

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044273**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.10**

(51) Int. Cl. *A61K 47/60* (2017.01)  
*A61K 47/61* (2017.01)

(21) Номер заявки  
**201691292**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.07.29**

---

(54) **СПОСОБ КОНЬЮГИРОВАНИЯ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИМЕРА С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ БЕЛКОМ**

---

(31) **61/369,186**

(32) **2010.07.30**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(62) **201300190; 2011.07.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:  
**Зикманн Юрген, Хайдер Штефан,  
Ротгенштайнер Ханспетер (AT),  
Ивенс Андреас (CH), Турецек Петер,  
Цехлинг Оливер (AT)**

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

(56) **WO-A2-2008025856**

**WO-A2-2005014024**

**WO-A1-1994028024**

**DIRKSEN Anouk et al. Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, p. 7581-7584**

**CORDES Eugene H. et al. Nucleophilic Catalysis of Semicarbazone Formation by Anilines. Journal American Chemical Society, March 5, 1962, Vol. 84, no.5, p. 826-831, табл. 1**

**THYGESEN Mikkel B. et al. Nucleophilic Catalysis of Carbohydrate Oxime Formulation by Anilines. J. Org. Chem., 2010, Vol. 75, p. 1752-1755**

**DIRKSEN Anouk et al. Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling. Bioconjugate Chem., 2008, Vol. 19, no. 12, p. 2543-2548**

**WO-A2-2011017055**

**WO-A2-2011012850**

**WO-A1-2010131015**

(57) Изобретение относится к способу конъюгирования водорастворимого полимера с окисленным углеводным фрагментом терапевтического белка, включающему контактирование окисленного углеводного фрагмента с активированным водорастворимым полимером в условиях, позволяющих конъюгацию. В частности, изобретение относится к способу, где водорастворимый полимер содержит активную аминоксигруппу и оксимная связь формируется между окисленным углеводным фрагментом и активной аминоксигруппой на водорастворимом полимере, где конъюгация проводится в присутствии м-толуидина.

**B1****044273****044273 B1**

### Область техники

Изобретение относится к способу конъюгирования водорастворимого полимера с окисленным углеводным фрагментом терапевтического белка.

### Уровень техники

Приготовление конъюгатов путем ковалентного связывания водорастворимого полимера с терапевтическим протеином может осуществляться различными химическими способами. Пегилирование полипептидных препаратов защищает их при циркуляции и улучшает их фармакодинамические и фармакокинетиические профили (Harris and Chess, *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:214-21). Во время процесса пегилирования происходит присоединение повторяющихся единиц этиленгликоля (полиэтиленгликоля - ПЭГ) к полипептидному препарату. Молекулы ПЭГ обладают большим гидродинамическим объемом (в 5-10 раз превышающим размер глобулярных белков), хорошо растворимы в воде и гидратированы, нетоксичны, неиммуногенны и быстро выводятся из организма. Пегилирование молекул может способствовать повышению устойчивости препаратов к ферментативному расщеплению, увеличивать период полужизни *in vivo*, уменьшать частоту введения доз, понижать иммуногенность, повышать физическую и термическую стабильность, растворимость, стабильность в жидком виде и уменьшать агрегацию. Первые пегилированные препараты были утверждены Управлением США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в начале 1990-х гг. С тех пор FDA утвердило ряд пегилированных препаратов для приема внутрь, парентерального введения и местного применения. Полисиаловая кислота (ПСК), также называемая коломиновой кислотой (КК), является природным полисахаридом. Это гомополимер N-ацетилнейраминовой кислоты с  $\alpha(2\rightarrow8)$ -кетозидными связями, содержащий вицинальные диольные группы на своем невосстанавливаемом конце. Она несет отрицательный заряд и встречается в организме человека. Она может быть легко получена с помощью бактерий в больших количествах и с predetermined физическими характеристиками (патент US No. 5846951). Поскольку бактериальная ПСК химически и иммунологически идентична человеческой ПСК, бактериальная ПСК неиммуногенна, даже при соединении с протеинами. В отличие от некоторых полимеров, ПСК подвергается биоразложению. При ковалентном соединении коломиновой кислоты с каталазой и аспарагиназой было выявлено увеличение стабильности этих ферментов в присутствии протеолитических энзимов плазмы крови. Сравнительные исследования *in vivo* с полисиалированной и немодифицированной аспарагиназой показали, что полисиалирование увеличивало время полужизни фермента (Fernandes and Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001; 217:215-24).

Связывание ПЭГ-производных с пептидами или белками описано в работе Roberts et al. (*Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:459-76). Один подход к связыванию водорастворимых полимеров с терапевтическими протеинами заключается в конъюгации полимеров с углеводными фрагментами молекул протеинов. Вицинальные гидроксильные (ОН) углеводные группы протеинов могут быть легко окислены периодатом натрия ( $\text{NaIO}_4$ ) с образованием активных альдегидных групп (Rothfus et Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, *J Biol Chem* 1971; 246:1889-94). Потом полимер можно соединить с альдегидными группами углеводов, используя реагенты, содержащие, например, активные гидразидные группы (Wilchek M and Bayer E.A., *Methods Enzymol* 1987; 138:429-42). Более современная технология заключается в использовании реагентов, содержащих аминоксигруппы, которые реагируют с альдегидными, формируя оксимные связи (WO 96/40662, WO 2008/025856).

Дополнительные примеры конъюгации водорастворимого полимера с терапевтическим протеином представлены в WO 06/071801, в котором описывается окисление углеводных фрагментов фактора фон Виллебранда и последующее связывание с ПЭГ гидразидным способом; публикации US No. 2009/0076237, в которой описывается окисление рФ VIII и последующее связывание с ПЭГ и иными водорастворимыми полимерами (например, ПСК, ГЭК (HES), декстран) гидразидным способом; WO 2008/025856, в котором описывается окисление различных факторов свертывания, в т.ч. рФ IX, Ф VIII и Ф VIIa и их с, например, ПЭГ, способом аминоксигрупп с формированием оксимных связей; и в патенте US No. 5621039, в котором описывается окисление Ф IX и последующее связывание с ПЭГ гидразидным способом.

Недавно был предложен улучшенный способ, заключающийся в мягком периодатном окислении сиаловых кислот с формированием альдегидных групп и последующем их взаимодействии с реагентом, содержащим аминоксигруппы в присутствии каталитических количеств анилина (Dirksen A., and Dawson P.E., *Bioconjugate Chem.* 2008; 19:2543-8; и Zeng Y. et al., *Nature Methods* 2009; 6:207-9). Катализ анилином значительно ускоряет образование оксимных связей, что позволяет использовать очень низкие концентрации реагента. Применение нуклеофильных катализаторов, также, описано в работах Dirksen, A., et al., *J Am Chem Soc*, 128:15602-3 (2006); Dirksen, A., et al., *Angew chem. Int Ed.*, 45:7581-4 (2006); Kohler, J.J., *Chem Bio Chem.*, 10:2147-50 (2009); Giuseppone, N., et al., *J Am Chem Soc*, 127:5528-39 (2005); и Thygesen, M.B., et al., *J Org Chem.*, 75:1752-5 (2010).

Хотя катализ анилином может ускорять образование оксимных связей, позволяя быстрое протекание реакции и использование низких концентраций аминокси-реагента, анилин характеризуется токсичностью, с которой приходится считаться, например, при конъюгировании терапевтического белка с целью получения лекарственного средства. Например, было показано, что анилин может вызывать мет-

гемоглобинемию (Harrison, J.H., and Jollow, D.J., *Molecular Pharmacology*, 32(3) 423-431, 1987). Долгосрочное его введение крысам с едой, как показано, приводило к образованию опухолей селезенки (Goodman, D.G., et al., *J Natl Cancer Inst.*, 73(1):265-73, 1984). Исследования *in vitro* также показали, что анилин способен вызывать хромосомные мутации и обладает потенциально генотоксической активностью (Bombhard E.M. et Herbold B., *Critical Reviews in Toxicology* 35,783-835, 2005).

Учитывая потенциально опасные свойства анилина и несмотря на то, что способы конъюгирования водорастворимых полимеров с терапевтическими протеинами известны, остается необходимость в разработке материалов и способов для конъюгирования водорастворимых полимеров с протеинами, которые улучшали бы фармакокинетические и/или фармакодинамические свойства белка с минимизацией затрат на различные реагенты, а также минимизировали бы риски для здоровья пациента-реципиента.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение предлагает способ для конъюгации полимеров и белков, что улучшает фармакодинамические и/или фармакокинетические свойства белков, минимизирующие затраты, связанные с различными реагентами и риски для здоровья пациентов-реципиентов при катализе реакции конъюгации нуклеофильным катализатором.

Настоящее изобретение относится к способу конъюгирования водорастворимого полимера с окисленным углеводным фрагментом терапевтического белка, где указанный способ включает:

а) первый этап, включающий корректировку величины рН раствора, содержащего терапевтический белок, до уровня рН от 5,0 до 8,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет от 0,3 мг/мл до 3,0 мг/мл;

б) второй этап, включающий контактирование терапевтического белка с желаемой избыточной концентрацией активированного водорастворимого полимера, при этом избыточная концентрация составляет от 1-молярного избытка до 300-молярного избытка, в условиях, включающих период времени от 15 мин до 24 ч, температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

в) третий этап, включающий добавление м-толуидина к раствору, полученному на втором этапе, при этом м-толуидин добавляют к полученному раствору в таком количестве, чтобы итоговая концентрация составила от 1 мМ до 50 мМ, в условиях, которые включают период времени от 0,1 мин до 30 мин; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

г) четвертый этап, включающий добавления окислителя к раствору, полученному на третьей стадии до итоговой концентрации от 50 мкМ до 1000 мкМ, где окислитель, выбран из группы, состоящей из натрия периодата (NaIO<sub>4</sub>), свинца тетраацетата (Pb(OAc)<sub>4</sub>) и калия перрутната (KRuO<sub>4</sub>);

д) пятый этап, на котором терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и окислителем в условиях, позволяющих конъюгацию активированного водорастворимого полимера с одним или более окисленных углеводных фрагментов терапевтического белка, где указанные условия включают период времени от 0,5 ч до 24 ч; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него, где один или более углеводных фрагментов терапевтического белка окисляют окислителем, и где между окисленным углеводным фрагментом и активной аминоксигруппой на активированном водорастворимом полимере формируется оксимная связь, и где формирование указанной оксимной связи катализируется м-толуидином; ф) шестой этап, на котором конъюгацию водорастворимого полимера с одним или более окисленных углеводных фрагментов терапевтического белка, начатую на пятом этапе, останавливают путем добавления гасителя, выбранного из группы, состоящей из L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (натрия метабисульфита), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; при этом гаситель добавляется, чтобы итоговая концентрация составила от 1 мМ до 100 мМ гасителя, в условиях, которые включают период времени от 5 мин до 120 мин; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

где указанный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветвленного ПЭГ, PolyPEG®, полисиаловой кислоты (ПСК), полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, декстрана, карбоксиметил-декстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, сополимера этилена с малеиновым ангидридом, сополимера стирола с малеиновым ангидридом, поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаль) (ПГФ); и

где терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из фактора IX (Ф IX), фактора VIII (Ф VIII), фактора VIIa (Ф VIIa), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), эритропоэтина (ЕРО), интерферона-альфа (IFN-альфа), интерферона-гамма, ангиопоэтина-2 (Ang-2), фактора роста васкулярного эндотелия (VEGF), гормона роста человека (HGH), фактора роста нервов (NGF), фактора некроза опухолей, инсулина, Humira (адалimumаба) и Prolia (денозумаба).

