roche), PRM-151 (пентраксин-2, TGF бета-1, Promedior), SAR-156597 (биспецифическое моноклональное антитело IL-4 и IL-13, Sanofi), симтузумаб ((антитело к подобному лизилоксидазе 2 белку (анти-BOXB2), Gilead), CKD-942, PTL-202 (PDE ингибитор/пентоксифиллин/NAC контролируемое пероральное высвобождение, Pacific Ther.), омипализиб (пероральный ингибитор PI3K/mTOR, GSK), IW-001 (пероральный растворимый мод. бычьего коллагена типа V, ImmuneWorks), STX-100 (антагонист интегрин альфа V/beta-6, Stromedix/Biogen), Actimmune (IFN гамма), PC-SOD (мидизмаза; ингалируемый, LTT Bio-Pharma/CKD Pharm), лебрикизумаб (гуманизированное моноклональное антитело к IL-13 SC, Roche), AQX-1125 (активатор SHIP1, Aquinox), CC-539 (ингибитор Ж, Celgene), FG-3019 (FibroGen), SAR-100842 (Sanofi) и оботихоловая кислота (OCA или INT-747, Intercept).

22. Способ лечения или предупреждения почечной недостаточности или улучшения, стабилизации или восстановления почечной функции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-17 или композиции по п.18 или 19.

23. Способ изготовления модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-17, включающий:

(a) обеспечение полипептида, содержащего указанную А-цепь релаксина и указанную В-цепь релаксина, при этом указанный полипептид содержит указанную не кодируемую в природных условиях аминокислоту; и

(b) связывание указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты с указанным фармакокинетическим энхансером, необязательно при этом:

(i) указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с указанным фармакокинетическим энхансером посредством оксимной связи, такой как оксимная связь, образованная в результате реакции карбонильной группы и аминоксигруппы, при этом необязательно указанная карбонильная группа представляет собой заместитель указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты, и указанная аминоксигруппа является компонентом указанного фармакокинетического энхансера, или указанная аминоксигруппа представляет собой заместитель указанной не кодируемой в природных условиях аминокислоты, и указанная карбонильная группа является компонентом указанного фармакокинетического энхансера; и/или

(ii) указанную не кодируемую в природных условиях аминокислоту рибосомально встраивают в указанный полипептид.

<b>WT-RLX</b>	А-цепь	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	В-цепь	<u>ASWMEEV</u> IKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

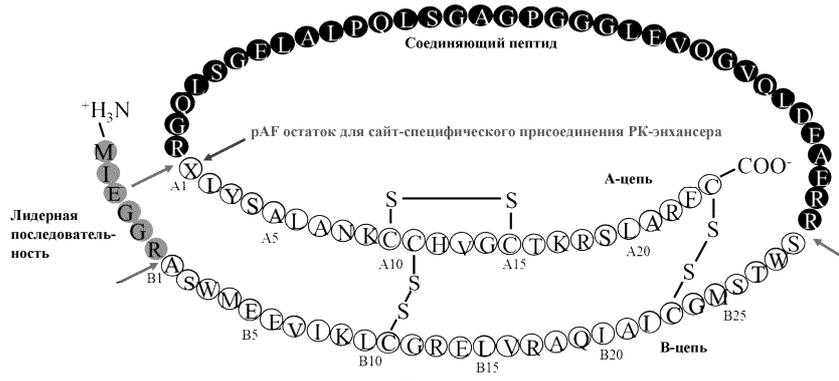
Фиг. 1

<b>RLX-AQ1</b>	А-цепь	( <u>pAcF</u> )LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	В-цепь	<u>ASWMEEV</u> IKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

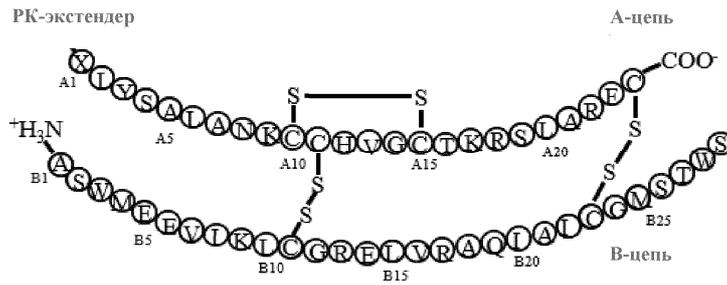
Фиг. 2

<b>RLX-BM25/AN1</b>	А-цепь	<u>N</u> LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	В-цепь	<u>ASWMEEV</u> IKLCGRELVRAQIAICG ( <u>pAcF</u> ) STWS