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ включает:

а) первый этап, включающий корректировку величины рН раствора, содержащего терапевтический белок, до уровня рН, равного 6,0, где концентрация терапевтического белка составляет от 1,0 мг/мл;

б) второй этап, включающий контактирование терапевтического белка с желаемой избыточной концентрацией активированного водорастворимого полимера, где избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих период времени 15 мин, температуру 22°C; в отсутствие света и при перемешивании;

с) третий этап, где м-толуидина добавляют в таком количестве, чтобы итоговая концентрация составила от 10 мМ;

д) четвертый этап, где окислитель представляет собой натрия периодат (NaIO<sub>4</sub>) и добавляется до итоговой концентрации от 400 мкМ;

е) пятый этап, на котором указанные условия включают период времени 2 часа; температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание; где один или более углеводных фрагментов терапевтического белка окисляют окислителем; и

ф) шестой этап, на котором гаситель представляет собой из L-цистеин, который добавляют, чтобы итоговая концентрация составила 10 мМ в условиях, которые включают период времени 60 мин; температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание.

В предпочтительном воплощении изобретения стадии от а) до ф) выполняют в одном сосуде.

В предпочтительном воплощении изобретения водорастворимым полимером является ПСК, которая состоит из 10-300 единиц сиаловой кислоты.

В предпочтительном воплощении изобретения терапевтический белок представляет собой белок свертывания крови, в частности такой как Ф IX или его биологически активный фрагмент, или Ф VIIa или его биологически активный фрагмент, или Ф VIII или его биологически активный фрагмент.

В предпочтительном воплощении изобретения м-толуидин присутствует в реакции конъюгации в концентрации 10 мМ.

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ дополнительно включает стадию очистки конъюгированного терапевтического белка. Предпочтительно конъюгированный терапевтический белок очищают способом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.

Предпочтительно, хроматография выбрана из группы, состоящей из хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), ионообменной хроматографии (IEC), эксклюзионной хроматографии (SEC), аффинной хроматографии и обратно-фазовой хроматографии. Предпочтительно, на хроматографическом этапе загрузки и хроматографическом этапе промывания используют антиагглютирующую соль. Предпочтительно, хроматографию выполняют в колонке. Предпочтительно, в колонке содержится хроматографическая смола, выбранная из группы, состоящей из фенилсефарозы FF и бутилсефарозы FF. При этом в колонке находится слой смолы высотой от 5 см до 20 см, предпочтительно высота слоя составляет 10 см.

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ содержит один или более этапов отмывания, при которых поток направляется вверх и при которых скорость потока составляет от 0,2 см/мин, до 6,7 см/мин, предпочтительно скорость потока составляет 2 см/мин.

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ содержит один или более этапов элюирования, при которых поток направляется вниз и при которых скорость потока составляет от 0,1 см/мин, до 6,7 см/мин, предпочтительно скорость потока составляет 1 см/мин.

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ дополнительно содержит концентрирование конъюгированного терапевтического белка способом ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ).

В предпочтительном воплощении изобретения итоговая концентрация терапевтического белка составляет от 0,5 до 3 мг/мл.

В предпочтительном воплощении изобретения терапевтический белок включает 5-11 фрагментов водорастворимого полимера.

В предпочтительном воплощении изобретения конъюгированный терапевтический белок очищают при помощи хроматографии; при этом на этапе загрузки и на этапе промывки используют антиагглютирующую соль; способ, который содержит один или более этапов промывания, при которых поток направляется вверх и при которых скорость потока составляет от 0,2 см/мин, до 6,7 см/мин, и один или более этапов элюирования, при которых поток направляется вниз и при которых скорость потока составляет от 0,2 см/мин, до 6,7 см/мин; дополнительно содержащий концентрирование конъюгированного терапевтического белка ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ).

Предпочтительно, хроматография является хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC); при этом скорость потока на одном или более этапов промывки равна 2 см/мин; и при этом скорость потока на одном или более этапов элюирования равна 1 см/мин.

В предпочтительном воплощении изобретения активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, включающим активную аминоксигруппу в условиях, позволяющих образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным

аминокси-линкером, где указанные условия включают период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света, при перемешивании или без него; с формированием водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу; и

б) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу по способу, выбранному из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ дополнительно включает стадии:

а') инкубирования раствора, содержащего водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, введенную на этапе а), с восстанавливающим агентом в условиях, позволяющих образование стабильной алкоксаминной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, упомянутые условия включают период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него; таким образом, чтобы этап а') был проведен после этапа а) и перед этапом б).

В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ дополнительно включает стадии:

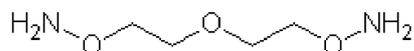
а') инкубирования раствора, содержащего водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, введенную на этапе а), с м-толуидином в условиях, включающих период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него; таким образом, чтобы этап а') был проведен после этапа а) и перед этапом б).

В предпочтительном воплощении изобретения указанный способ дополнительно включает стадию:

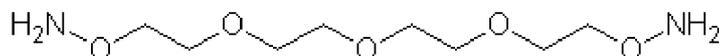
а") инкубирование раствора, содержащего водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, введенную на этапе а), с восстанавливающим агентом в условиях, позволяющих образование стабильной алкоксаминной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, где указанные условия включают период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2°C до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него; таким образом, чтобы этап а") был проведен после этапа а') и перед этапом б).

Предпочтительно, аминокси-линкер выбирают из группы, состоящей из:

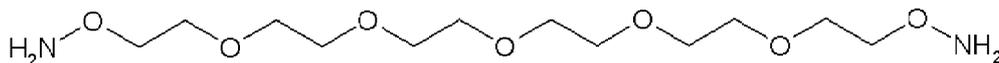
а) 3-оксапентан-1,5-диоксиаминового линкера формулы:



б) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминового линкера формулы:



в) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминового линкера формулы:



Предпочтительно, восстановитель выбирают из группы, состоящей из натрия цианоборогидрида ( $\text{NaCNBH}_3$ ), аскорбиновой кислоты (витамин С) и  $\text{NaBH}_3$ .

Предпочтительно, м-толуидин добавляют в таком количестве, чтобы обеспечить итоговую концентрацию от 1,0 мМ до 50 мМ м-толуидина.

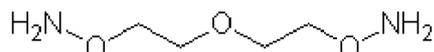
В предпочтительном воплощении изобретения предложенный способ дополнительно содержит концентрирование конъюгированного

терапевтического белка способом ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ).

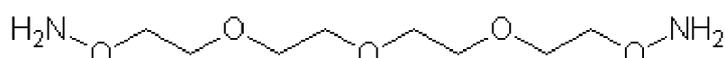
В предпочтительном воплощении изобретения ПСК получают взаимодействием активированного аминокси-линкера с окисленной ПСК;

где аминокси-линкер выбирают из группы, состоящей из:

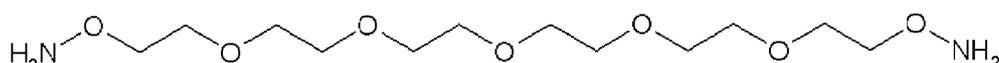
а) 3-оксапентан-1,5-диоксиаминового линкера формулы:



б) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминового линкера формулы:



в) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминового линкера формулы:



где ПСК окисляют инкубированием с окислителем с образованием терминальной альдегидной

группы на невосстанавливаемом конце ПСК.

Предпочтительно, аминокси-линкер представляет собой 3-оксапентан-1,5-диоксиамин.

#### Фигуры

На фиг. 1 показана первичная структура фактора свертывания крови IX (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 2 показано связывание окисленного рф IX с аминокси-ПСК.

На фиг. 3 показан синтез водорастворимых диаминоокси-сшивающих агентов 3-оксапентан-1,5-диоксиамины и 3,6,9-триоксоундекан-1,11-диоксиамины.

На фиг. 4 показано приготовление аминокси-ПСК.

На фиг. 5 представлена визуализация способом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) конъюгатов ПСК-ф IX, приготовленных в присутствии различных катализаторов, а) сравнение анилина с м-толуидином в различных концентрациях; б) сравнение анилина с о-аминобензойной кислотой, м-аминобензойной кислотой, п-аминобензойной кислотой, п-аминобензамидом и сульфаниловой кислотой; в) сравнение анилина и м-толуидина с о-анизидином и м-анизидином.

На фиг. 6 показаны процентные уровни полисиалирования с различными нуклеофильными катализаторами.

#### Детальное описание изобретения

Фармакологические и иммунологические свойства терапевтических протеинов могут быть улучшены путем химического модифицирования и конъюгации с полимерными соединениями, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), разветвленным ПЭГ, полисиаловой кислотой (ПСК), гидроксилалкилкрахмалом (ГАК), гидроксилэтилкрахмалом (ГЭК), углеводами, полисахаридами, пуллуланом, хитозаном, гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатом, дерматансульфатом, крахмалом, декстраном, карбоксиметилдекстраном, полиалкиленоксидом (ПАО), полиалкиленгликолем (ПАГ), полипропиленгликолем (ППГ), полиоксазолином, полиакрилоилморфолином, поливиниловым спиртом (ПВС), поликарбоксилатом, поливинилпирролидоном, полифосфазеном, полиоксазолином, сополимером полиэтилена с малеиновым ангидридом, сополимером полистирола с малеиновым ангидридом, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформалем) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфатом (МФС). Свойства получаемых конъюгатов обычно сильно зависят от структуры и размера полимера. Как правило, в данной отрасли предпочтительно использовать полимеры определенного размера или имеющие узкий интервал размеров. Синтетические полимеры типа ПЭГ легко могут быть синтезированы в узком интервале размеров, в то время, как ПСК может быть подвергнута очистке с получением полимерных молекул в узком интервале размеров. Также, реактивы для пегилирования с конкретными полимерными цепями и узким интервалом распределения размеров, присутствуют на рынке и имеются в продаже по доступным ценам.

Добавление растворимого полимера, например, полисиалирование - подход к улучшению свойств терапевтических белков, таких как белки системы свертывания крови, например, Ф IX, а также иных белков свертывания (например, ФВф, Ф VIIa (см., например, US 2008/0221032A1, включенный в настоящую заявку посредством ссылки) и Ф VIII).

Терапевтические белки.

В определенных воплощениях изобретения вышеупомянутые полипептиды и полинуклеотиды представлены следующими терапевтическими белками: ферментами, антигенами, антителами, рецепторами, белками свертывания крови, факторами роста, гормонами и лигандами. В определенных воплощениях терапевтический белок является белком свертывания крови, таким как фактор IX (Ф IX), фактор VIII (Ф VIII), фактор VIIa (Ф VIIa), фактор фон Виллебранда (ФВф), фактор FV (Ф V), фактор X (Ф X), фактор XI (Ф XI), фактор XII (Ф XII), тромбин (Ф II), белок С, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор (Тф) или протеаза ADAMTS 13. В одном воплощении терапевтический белок по изобретению является гликопротеином или, в различных воплощениях, белком, который не является природно гликозилированным *in vivo* (т.е. белком, который не содержит природного сайта гликозилирования или белком, который не гликозилирован в клетке-хозяине до очистки).

В определенных воплощениях терапевтический белок является иммуноглобулинами, цитокинами, такими как IL-1 альфа, IL-1 бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующий фактор-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), EPO, интерферон-альфа (IFN-альфа), консенсусный интерферон, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32 альфа, IL-33, тромбopoэтин (ТРО), ангиопоэтины, например, Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, человеческие ангиопоэтин-подобные полипептиды ANGPTL1 - 7, витронектин, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), ангиогенин, активны А, активны В, активны С, костный морфогенный белок-1, костный морфогенный белок-2, костный морфогенный белок-3, костный морфогенный белок-4, костный морфогенный белок-5, костный морфогенный белок-6, костный морфогенный белок-7, костный морфогенный белок-8, костный морфогенный белок-9, костный морфогенный белок-10, костный морфогенный белок-11, костный морфогенный белок-12, костный морфогенный белок-13, костный морфогенный белок-14, костный морфогенный белок-15, костного морфогенного белка рецептор IA, костного морфогенного белка рецеп-

тор IV, костного морфогенного белка рецептор II, мозговой нейротрофический фактор, кардиотрофин-1, цилиарный нейротрофический фактор, цилиарного нейротрофического фактора рецептор, крипто, криптический, цитокин-индуцированный хемотактический фактор нейтрофилов 1, цитокин-индуцированный хемотактический фактор нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцированный хемотактический фактор нейтрофилов 2 $\beta$ ,  $\beta$ -эндотелиальный фактор роста клеток, эндотелин 1, фактор роста эпидермиса, эпиген, эпирегулин, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, фактор роста фибробластов 4, фактор роста фибробластов 5, фактор роста фибробластов 6, фактор роста фибробластов 7, фактор роста фибробластов 8, фактор роста фибробластов 8b, фактор роста фибробластов 8с, фактор роста фибробластов 9, фактор роста фибробластов 10, фактор роста фибробластов 11, фактор роста фибробластов 12, фактор роста фибробластов 13, фактор роста фибробластов 16, фактор роста фибробластов 17, фактор роста фибробластов 19, фактор роста фибробластов 20, фактор роста фибробластов 21, фактор роста фибробластов кислотный, фактор роста фибробластов основной, линии глиальных клеток нейтрофического фактора рецептор  $\alpha$ 1, линии глиальных клеток нейтрофического фактора рецептор  $\alpha$ 2, рост-связанный белок, рост-связанный белок  $\alpha$ , рост-связанный белок  $\beta$ , рост-связанный белок  $\gamma$ , гепарин-связывающий фактор роста эпидермиса, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, гепатомный фактор роста, инсулин-подобный фактор роста I, инсулин-подобного фактора роста рецептор, инсулин-подобный фактор роста II, инсулин-подобного фактора роста связывающий белок, фактор роста кератиноцитов, фактор ингибирования лейкоза, фактора ингибирования лейкоза рецептор  $\alpha$ , фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейропозтин, нейтрофин-3, нейтрофин-4, онкостатин M (OSM), фактор роста плаценты, фактор роста плаценты 2, тромбоцитный фактор роста клеток эндотелия, тромбоцитный фактор роста, тромбоцитного фактора роста A цепь, тромбоцитный фактор роста AA, тромбоцитный фактор роста AB, тромбоцитного фактора роста B цепь, тромбоцитный фактор роста BB, тромбоцитного фактора роста рецептор  $\alpha$ , тромбоцитного фактора роста рецептор  $\beta$ , пре-B клеток роста фактор стимуляции, фактор стволовых клеток (SCF), рецептор фактора стволовых клеток, TNF, включая TNFO, TNF1, TNF2, фактор трансформирования роста  $\alpha$ , фактор трансформирования роста  $\beta$ , фактор трансформирования роста  $\beta$ 1, фактор трансформирования роста  $\beta$ 1.2, фактор трансформирования роста  $\beta$ 2, фактор трансформирования роста  $\beta$ 3, фактор трансформирования роста  $\beta$ 5, латентный фактор трансформирования роста  $\beta$ 1, фактора трансформирования роста  $\beta$  связывающий белок I, фактора трансформирования роста  $\beta$  связывающий белок II, фактора трансформирования роста  $\beta$  связывающий белок III, тимуса стромальный лимфопоэтин (TSLP), фактора некроза опухолей рецептор типа I, фактора некроза опухолей рецептор типа II, урокиназного типа плазминогена активатора рецептор, фактор роста сосудистого эндотелия и химерные белки, а также их биологически или иммунологически активные фрагменты.

В определенных воплощениях терапевтический белок является альфа-, бета- и гамма-интерферонами, колониестимулирующими факторами, включая гранулоцитарные колониестимулирующие факторы, факторами роста фибробластов, тромбоцитарными факторами роста, фосфолипаза-активирующим белком (PLA2), инсулином, растительными белками, например, лектинами и рицинами, факторами некроза опухолей и родственными аллелями, растворимыми формами рецепторов фактора некроза опухолей, рецепторами интерлейкина и растворимыми формами рецепторов интерлейкина, факторами роста, например, тканевыми факторами роста, такими как TGF $\alpha$  или TGF $\beta$  и факторами роста эпидермиса, гормонами, соматомединами, пигментарными гормонами, рилизинг-факторами гипоталамуса, антидиуретическими гормонами, пролактином, хорионическим гонадотропином, фолликул-стимулирующим гормоном, тиреоид-стимулирующим гормоном, тканевым активатором плазминогена и иммуноглобулинами, такими как IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, галактозидазой,  $\alpha$ -галактозидазой,  $\beta$ -галактозидазой, ДНКазой, фетуином, лютеинизирующим гормоном, эстрогеном, кортикостероидами, инсулином, альбумином, липопротеинами, фетопротеином, трансферрином, тромбопоэтином, урокиназой, ДНКазой, интегринными, тромбином, гемопоэтическими факторами роста, лептином, гликозидазами, Humira (адалimumабом), Prolia (денозумабом), Enbrel (этанерцептом) и их фрагментами, либо любыми слитыми белками, включающими любой из указанных выше белков или их фрагментов. В дополнение к упомянутым белкам, в табл. 1 ниже представлены терапевтические белки, охватываемые настоящим изобретением.

Таблица 1

Фолликулярный пептид, секретлируемый дендритными клетками	Ангиотензин-конвертирующий фермент	Член 6 семейства Интерлейкина-1	Герстатин
Дермокин	Антитромбин-III	Белок 2, экспрессируемый простатой и яичками	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 28
Секретлируемый связанный с ожогом белок 1	Аполипопротеин В-100	Секреторная фосфолипаза А2 Группы XIIA	LRRN4 C-терминально-подобный белок
Эктодисплазин-А	Аполипопротеин D	Коллаген альфа-3 (V) цепь	Lu6/PLAUR домен-содержащий белок 2
Секретлируемый связанный с ожогом белок 2	Аполипопротеин E	Альфа-2-макроглобулин-подобный белок 1	Трансмембранный белок 81
Резистин	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 1	Дерматопонтин	Миелиновый белок нуль-подобный белок 3
Остеопонтин	Костный морфогенный белок 7	Белок, связанный с хрящами	Гомолог белка notum
Секретлируемый связанный с ожогом белок 5	Субъединица субкомпонента В комплемента C1q	Эфиопский еж-белок	UDP-глюкуронозилтрансфераза 3A2
Секретлируемый связанный с ожогом белок 4	альфа цепь C4b-связывающего белка	Внеклеточный матричный белок 2	Протокадгерин альфа-1
Секретлируемый фосфопротеин 24	Кальретикулин	Желудочный внутренний фактор	Фосфолипаза D4
Глипикан-6	Кортикостероид-связывающий глобулин	Интерлейкин-33	Ретинолдегидрогеназа 10
Секретлируемый связанный с ожогом белок 3	Карбоксипептидаза A1	Костный морфогенный белок 2	Сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 14
C-C мотив хемокина 4	Карбоксипептидаза A2	Костный морфогенный белок 6	Трансмембранный белок 161A
Меланоцитный белок Pmel 17	Эотаксин	Неохарактеризованный белок KIAA0564	Трансмембранный белок 161B
Секретлируемый Lu-6/uPAR-родственный белок 1	C-C мотив хемокина 13	Cerberus	Трансмембранный белок 182
Бета-микросеминопротеин	C-C мотив хемокина 18	Карбогидратсульфотрансфераза 8	Белок FAM24B
Глипикан-4	C-C мотив хемокина 20	Контактин-связанный белок-подобный 3	Трансмембранный белок 52
Член 15 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2	Секреторная фосфолипаза А2-подобный белок группы XIIВ	Домен-содержащий белок 4 суперсемейства основного фасилитатора

Резистин-подобный бета	С-С мотив хемокина 2	Кортиколиберин	UDP- глюкуронозилтрансфераза 2A3
Член 12 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Трансформирующего фактора роста-бета-индуцированный белок ig-h3	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 19	Одонтогенный амелобласт-связанный белок
SPARC	CD40 лиганд	UPF0556 белок C19orf10	Нейросекреторный белок VGF
Глипикан-5	Корнеодесмозин	С-Х-С мотив хемокина 3	Секретируемый фосфопротеин 2, 24кДа
Антериорного градиентного белка 2 гомолог	Фактор комплемента D	Цистатин-М	Белок FAM150B
Белка сапору гомолог 2	Хромогранин-А	Дефенсин-5	Фактор роста/дифференциации 9
Глипикан-1	Коллаген альфа-1 (I) цепь	Дефенсин-6	Кластерин-подобный белок 1
Фон Виллебранда фактора А домен-содержащий белок 2	Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 18	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 18	Трансмембранный и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 2
WNT1-индуцируемого-сигнального пути белок 1	Цистеин-богатый секреторный белок LCC5 домен-содержащий 1	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 3	С-типа лектина домен-содержащий белок UNQ5810/PRO19627
С-С мотив хемокина 1	Коллаген альфа-4 (IV) цепь	Dickkopf-родственный белок 4	Эпидидимально-специфический липокалин-10
SPARC-связанный модулярный кальций-связывающий белок 2	Кератиноцит дифференциация-связанный белок	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 5	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 8
С-типа лектинового домена семейства 11 член А	Комплемент С4-В	Эпендимин-связанный белок 1 млекопитающих	Эпидидимально-специфический липокалин-8
Секретируемый Lu-6/uPAR-родственный белок 2	Коллаген альфа-2 (V) цепь	Фибриллин-3	Основной пролин-богатый пептид Р-Е
Глипикан-3	Комплемент С5	Фетуин-В	Мнимый неохарактеризованный белок C10orf99
Секретируемый и трансмембранный белок 1	Коллаген альфа-1 (VII) цепь	Фактор роста фибробластов 6	Неохарактеризованный белок C17orf77