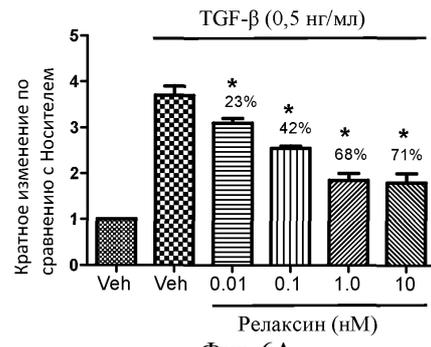
Фиг. 3



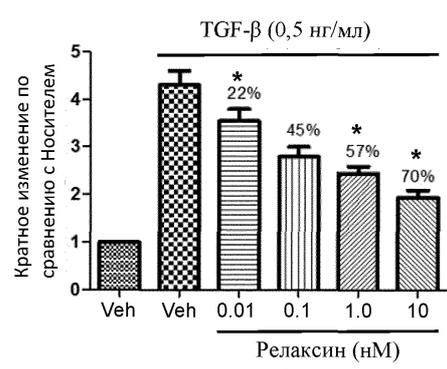
Фиг. 4



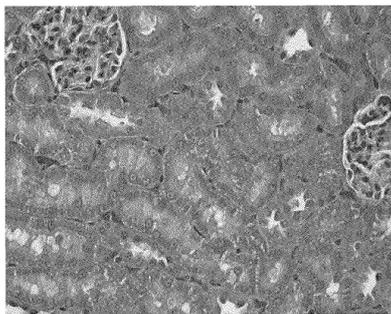
Фиг. 5



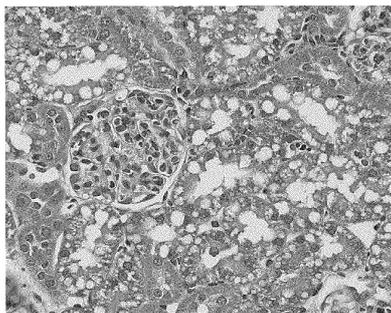
Фиг. 6А



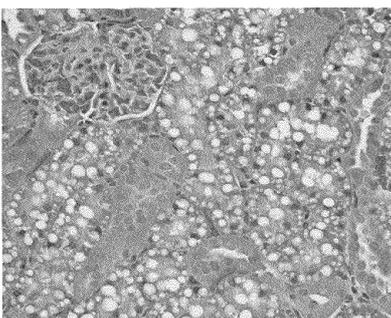
Фиг. 6В



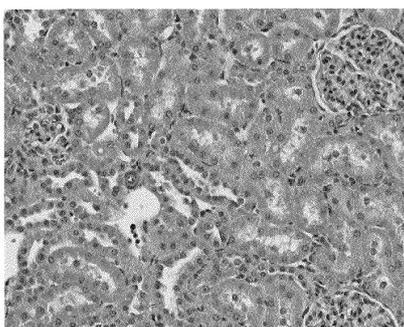
Фиг. 7А



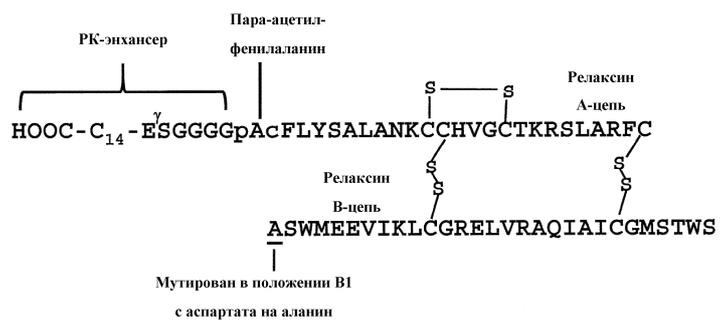
Фиг. 7В



Фиг. 7С

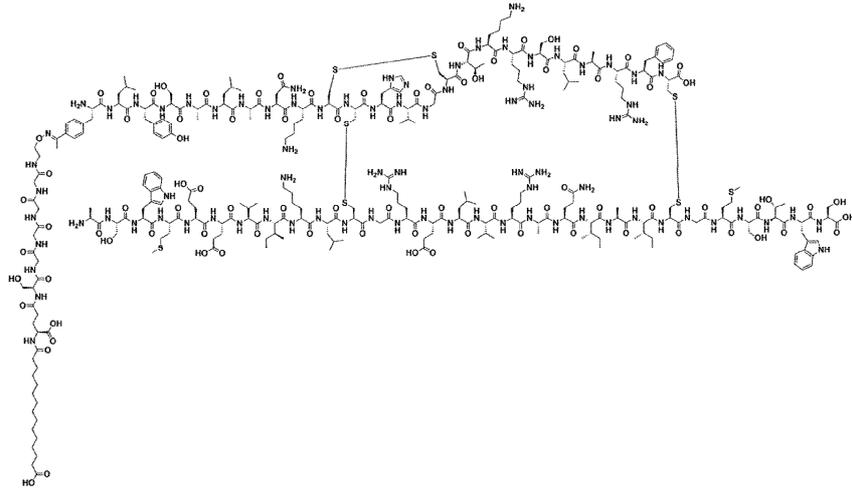


Фиг. 7D



Фиг. 8

043751



Фиг. 9