Белок экспрессируемой в яичках последовательности 264	Компонент комплемента C7	Фактор роста кератиноцитов	Арилацетамид деацитаза-подобная 2
Глипикан-2	Компонент комплемента C8 бета цепь	Фактор роста/дифференциации 8	Эпидидимально-специфический липокалин-12
Сериновая протеаза 23	Компонент комплемента C8 гамма цепь	Желудочный ингибиторный полипептид	В меланомы антиген 2
39S рибосомальный белок L55, митохондриальный	Коллаген альфа-1 (XV) цепь	Гликопротеиновый гормон бета-5	В меланомы антиген 3
Гомолог 3А белка NipSnap	Коллаген альфа-1 (XVI) цепь	Гранзим М	Бычьего зародышевого плазменного белка гомолог 1
Фибронектин	Коллаген альфа-1 (XVIII) цепь	Гастрин-рилизинг пептид	Комплемент C1q-подобный белок 3
Нейдезин	Коллаген альфа-1 (XIX) цепь	Сериновая протеаза HTRA1	UPF0565 белок C2orf69
Фактора роста фибробластов рецептор 2	Хрящевой олигомерный матричный протеин	Интерферон альфа-4	UPF0669 белок C6orf120
Карбоновая ангидраза 6	C-реактивный белок	Интерферон альфа-5	Колипаза-подобный белок C6orf127
Белок, отсутствующий в злокачественных опухолях мозга 1	Гранулоцит-колониестимулирующий фактор	Интерферон альфа-7	Неохарактеризованный белок C7orf69
SPARC-связанный модулярный кальций-связывающий белок 1	Гранулоцит-макрофагоколониестимулирующий фактор	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 7	Тромбоцитарного фактора роста рецептор-подобный белок
Амилоид бета A4 белок	Белок CYR61	Член 10 суперсемейства иммуноглобулинов	Хондроадгерин-подобный белок
Член 6 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Комплемента компонента рецептора 1-подобный белок	Протеаза-связанный домен-содержащий белок 21 кДа	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6490/PRO21339
Гамма-аминомасляной кислоты типа В рецептора субъединица 1	Фактор роста стволовых клеток; лимфоцит-секретируемый лектин C-типа	Абгидролазы домен-содержащий белок FAM108A1	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6493/PRO21345
Про-нейрегулин-1, мембранно-связанная изоформа	СМР-N-ацетилсераминат-бета-галактозамид-альфа-2, 3-сиалилтрансфераза	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 9	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ5815/PRO19632

Гликопротеиновый гормон альфа-2	Дипептидиллептидаза 4	Интерлейкина-9 рецептор	Цистатин-А
Мембранная металло-эндопептидаза-подобный 1	Дентин сиалофосфопротеин	Интерлейкин-9	Ингибитор пептидазы R3HDML
Fc рецептор-подобный А	Эндотелин-1	Ингибина бета В цепь	Цистатин-9
С-С мотив хемокина 4-подобный	Эфрин-В1	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 2	Член 5 семейства домена DAN
Эпителиального дискоидина домен-содержащий рецептор 1	Эпидермис-специфической сериновой протеазы-подобный белок	ВМР-связывающий эндотелиальный регуляторный белок	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок-подобный 1
Муцин-1	EMILIN-1	Кератиноцит-связанный белок 2	Эпидидимально сперма-связывающий белок 1
Фактор роста сосудистого эндотелия А	Эндоплазмин	Ламинина субъединица альфа-1	Элафин
Фибулин-1	Эфрина типа-А рецептор 3	Лейкоцитарный клеточный хемотаксин-2	Белок FAM55A
Рецептор пролактина	Эфрина типа-В рецептор 6	Желудочная триацилглицеринлипаза	Фактор роста/дифференциации 6
Пропотеин конвертаза субтилизин/кексин типа 6	Гликозилтрансферазы 1 домен-содержащий белок 1	Лейцин-богатый повторами и гомолога калпонины домен-содержащий белок 3	Глюкозы-фруктозы оксидоредуктазы домен-содержащий белок 1
CD209 антиген	Фактор коагуляции X	Панкреатический липаза-связанный белок 2	Эритропоэтин
Коллаген альфа-2 (XI) цепь	Фактор коагуляции VIII	Эпидидимис-специфическая альфа-маннозидаза	Глутатионпероксидаза 6
Гранулоцит-макрофагоколониестимулирующий фактора рецептора субъединица альфа	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 7	Фибронектина типа III домен-содержащий белок 7	Неохарактеризованный белок UNQ511/PRO1026
Эластин	Фибриллин-2	Микрофибриллы-связанный белок 5	Бета-дефенсин 128
Интерлейкина-15 рецептора субъединица альфа	Альфа-2-НС-гликопротеин	Мюллер-ингибирующий фактор	Интерлейкин-31
Мидкин	Фактор роста фибробластов 10	Металлопротеиназа матрикса-21	Интерлейкин-34
Интегрин альфа-7	Фибриноген альфа цепь	Металлопротеиназа матрикса-17	Плазменный калликреин-подобный белок 4
Муцин-4	Фибриноген бета цепь	Матричная металлопротеиназа-20	Эпидидимально-специфический липокалин-9

Пептидил-глицин альфа-амидирующая монооксигеназа	Белок, связанный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа 1	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы субъединица гамма	кДНК FLJ60957, высокоаналогичная Секретируемому связанному с ожогом белку 4
Аполипопротеин А-1	Гастрин	Мультимерин-2	Липазы член М
Протеогликан 4	Гликопротеинового гормона альфа-цепь	Промотилин	СLECSF12
Член 25 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы субъединица альфа/бета	FRAS1-родственный белок внеклеточного матрикса 3	Мнимая неактивная секреторная фосфолипаза A2 группы IIC
Аттрактин	Гранзим А	Протеинкиназы С-связывающий белок NELL1	Сериновая протеаза MPN2
Простата-ассоциированный микросеминпротеин	Фактора роста гепатоцитов-подобный белок	Протеинкиназы С-связывающий белок NELL2	Нетрин-5
Альфа-амилаза 1	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок 1	Нейротрипсин	NHL повтор-содержащий белок 3
Мозговой нейротрофический фактор	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок 2	Нейросерпин	Офлактомедин-подобный белок 2B
С-типа лектинового домена семейства 4 член М	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок 4	Нидоген-2	Овохимаза-2
Гранулоцит-колониестимулирующего фактора рецептор	Член 10D суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Абгидролазы домен-содержащий белок FAM108B1	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ3029/PRO9830
Инсулин-подобный фактор роста II	Интерферон альфа-1/13	Нейротрофин-4	Овохимаза-1
Карциноэмбрионная антиген-родственная молекула клеточной адгезии 1	Интерферон-индуцированной геликазы С домен-содержащий белок 1	Эпидидимальная секреторная глутатионпероксидаза	Мнимый беременность-специфический бета-1-гликопротеин 7
С-типа лектинового домена семейства 7 член А	Интерферон альфа-2	Группы 10 секреторная фосфолипаза A2	Овостатина гомолог 2
CMRF35-подобная молекула 1	Интерферон бета	Группы IID секреторная фосфолипаза A2	Орексигенный нейропептид QRFP

Холина транспортера- подобный белок 4	Интерферон гамма	Лактопероксидаза	Лимфоцитарный антиген 6K
Легочный сурфактант- ассоциированный белок A1	Инсулин-подобный фактор роста IB	p53 апоптоза эффектор, родственный RMP-22	Белок, экспрессируемый простатой и яичками 1
Сперминоксидаза	Индийский еж-белок	Плацента-специфический белок 1	Мнимая фосфолипаза B- подобный 1
СМР-N-ацетилнейраминат- бета-1,4-галактозид альфа-2,3- сиалилтрансфераза	Нервных клеток адгезивная молекула L1-подобный белок	Тубероинфундибулярный пептид с 39 остатками	Мнимый неохарактеризованный белок FLJ42147
Калликреин-8	Интерлейкин-13	Проларгин	Отогелин
Тканевого типа плазминогена активатор	Интерлейкин-2	Секретогранин-2	Рибонуклеаза 8
Пероксисомальная N(1)- ацетил-спермин/ спермидиноксидаза	Химотрипсин-подобной эластазы семейства член 2A	Эндонуклеазы домен- содержащий 1 белок	Ядерной поры комплекса- взаимодействующий белок- подобный 2
Вероятная пальмитойлтрансфераза ZDNHC4	Ингибина бета A цепь	Семафорин-3B	Проактиватора полипептида-подобный 1
Холестерилового сложного эфира транспортерочный белок	Панкреатический секреторный трипсина ингибитор	Соматостатин	Белка spinster гомолог 2
HLA класса I гистосовместимости антиген, A-2 альфа цепь	Член 21 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 4- подобный 2	фон Виллебранда фактора C домен-содержащий белок 2-подобный
Коллаген альфа-1(II) цепь	Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь N1	Транскобаламин-1	Уротензин-2B
Про-интерлейкин-16	Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь N2	Клеверный фактор 2	Тетраспанин-18
Рецептор лептина	Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь N3	Тестикан-1	UPF0514 мембранный белок FAM159A
Декорин	Простата- специфический антиген	Сывороточная параоксоназа/лактоназа 3	Латерин
Стромальных клеток фактор 1	Калликреин-4	Толлоид-подобный белок 2	Метилтрансфераза- подобный белок 7B
Тенасцин	Плазменный калликреин	Трипсин-2	Белок TEX261
Дизинтегрин и металлопротеиназы домен- содержащий белок 12	Кальций- активированный хлоридного канала регулятор 4	RING пальцевый и SPRY домен-содержащий белок 1	Алкилированной ДНК восстанавливающего белка alkB гомолог 7

Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 13	Бактерицидный/проницаемость-повышающий белок-подобный 1	Кальций-связывающий и суперспиральный домен-содержащий белок 1	Трансмембранный emp24 домен-содержащий белок 6
T-клеток поверхностного гликопротеина CD8 альфа цепь	Лептин	Белок Wnt-2	XK-родственный белок 5
EGFR-коамплифицируемый и переэкспрессируемый белок	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 4	Эктонуклеазид трифосфат дифосфогидролаза 8	Мнимый V-набора и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 7
Аутофагия-родственный белок 16-1	Печеночная триацилглицеринлипаза	Белок Wnt-8b	Инсулинового фактора роста-подобный член семейства 3
Рака молочной железы анти-эстроген-резистентного белок 3	Лимфоцитного антигена 6 комплексного локуса протеин G6c	UDP-GlcNAc:бетаGal бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 4	Ядерной поры комплекса-взаимодействующий белок-подобный 1
Кадгерин-23	Эозинофиллизофосфолипид аз	EMI домен-содержащий белок 1	Секретируемый фосфопротеин 1
Макрофаговый колониестимулирующий фактор 1	Лютропина субъединица бета	Неохарактеризованный белок C6orf15	Коллаген альфа-5(VI) цепь
Фолатный рецептор альфа	Микрофибрилярно-связанный белок 1	Коллектин-10	В меланомы антиген 5
Низкой плотности липопротеинов рецептор-родственный белок 8	Мезенцефалический астроцитарный нейротрофический фактор	Длинноцепочечных жирных кислот--КоА лигаза ACSBG2	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 10A
E3 убиквитин-протеинлигаза LRSAM1	Матрикса Gla белок	Онкопротеин-индуцированный транскриптный белок 3	UPF0369 белок C6orf57
Нервных клеток адгезивная молекула 1	72 кДа типа IV коллагеназа	Ингибитор пептидазы 15	Мнимый неохарактеризованный белок C10orf31
Невролигин-4, X-связанный	Стромелизин-1	Пролин-богатый кислотный белок 1	Мнимый неохарактеризованный белок C11orf45
Нетрин-G1	Нейтрофилколлагеназа	Урокортин	Неохарактеризованный белок C12orf28
GPI трансамидазы компонент PIG-T	Мезотелин	Трипсин-X3 (EC 3.4.21.4)	Неохарактеризованный белок C17orf67

Kit лиганд	Муцин-5AC	ННIP-подобный белок 2	Бета-дефенсин 121
Seizure 6-подобный белок	Муцин-6	Фракталкин	Бета-дефенсин 130
SLAM семейства член 7	Норрин	Белок Wnt-11	Гистидиновой триады нуклеотид-связывающий белок 2
Фактор некроза опухолей	Окситоцин-нейрофизин 1	Белок Wnt-7a	Апелин
Уромодулин	Бета-фактор роста нервов	FCN и двойных доменов SH3 белок 1	Плацента-специфический белок 9
Член 13 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Член 18 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Гепатомный фактор роста-родственный белок 2	Гепатоклеточный карциномы-связанный белок TD26
Белок CREG1	Нейротрофин-3	Интерлейкина-12 субъединица альфа	Персефин
EGF-подобный домен-содержащий белок 8	Тромбоцитарного фактора роста субъединица A	UPF0577 белок KIAA1324	Регулированный эндокрин-специфический белок 18
Аминоацил тРНК синтетаза комплекс-взаимодействующий многофункциональный белок 1	Фосфопантотеноилцистеиндекарбоксилаза	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 9	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 8
ADAMTS-подобный белок 4	Ингибитор активатора плазминогена 1	Муцин-17	Костный морфогенный белок 8A
фактор коагуляции XI	Ингибитор активатора плазминогена 2	Лизосомный белок NCU-G1	Белок WFDC13
Интерлейкина-22 рецептора субъединица альфа-2	Проколлаген С-эндопептидазы усилитель 1	Пролил 4-гидроксилазы субъединица альфа-3	Белок Wnt-8a
Деформированного эпидермиса ауторегуляторного фактора 1 гомолог	Трансмембранный и убиквитин-подобный домен-содержащий белок 2	Пептидил-пролил цис-транс изомераза SDCCAG10	Ig-подобный домен-содержащий белок ENSP00000270642
Простагландин-H2 D-изомераза	Протеин дисульфид-изомераза	Ингибитор пептидазы 16	Абгидролазы домен-содержащий белок 15
Альфа-1-антитрипсин	Пигментного эпителия-производный фактор	Полиовирус рецептор-родственный белок 4	Рибонуклеаза-подобный белок 9

Альфа-1-антихимотрипсин	Пепсин А	Носителей растворенных веществ семейства 22 член 15	Неохарактеризованный белок C2orf66
Ацил-КоА-связывающий белок	Гастриксин	GPI инозитол-деацилаза	Неохарактеризованный белок C17orf99
Фактор комплемента В	Sonic еж-белок	Трансмембранный белок 43	Белок FAM150A
Хориогонадотропина субъединица бета	Распознавания пептидогликана белок I-альфа	Ангиопозтин-родственный белок 2	Плацента-специфический 1-подобный белок
Versican ядерный белок	Бигликан	Ангиопозтин-родственный белок 6	Неохарактеризованный белок C18orf20
Рецептор фактора роста эпидермиса	Пролактин-индуцируемый белок	Арилсульфатаза К	Бета-дефенсин 110
Экто-NOX дисульфид-тиол обменник 2	Фактор тромбоцитов 4	Авгурин	Невритин-подобный белок
Гиалуронидаза-1	Плазминоген	Мозг-специфическая сериновая протеаза 4	Гистидин-богатый белок карбоксильного конца 1
Интерлейкина-1 рецептора антагонистический белок	Сывороточная параоксоназа/арилэстераза 1	ДВН-подобный монооксигеназный белок 1	С-типа лектинового домена семейства 2 член А
Интерлейкина-6 рецептора субъединица бета	Щелочная фосфатаза, плацентарного типа	Неохарактеризованный белок C1orf56	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 70
Интерлейкина-1 рецептор-подобный 1	Пептидил-пролил цис-транс изомераза В	Церебеллин-3	Серпин А13
Инсулин	Костномозговой протеогликан	Церебеллин-4	ВТВ/POZ домен-содержащий белок 17
Гликоделин	Основной слюнный пролин-богатый белок 1	Колипаза-подобный белок C6orf126	Неохарактеризованный белок C12orf53
Паратгормон-родственный белок	Легочный сурфактант-ассоциированный белок С	Неохарактеризованный белок C11orf83	С-типа лектинового домена семейства 9 член А
Нурип	Паратгормон	Неохарактеризованный белок C16orf89	Комплемент C1q-подобный белок 4
Пролил 4-гидроксилазы субъединица альфа-2	Сывороточный амилоид Р-компонент	Карбоксипептидаза-подобный белок X2	CMRF35-подобная молекула 4
CD276 антиген	Секретогранин-1	Цистатин-9-подобный	Белок FAM151B
Цистеин-богатый с EGF-подобным доменом белок 1	Сердцевинный белок базальной мембраны-специфического гепарансульфат протеогликана	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 13	Абгидролазы домен-содержащий белок FAM108A2/A3
СUB и sushi домен-содержащий белок 1	Антилейкопротеиназа	Бета-дефенсин 123	Остеокрин

Фиколин-2	Стабилин-1	Бета-дефенсин 132	Трансмембранная протеаза, сериновая 11E2
Fc рецептор-подобный белок 5	Внеклеточная супероксиддисмутаза [Cu-Zn]	Цитокин-подобный белок 1	Трансмембранный белок 14E
Белок GPR89	Соматотропин	Dickkopf-родственный белок 2	Трансмембранный белок 207
Соединительная адгезивная молекула А	Серпин В5	Dickkopf-подобный белок 1	ТОММ20-подобный белок 1
Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 8А	Спондин-1	Эпидидимальный секреторный белок Е3-бета	Неохарактеризованный белок C3orf41
Множественная инозитолполифосфатфосфатаза 1	Белок обеспечения структур хромосом 3	EGF-подобный повторный и дискоидин I-подобный домен-содержащий белок 3	Подчелюстной железы андроген-регулируемый белок 3А
Нейропилин-1	Синтаксин-1А	Белок FAM55D	В меланомы антиген 1
Плексин-А4	Тетранектин	Фактор роста фибробластов 17	Неактивная карбоксилэстераза 4
Плексин-В1	Трансформирующий фактор роста бета-1	Фактор роста фибробластов 22	Четырехсочлененный коробочный белок 1
Периостин	Тироглобулин	Фибробластов фактор роста-связывающий белок 2	Белок HSN2
Белок RIC-3	Ингибитор металлопротеиназы 1	Фактор роста/дифференциации 3	Гуманин
SLIT и NTRK-подобный белок 2	Ингибитор металлопротеиназы 2	GLIPR1-подобный белок 1	Килин/хордин-подобный белок
Сульфатаза-модифицирующий фактор 1	Ингибитор металлопротеиназы 3	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 6	UPF0624 белок C6orf186
Сульфатаза-модифицирующий фактор 2	Урокиназного типа активатор плазминогена	Интерлейкин-17В	Мнимый нейрофибромин 1-подобный белок 4/6
Трансмембранная протеаза, сериновая 6	Лактотрансферрин	Интерлейкин-17С	Пероксидазин-подобный белок
Лимфотоксин-альфа	Трипсин-1	Интерлейкин-17D	SCO-спондин
Член 10В суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Подчелюстной железы андроген-регулируемый белок 3В	Гиалуронана и протеогликана сшивки белок 3	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ9165/PR028630
Урокиназы плазминогена активаторный поверхностный рецептор	Член 1А суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Вителлин-мембранного белка 1 внешнего слоя гомолог	Кальций-активированный хлоридного канала регулятора член семейства 3

V-набора домен-содержащий T-клеток активации ингибитор 1	Фактора роста сосудистого эндотелия рецептор 1	Хориогонадотропина субъединицы бета вариант 1	Вероятная сериновая протеаза UNQ9391/PRO34284
Плюкагон	Витамин D-связывающий белок	Лизоцим-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C4orf26
N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза	Витронектин	Металлопротеиназа матрикса-28	Неохарактеризованный белок C4orf40
Сульфгидрилоксидаза 1	фон Виллебранда фактор	Нефронектин	Неохарактеризованный белок C5orf55
Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 4	Лимфоцитного антигена 6 комплексного локуса протеин G5c	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 12	Мнимый макрофаг-стимулирующий белок MSTP9
Интерлейкин-18-связывающий белок	Цинк-альфа-2-гликопротеин	Ольфагомедин-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C15orf61
Kin IRRE-подобный белок 2	Неохарактеризованный белок C14orf93	Офлактомедин-подобный белок 2A	Химотрипсиноген B2
Миелоид-ассоциированный маркер дифференциации	Ретиношизин	Сериновая протеаза 27	Бета-дефенсин 108A
Хордин	Альфа-1,3-маннозилтрансфераза ALG2	Секретоглобина семейства 3A член 2	Бета-дефенсин 111
1-ацил-sn-глицерин-3-фосфат ацилтрансфераза гамма	C-типа лектинового домена семейства 11 член A изоформа CRA_b	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 2	Мнимый V-набора и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 6
Ведущего конца гликозилирования продукт-специфический рецептор	Домен-содержащий белок 7 суперсемейства основного фасилитатора	Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 28	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 5-подобный 3
NLR семейства CARD домен-содержащий белок 4	Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный нейрональный белок 1	Бактерицидный/проницаемость-повышающий белок-подобный 2	Мнимый сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 5-подобный 2
Про-нейрегулин-2, мембрана-связанная изоформа	NADH дегидрогеназы [убихинон] 1 бета субкомплекса субъединица 11, митохондриальная	Кислой сфингомиелиназы-подобная фосфодиэстераза 3b	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 7C
Сперма-ассоциированный антиген 11A	UPF0546 мембранный белок C1orf91	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 7	Бета-дефенсин 131
Ооцит-секретируемого белка 1 гомолог	Карбоновая ангидраза-родственный белок 10	Нейрексофилин-4	Бета-дефенсин 134

Сывороточный альбумин	Холецистокинин	Белок Wnt-9b	Бета-дефенсин 136
Кохлин	Коданин-1	Зимогенового гранулярного белка 16 гомолог В	Бета-дефенсин 116
Плазменной протеазы С1 ингибитор	Неохарактеризованный белок С6orf89	Семафорин-3D	Белок FAM132A
Интерлейкина-7 рецептора субъединица альфа	Хондроитинсульфатглюк уронилтрансфераза	Аполипопротеин L4	Белок FAM132B
Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь H5	Хитиназа домен- содержащий белок 1	Трансмембранная протеаза, сериновая 11D	Бета-дефенсин 115
Тромбоцитарный фактор роста D	Трансмембранный белок С9orf7	Scrapie-чувствительный белок 1	Бета-дефенсин 114
Белок S100-A7	CMRF35-подобная молекула 9	Мнимый аннексин А2- подобный белок	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 9
Сиаловая кислота- связывающий Ig-подобный лектин 10	Цитохром P450 2S1	Костный морфогенный белок 10	Липазы член N
Тубулоинтерстициального нефрита антиген-подобный	Crumbs белка гомолог 3	Секретогранин-3	Панкреатический липаза- связанный белок 3
Член 13В суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Дегидрогеназы/редукта зы SDR член семейства 7	Комплемента С1q фактор некроза опухолей- родственный белок 4	Белок, экспрессируемый в яичках, простате и плаценте
Длинноцепочечных жирных кислот--КоА лигаза 5	Белок ENED	Неохарактеризованный белок С1orf54	Нейромедин-S
Клаудин-14	Комплемента фактора N-родственный белок 4	Карбоксипептидаза А6	Нейропептид S
Лейцин-богатый повтор- содержащий белок 20	Лейцин-богатый повторяющийся LGI семейства член 3	С-С мотив хемокина 19	Нейрональный пентраксин- подобный белок С16orf38
Член 7 семейства Интерлейкина-1	Глиомедин	С-С мотив хемокина 25	Отолин-1
Лимфоцитного антигена 6 комплексного локуса протеин G5b	Глицерофосфодиэфирфос фодиэстеразы домен- содержащий белок 5	Химотрипсин-подобной эластазы семейства член 2В	Железо/цинк пурпуровая кислая фосфатаза- подобный белок
Ацетилхолинэстераза	Вероятный G-белок сцепленный рецептор 113	Белок CEI	Овостатина гомолог 1
Амелогенин, X изоформа	Вероятный G-белок сцепленный рецептор 114	Неохарактеризованный белок С6orf1	Плазминоген-родственный белок А

Ангиогенин	Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 4	Неохарактеризованный белок C7orf34	Полисераза-3
сибиреязвенного токсина рецептор 2	Гремлин-1	Кератиноцит-связанный белок 3	Мнимый пептид YY-2
Аннексин А2	Калийного канала подсемейства K член 17	Неохарактеризованный белок C9orf47	Мнимый пептид YY-3
Аполипопротеин С-III	KDEL мотив-содержащий белок 2	Коллаген альфа-1(VIII) цепь	Рибонуклеаза-подобный белок 10
Аполипопротеин L1	Лайилин	Неохарактеризованный белок C18orf54	Рибонуклеаза-подобный белок 12
Субъединица субкомпонента А комплемента C1q	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 8B	Цистатин-подобный 1	Рибонуклеаза-подобный белок 13
Субъединица субкомпонента С комплемента C1q	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 8D	C2 домен-содержащий белок 2	Серпин A11
Кальцитонин	Сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 6	DDRГK домен-содержащий белок 1	Kunitz-типа протеазы ингибитор 4
Растворимая кальций-активируемая нуклеотидаза 1	Мнимый беременность-специфический бета-1-гликопротеин 2	Белок FAM55C	Метеорин-подобный белок
С-С мотив хемокина 15	Lu6/PLAUR домен-содержащий белок 1	Коллаген альфа-1(XXVI) цепь	Мнимая яичковая сериновая протеаза 2
CD97 антиген (	Lu6/PLAUR домен-содержащий белок 5	Белок FAM19A2	Бета-дефенсин 112
Контактин-4	MLN64 N-терминального домена гомолог	Белок FAM5B	Неохарактеризованный белок FLJ37543
Комплемент С2	Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов	Фактор роста фибробластов 5	Белок FAM24A
Коллаген альфа-6(IV) цепь	2-ацилглицерил О-ацилтрансфераза 3	Вероятная сериновая протеаза HTRA3	Секретируемый связанный с ожогом белок 4
Коллаген альфа-2(VI) цепь	Митохондриального носителя гомолог 1	Член 8 семейства Интерлейкина-1	Комплемент C1q-подобный белок 2
Коллаген альфа-1(XI) цепь	Аполипопротеин L6	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 4	Мнимый неохарактеризованный белок C17orf69
Crumbs гомолог 1	Протокадгерин альфа-6	Отоспиралин	Мнимый цистатин-13
Цистатин-С	Протокадгерин гамма-A12	Экспрессируемый в печени антимикробный пептид 2	Бета-дефенсин 109

Нейтрофильный дефенсин 1	Вольтаж-открываемый водородный канал 1	Лизилоксидазы гомолог 1	Бета-дефенсин 113
Эндотелин-3	All-транс-ретинол 13,14-редуктаза	Лизилоксидазы гомолог 2	Бета-дефенсин 135
Низкоаффинный иммуноглобулиновый эпсилон Fc-рецептор	Динамики микротубул регуляторный белок 2	Белок, связанный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа 4	Пептидаза S1 домен-содержащий белок LOC136242
Рецептор фактора роста фибробластов 3	R-Спондин-4	Лизоцим g-подобный белок 2	Фактор роста/дифференциации 7
Рецептор фактора роста фибробластов 4	Длинноцепочечных жирных кислот транспортный белок 3	Эндомуцин	IgA-индуцирующего белка гомолог
Роста остановка-специфический белок 6	Пузырек-транспортирующий белок SEC22c	Нейропептид B	Мнимый липокалин 1-подобный белок 1
Рецептор гормона роста	Клаудин-1	Кинезин-подобный белок KIF7	Мнимая сериновая протеаза 29
Бифункциональный УДФ-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза/N-ацетилманнозаминкиназа	Лейцин-богатый повторами и иммуноглобулин-подобный домен-содержащий белок 3	Лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулин-подобный рецептор 2	Мнимый рецептора Scavenger цистеин-богатый домен-содержащий белок LOC619207
Член 8 суперсемейства иммуноглобулинов	SLAM семейства член 9	Кальций-зависимая фосфолипаза A2	Секретоглобин-подобный белок
Интерлейкина-4 рецептора альфа-цепь	Транстретин	Проапоптозный каспазный адаптерный белок	Мнимый стереоцилин-подобный белок
Калликреин-14	Сериновой/треониновой-киназы белок 32B	Интегрин бета-подобный белок 1	Инсулинового фактора роста-подобный член семейства 2
Калликреин-6	Тромбоцитарного фактора роста субъединица B	Толлоид-подобный белок 1	KIR2DL4
Ламинина субъединица бета-3	Ноггин	Kunitz-типа протеазы ингибитор 3	Мнимый цинк-альфа-2-гликопротеин-подобный 1
Лейцил-цистинил аминопептидаза	Триптаза альфа-1	Белок TMEM155	Инсулинового фактора роста-подобный член семейства 4

Маннан-связывающая лектиновая сериновая протеаза 1	Тетратрикопептидповторный белок 14	Просалюзин	Неохарактеризованный белок C2orf72
Маннан-связывающая лектиновая сериновая протеаза 2	ХТР3-трансаktivированного гена В белок	Белок безамнионный	Начала репликации-подобный белок
Нейтрофилжелатиназы-связанный липокалин	Пальмитоилтрансфераза ZDНHC15	Белок WFDC10B	Белок, экспрессируемый простатой и яичками 3
Нейропептид Y	Вителлинового слоя сперма-связывающий белок 3	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 8	В меланомы антиген 4
Aggrecan ядерный белок	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 39	Белок Wnt-5b	Мнимый неохарактеризованный белок C1orf191
Легочный сурфактант-ассоциированный белок В	Панкреатическая триацилглицеринлипаза	Белок Wnt-7b	Бета-дефенсин 108В-подобный
Полиовирус рецептор-родственный белок 1	Трансмембранный белок 139	Вителлинового слоя сперма-связывающий белок 2	Неохарактеризованный белок FLJ90687
Ренин	Лейкемии ингибирующий фактор	SH3 домен-связывающий белок 5-подобный	Секретируемый связанный с ожогом белок 2
Рибонуклеаза панкреатическая	Галектин-1	Адицитов адгезивная молекула	Основной пролин-богатый пептид IB-1
Семеногелин-1	С-С мотив хемокина 21	Неохарактеризованный белок C12orf59	Фактор роста фибробластов 16
Сигнальная молекула активации лимфоцитов	CD5 антиген-подобный	Аполипопротеин А-I-связывающий белок	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 8
Ингибитор пути тканевого фактора	Карбогидратсульфотрансфераза 9	Клаудин-17	Неохарактеризованный белок KIAA0495
Ушерин	Липополисахарид-связывающий белок	Неактивная каспаза-12	Тромбоцитов основной белок-подобный 2
Фактор роста фибробластов 23	Цистеин-богатый моторных нейронов 1 белок	Неохарактеризованный белок C7orf58	Серпин E3
Интерлейкина-23 субъединица альфа	Фактор роста соединительной ткани	Коллаген альфа-1(XXVIII) цепь	CR1-рецептор
Эпидидимальный секреторный белок E1	Гомолог белка eyes shut	Белок матрикса дентина 4	Секретируемый фосфопротеин 1
ADAMTS-подобный белок 1	Муцин-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C16orf48	Белок, секретируемый при стрессе 1
Хемокин-подобный фактор	Фактор роста фибробластов 19	Карбоксилэстераза 3	Белок Wnt

EGF-подобный домен-содержащий белок 7	Фоллистатин-родственный белок 3	Белок FAM20B	Белок Wnt (Фрагмент)
Тектоник-1	Еж-взаимодействующий белок	GFN-петля ГТФазы 3	Мнимая сериновая протеаза LOC138652
Трансмембранный белок 25	Интерлейкина-17 рецептор В	GRAM домен-содержащий белок 1B	TOM1
УДФ-GalNAc:бета-1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1	FXUD домен-содержащий регулятор транспортировки ионов 5	Фосфатидилинозитолгликан якорного биосинтеза класса U белок	Мнимый неохарактеризованный белок FLJ46089
Интерлейкин-15 (IL-15)	Эндотелиальная липаза	Интерлейкина-27 субъединица альфа	Мнимый неохарактеризованный белок Clorf134
Множественные домены, подобные фактору роста эпидермиса 11	ЭГФ-содержащий фибулин-подобный белок внеклеточного матрикса 2	Про-нейрегулин-4, мембрана-связанная изоформа	UDP-GlcNAc:бетаGal бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 9
Муцин и кадгерин-подобный белок	Отораплин	Лейцин-богатый повторами нейрональный белок 3	Неохарактеризованный белок C11orf44
Рибонуклеаза 4	Группы 3 секреторная фосфолипаза A2	NMDA рецептор-регулируемый белок 2	Неохарактеризованный белок C12orf73
SH2 домен-содержащий белок 3C	Группы XV Фосфолипаза A2	NADH-цитохром b5 редуктаза 1	Мнимый цистатин-9-подобный 2
СМР-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Член 14 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Болезни Паркинсона 7 домен-содержащий белок 1	Мнимой абгидролазы домен-содержащий белок FAM108A5
Трансмембранный белок 9	Плексин-A2	FK506-связывающий белок 11	Бета-дефенсин 133
WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 2	Папилин	C-типа лектинового домена семейства 12 член В	Фиброзин-1
Аденозиновый A3 рецептор	Прокинетицин-1	Носителей растворенных веществ семейства 35 член F5	Вероятный фолатный рецептор дельта
Гамма-секретазы субъединица APN-1A	Рибонуклеаза 7	Сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 12	RPE-спондин
Базигин	Kunitz-типа протеазы ингибитор 1	Белок FAM19A3	NPTR-подобный белок ENSP00000346774
Бакуловирусный IAP повтор-содержащий белок 7	Спондин-2	WD повтор-содержащий белок 82	Мнимый яичко-специфический прионный белок

Калуменин	Тестикан-2	Адиопоцитарный энхансер-связывающий белок 1	Пролин-богатый белок 1
Альфа-S1-казеин	Неактивная сериновая протеаза PAMR1	ADAMTS-подобный белок 3	Мнимый неохарактеризованный белок FP248
Циклин-L1	Торсин-2А	Суперспиральный домен-содержащий белок 80	UPF0670 белок C8orf55
Фактор комплемента Н	Вазогин-1	Экто-NOX дисульфид-тиол обменник 1	Мнимый цинк-альфа-2-гликопротеин-подобный 2
Хорионический соматомаммотропиновый гормон	Вазорин	Нейрональный регулятор роста 1	Белок SPARC
Рецептор вируса Коксаки и аденовируса	Ксилозилтрансфераза 1	Интерфоторецептора матрикса протеогликан 1	Отпетрин-1
Эктонуклеотидных пирофосфатазы/фосфоидиэстеразы семейства член 2	Эктонуклеотидных пирофосфатазы/фосфоидиэстеразы семейства член 6	кДНК FLJ36603 fis, клон TRACH2015180, высокоаналогичная Секретируемому связанному с ожогом белку 2	кДНК FLJ55667, высокоаналогичная Секретируемому кислотному и цистеин-богатому белку
ER01-подобный белок альфа	Онкостатин-М	Липазы член Н	Липазы член К
Фактор коагуляции IX	Дерлин-1	Муцин-19 (MUC-19)	С-типа лектинового домена семейства 18 член С
Низкоаффинный иммуноглобулина гамма Fc региона рецептор III-B	HERV-FRD_6p24.1 провирусный наследственный полипротеин Env	Чувствительности к псориазу 1 кандидатного гена 2 белок	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6125/PRO20090
Фиколин-3	Простасин	Интегральный мембранный белок 2А	Комплемент С3
Fc рецептор-подобный белок 2	Трансмембранная протеаза, сериновая 11E	Транспорта пузырьков белок SFT2B	Коллаген альфа-2 (IV) цепь
Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный белок FLRT3	HLA класса I гистосовместимости антиген, Cw-16 альфа цепь	фон Виллебранда фактора А домен-содержащий белок 3А	Неохарактеризованный белок UNQ6126/PRO20091
Гелсолин	Wnt ингибиторный фактор 1	Белка shisa-2 гомолог	Серпин-подобный белок HMSD
Гранулизин	С-типа натрийуретический пептид	Сигнальной пептидазы комплексная субъединица 3	Белок, экспрессируемый простатой и яичками 4

Трансмембранный гликопротеин NMB	Ангиопоэтин-2	CD164 сиаломуцин-подобный 2 белок	Коллаген альфа-1 (XXII) цепь
Гранулины	Дезоксирибонуклеаза гамма	Кадгерин-16	Мнимый неохарактеризованный белок C13orf28
Гепараназа	Карбоксипептидаза A5	Кадгерин-19	Цистатин-S
Ig мю цепи C регион	C-C мотив хемокина 14	Церебеллин-2	R-Спондин-1
Интерлейкин-1 альфа	Интерлейкин-5	Трансмембранный белок C3orf1	C8orf2
Интерлейкина-31 рецептор A	Интерлейкин-10	Спермальный экваториального сегмента белок 1	Одорант-связывающий белок 2a
Соединительная адгезивная молекула B	C-X-C мотив хемокина 2	Неохарактеризованный белок C6orf72	Опиорфин
Липокалин-1	C-X-C мотив хемокина 5	Неохарактеризованный белок C11orf24	Почек андроген-регулируемый белок
Лейцин-богатый повтор-содержащий G-белок спаренный рецептор 6	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 6	Асu1-CoA синтетазы семейства член 2, митохондриальный	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ5830/PRO19650/PRO19816
Латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающий белок 1	Полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1	Вероятный УДФ-сахар-транспортирующий белок SLC35A5	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6975/PRO21958
Матрилин-3	Фибулин-2	C-типа лектинового домена семейства 1 член A	Трахикинин-3
Миелиновый белок нуль-подобный белок 1	Фиколин-1	C-типа лектинового домена семейства 3 член A	Секретируемый фосфопротеин 1
Нейробеахин-подобный белок 2	SL цитокин	C-типа лектинового домена семейства 4 член E	Склеростин
Никастрин	Фоллиостатин	C-типа лектинового домена семейства 4 член G	ADAMTS-подобный белок 2
АДФ-рибоза пиррофосфатаза, митохондриальная	FRAS1-связанный внеклеточного матрикса белок 1	Вероятная катион-транспортирующая АТФаза 13A4	Рецептора Scavenger цистеин-богатый домен-содержащий белок LOC284297
Протокадгерин-15	Энамелин	UPF0480 белок C15orf24	Триптаза бета-1

Фактор роста плаценты	Гиалуронана и протеогликана шивки белок 1	Вителлинового слоя сперма-связывающий белок 4	Триптаза дельта
Белок O-связанная-манноза бета-1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 1	Лейкоцитарного иммуноглобулин-подобного рецептора подсемейства A член 3	Резидентный белок эндоплазматической сети ERp27	Мнимый белок критического региона синдрома кошачьего глаза 9
Вероятная гидролаза FNKD	Интерлейкин-17F	Трансмембранный белок C16orf54	Плексин домен-содержащий белок 1
Плейотрофин	Интерлейкина-1 рецептора белок доступа	Цитохром P450 4F12	MC51L-53L-54L гомолог (фрагмент)
Рецептор полиовируса	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа 5	Цитохром P450 4X1	COBW-подобный плацентарный белок (фрагмент)
Ретикулон-4 рецептор	Калликреин-15	Цитохром P450 4Z1	Цитокинового рецептора-подобный фактор 2
Сывороточный амилоидный A белок	Интерферон альфа-14	Белок CREG2	Бета-дефенсин 103
Половых гормонов-связывающий глобулин	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 4	DnaJ гомолога подсемейства B член 9	Бета-дефенсин 106
SLAM семейства член 6	Коллагеназа 3	Дипептидаза 3	Гиалуронидаза-3
Сарколеммной мембраны-связанный белок	Металлопротеиназа матрикса-16	Мембранный белок FAM174A	Интерлейкина-28 рецептора альфа-цепь
Sushi, Фон Виллебранда фактора типа A, ЭГФ и пентраксин домен-содержащий белок 1	Питуитарной аденилатциклаза-активирующий полипептид	Тиоредоксин домен-содержащий белок 15	Гликозилтрансфераза 54 домен-содержащий белок
Тироксин-связывающий глобулин	Прокинетицин-2	Белок FAM19A4	Хордин-подобный белок 1
Трансмембранный и суперспиральный домен-содержащий белок 1	Латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающий белок 3	Аденозин монофосфат-белок трансфераза FICD	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ9370/PRO34162
Трансмембранная протеаза, сериновая 3	Соматолиберин	Пренилцистеиноксидаза-подобный	Нетрина рецептор UNC5B
Член 10C суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Тромбоспондина типа-1 домен-содержащий белок 1	Фитаноил-КоА гидроксилаза-взаимодействующий белок-подобный	Рецептор фактора роста фибробластов FGFR-1 секреторируемая форма белка (фрагмент)
Член 11B суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Ангиогенный фактор с G вставкой и FNA доменами 1	FXFD домен-содержащий регулятор транспортировки ионов 4	Неохарактеризованный белок ENSP00000244321

Серотрансферрин	TGF-бета рецептор типа III	Фактор роста/дифференциации 11	ECE2
Триптаза бета-2	Тиротропина субъединица бета	Церебральный допамин нейротрофический фактор	ЕРА6
Белок YIPF5	Неохарактеризованный белок C19orf36	GPN-петля ГТФазы 2	Мнимый растворимый интерлейкина 18 рецептор 1
Везикула-ассоциированной мембраны белок-ассоциированный белок В/С	Комплемент C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 2	Гормон роста-индуцируемый трансмембранный белок	Мнимой абгидролазы домен-содержащий белок FAM108A6
кДНК FLJ96669, высоко аналогичная Секретируемому кислотному цистеин-богатому белку Homo sapiens (остеонектин) (SPARC), мРНК	Эктонуклеотидных пирофосфатазы/фосфоиди эстеразы семейства член 5	Глицерофосфодиэфирфосфод иэстеразы домен-содержащий белок 2	Мнимый V-набора и иммуноглобулиновый домен-содержащий-подобный белок ENSP00000303034
кДНК FLJ77519, высоко аналогичная секретируемому связанному с ожогом белку Homo sapiens мРНК	Полипептид N-ацетилгалактозаминилт рансфераза-подобный белок 2	WAP, kazal, иммуноглобулин, kunitz и NTR домен-содержащий белок 1	В-клеток созревания антигена транскриптный вариант 4 (Член 17 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей)
Т-клеток дифференциации антиген CD6	Slit гомологичный 1 белок	KDEL мотив-содержащий белок 1	UPF0672 белок C3orf58
Пикачуриин	Вариант гормона роста	Адиопофин	Метилрибоза-1-фосфатизомераза
Фибриноген-подобный белок 1	Ангиопоэтин-родственный белок 3	Лактаза-подобный белок	17-бета гидроксистероид дегидрогеназа 13
Интерлейкин-32	Ангиопоэтин-родственный белок 7	Хондромодулин-1	Аминопептидаза В
Матрилин-4	Экто-АДФ-рибозилтрансфераза 5	Коллаген альфа-6 (VI) цепь	Дермцидин
Сперма-ассоциированный антиген 11В	Карбоновая ангидраза-родственный белок 11	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 33	Метеорин
Фактор коагуляции XII	Вероятная рибонуклеаза 11	MANSC домен-содержащий белок 1	Метилтрансфераза-подобный белок 7A
Гепцидин	Вероятная карбоксипептидаза X1	Липокалин-15	NL3

Klotho	Белок FAM3D	Арилсульфатаза I	N-ацетилтрансфераза 15
Серглицин	C-X-C мотив хемокина 14	Мезодермы развития кандидат 2	Эфрин-A4
Томорегулин-2	Бета-дефенсин 127	Dickkopf-родственный белок 1	Белок Plunc
Хордин-подобный белок 2	Бета-дефенсин 129	Подокан	Калликреин-11
Член 6B суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Цистеин-богатый секреторный белок LCC1 домен-содержащий 2	Фибронектина типа III домен-содержащий белок 1	WNT1 индуцированный секреторируемый белок 1 вариант разрезания x (Фрагмент)
UPF0414 трансмембранный белок C20orf30	Фактор роста фибробластов 21	Нейротримин	Член 10 семейства Интерлейкина-1
C-типа лектинового домена семейства 4 член C	Плазменная альфа-L-фукозидаза	Обонятельный рецептор 10W1	PLA2G2D
UPF0317 белок C14orf159, митохондриальный	Гастрокин-1	Белок PARM-1	Протеогликан 3
Нетрин-G2	Гастрокин-2	PDZ домен-содержащий белок 2	Инсулин-подобный пептид INSL5
Металлоредуктаза STEAP2	Глутатионпероксидаза 7	Прозепирегулин	Ольфактомедин-подобный белок 3
Sushi домен-содержащий белок 4	HNIP-подобный белок 1	Болезни поликистоза почек белок 1-подобный 1	Внеклеточный гликопротеин лакритин
Белок YIF1B	Интерферон каппа	WLPL514	Ретинолдегидрогеназа 13
Аполипопротеин M	Аполипопротеин C-I	Металлопротеиназа матрикса-26	Нейтрофильный дефенсин 3
C4b-связывающего белка бета-цепь	Проколлаген C-эндопептидазы усилитель 2	RELT-подобный белок 2	GLGQ5807
T-клеток поверхностного гликопротеина CD8 бета цепь	Фактор определения лево-право 1	Носителей растворенных веществ семейства 35 член E3	TUFT1
C-C мотив хемокина 3-подобный 1	Лейцин-богатый повторяющийся LGI семейства член 4	Транспортер цинка ZIP9	DRLV8200
Фактор роста фибробластов 8	BRCA1-A комплексная субединица Abraxas	Ноэлин-2	IDLV5808
Сиаломуциновый ядерный белок 24	Лейцин зипперный белок 2	Seizure 6-подобный белок 2	UBAP2
Программированной клеточной смерти 1 лиганд 2	Нейрексофилин-3	Семафорин-3A	C1q/TNF-родственный белок 8

Секретируемый и трансмембранный 1	Остеомодулин	Семафорин-4С	KIR2DL4 (Фрагмент)
Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 6	Сериновой протеазы ингибитор Kazal-типа домен-содержащий белок 1	Абгидролазы домен-содержащий белок 14А	Хемокин-подобного фактора суперсемейства 2 транскриптный вариант 2
EGF-подобный модуль-содержащий муцин-подобный рецептор-подобный 3	Спермы акросомы мембрана-ассоциированный белок 3	Анкирина повтор домен-содержащий белок 36	Кератиноциты-ассоциированный Трансмембранный белок 1
Ноэлин-3	Секретоглобина семейства 3А член 1	Велка shisa-4	GKGM353
Одорант-связывающий белок 2b	Тсукушин	Нейромедин-U	MATL2963
Уротензин-2	Клаудин-2 (SP82)	Nodal гомолог	NINP6167
Витрин	Комплемента фактора N-родственный белок 2	Синаптогирин-2	POM121-подобный
WNT1-индуцируемого-сигнального пути белок 3	Иммуноглобулина суперсемейства содержащий лейцин-богатый повторами белок	Мозг-специфического ангиогенеза ингибитор 1-ассоциированный белок 2-подобный белок 2	RTFV9368 (SLE-зависимое повышение 1)
cDNA FLJ75759, высокоаналогичный Homo sapiens фоллистатин-подобному 3 (секретируемому гликопротеину) (FSTL3), мРНК	Лейцин-богатый повторами и иммуноглобулин-подобный домен-содержащий пого-рецептор-взаимодействующий белок 1	Суперспиральный домен-содержащий белок 104	Лейцин-богатый повторами и иммуноглобулин-подобный домен-содержащий пого-рецептор-взаимодействующий белок 4
Ангиотензин-конвертирующий фермент 2	Kin IRRE-подобного белка 3	Трансмембранный 4 L6 член семейства 20	KCNQ2
Адипонектин	Гематопозитических клеток трансдюсер сигнала	Трансмембранный белок 107	ELCV5929
Ангиопоэтин-родственный белок 4	Фоллитропина субъединица бета	Трансмембранный белок 143	KVVM3106
Аполипопротеин А-V	Белок, ингибирующий активность меланомы 3	Трансмембранный белок 178	ISPF6484
Аспорин	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 4	Трансмембранный белок 205	LKHP9428
Бактерицидный белок, повышающий проницаемость	Транспортер цинка 5	Трансмембранный белок 41А	VNFT9373

СUB домен-содержащий белок 1	Лейцин-богатый повторами нейрональный белок 1	Трансмембранный белок 50A	ACAN3104
Хрящевого промежуточного слоя белок 1	Апикальный эндосомальный гликопротеин	Трансмембранный белок 50B	RVIA1944
Бета-Ala-His дипептидаза	Сывороточный амилоидный белок А-4	Интерлейкин-28В	Wper3002
Коллаген альфа-1 (V) цепь	Пробетацеллюлин	Нейрональный пентраксин-2	ZDHC11
Коллаген альфа-1 (XXV) цепь	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 7	Коллектрин	AGLW2560
Эстрадиол 17-бета-дегидрогеназа 11	3-гидроксibuтиратдегидрогеназа типа 2	Трансмембранный белок 92	TSSP3028
DnaJ гомолога субсемейства С член 10	C1GALT1-специфический шаперон 1	Трансмембранный белок 95	RFVG5814
EGF-подобный домен-содержащий белок 6	Бета-казеин	Трансмембранный белок 9B	SHSS3124
Фактора свертывания крови XIII A цепь	Каппа-казеин	Вероятная карбоксипептидаза PM20D1	MMP19
Глюкоза-6-фосфатизомераза	Трансмембранный белок C2orf18	Тетраспанин-12	GSQS6193
Аппетит-регулирующий гормон	Карбоксипептидаза N каталитическая цепь	Тетраспанин-13	VGPW2523
Интерлейкина-12 субъединица бета	CD320 антиген	Тетраспанин-15	LMNE6487
Интерлейкин-22	Хондроитинсульфатсинтаза 1	UPF0513 трансмембранный белок	ALLA2487
Интеллектин-1	Хондроитинсульфатсинтаза 2	Митохондриальный распаривающий белок 4	GALI1870
Лейцин-богатый гликоза-деактивирующий белок 1	CMRF35-подобная молекула 7	Полимераза-2	FRSS1829
Лимфоцитарный антиген 96	Белка сапору гомолог 3	Вероятная пальмитойлтрансфераза ZDHC24	MRSS6228
Матрилизин	Короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза 3	Вителлинового слоя сперма-связывающий белок 1	GRPR5811
Муцин-20	Дельта-подобный белок 4	Вителлинового слоя сперма-связывающий белок 2	AVLL5809

Пропротейн конвертаза субтилизин/кексин типа 9	Delta и Notch-подобный фактора роста эпидермиса - родственный рецептор	Консервативная олигомерная субъединица комплекса Гольджи 7	CR1 C3b/C4b рецептор SCR9 (или 16) C-терм. экзон SCR = короткий консенсусный повтор
Распознавания пептидогликана белок	Долихолкиназа	Адипонектина рецептора белок 2	PIKR2786
Интерферон-индуцированный белок 17 кДа	Эндотелин-конвертирующий фермент-подобный 1	Ингибина бета С цепь	S100 кальцийсвязывающий белок A7-подобный 3
Белок Wnt-4	Интегральный мембранный белок 2В	Врорин	GTWW5826 (LP5085 белок)
Аллографта воспалительный фактор 1-подобный	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок 5	Семафорин-3С	KTIS8219 (HCG2020043)
Armadillo повтор-содержащий X-связанный белок 3	Эндотелиальных клеток-селективная адгезивная молекула	Гепарансульфатглюкозамин 3-О-сульфотрансфераза 2	Гиалуронана и протеогликана шивки белок 4
Хондроитинсульфат N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1	Сигнальный пептид, CUB и EGF-подобный домен-содержащий белок 1	Рецептора лептина перекрывающийся транскрипт-подобный 1	Micronovel
Хитотриозидаза-1	Комплемент фактора N-родственный белок 3	SPARC-подобный белок 1	SAMK3000
Claudin домен-содержащий белок 1	Прорелаксин H1	Фибулин-7	VFLL3057
Эрлин-2	Фоллистатин-родственный белок 1	Велка HEG гомолог 1	CVWG5837
Гликозилтрансферазы 8 домен-содержащий белок 1	Глобозид альфа-1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1	Фибриноген С домен-содержащий белок 1	VGSA5840
Гольджи мембранный белок 1	Гамма-глутамилгидролаза	Фосфолипаза A1 член А	GHPS3125
Вероятный G-белок сцепленный рецептор 125	Кадгерин-24	Основной слюнный пролин-богатый белок 2	GRTR3118
Интерлейкина-20 рецептора альфа-цепь	Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 3	Сперматогенез-ассоциированный белок 6	PAMP6501
Галектин-7	G-белок сцепленный рецептор 56	Sushi повтор-содержащий белок SRPX2	LTL9335
NKG2D лиганд 4	Гиалуронан-связывающий белок 2	Велка скручивания при гастрюляции гомолог 1	VCEW9374

L-аминокислот оксидаза	Прогепарин- связывающий ЭГФ- подобный фактор роста	Торсин-1В	АНРА9419
Пролил 3-гидроксилаза 1	Гистидин-богатый гликопротеин	Белок Wnt-5a	MDHV1887
GPI этаноламин фосфаттрансфераза 2	Карбогидратсульфотран- сфераза 14	Акрозин-связывающий белок	HSAL5836
GPI этаноламин фосфаттрансфераза 3	Интерлейкина-20 рецептора бета цепь	С-типа лектинового домена семейства 18 член В	LHLC1946
Кальций-связывающий митохондриальный белок- носитель SCaMC-2 (Малый кальций-связывающий митохондриальный белок- носитель 2)	Эктонклеотидной пирофосфатазы/фосфоди- эстеразы член семейства 3	Лизосомно- ассоциированный трансмембранный белок 4А	Белок, связанный с карциномой эпителия длинного неба, легкого и носа 3 (лиганд- связывающий белок RYA3)
Легочный сурфактант- ассоциированный белок А2	Инсулин-подобного фактора роста- связывающий белок 7	Семафорин-3Е	LRPA601
Фактор расщепления, аргинин/серин-богатый 16	Каллистатин	Амелобластин	PINK1
Альфа-N- ацетилгалактозаминид альфа-2, 6- сиалилтрансфераза 6	Фибронектина типа III домен-содержащий белок 3В	Домен-содержащий белок 5 суперсемейства основного фасилитатора	SERH2790
Одиночный Ig IL-1- связанный рецептор	Лейкемии ингибирующего фактора рецептор	Ангиопоэтин-1	FLFF9364
Тектоник-3	Lin-7 гомолог В	Ангиопоэтин-4	АПЕЛИН
Член 11 суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Тиоредоксин- родственный трансмембранный белок 1	Множественные домены, подобные фактору роста эпидермиса 9	GLSH6409
Член 19 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 32	Кислой сфингомиелиназы- подобная фосфодиэстераза 3a	SFVP2550
Пальмитоилтрансфераза ZDHC9	Луб/PLAUR домен- содержащий белок 3	ADAMTS-подобный белок 5	RRLF9220
Фибулин-5	С-типа лектинового домена семейства 14 член А	Спексин	PTML5838

Белок Z-зависимой протеазы ингибитор	Белка cornichon гомолог	Мнимый трипсин-6	VLGN1945
Альфа-2-макроглобулин	Белок FAM151A	Прото-онкогенный белок Wnt-1	AVPC1948
Agouti-родственный белок	FK506-связывающий белок 14	Костный морфогенный белок 3b	AWQG2491
Панкреатическая альфа-амилаза	Нейропилин и толлоид-подобный белок 2	Костный морфогенный белок 5	PSVL6168
Натрийуретические пептиды B	Протокадгерин бета-13	Костный морфогенный белок 8B	LCII3035
Предсердный натрийуретический фактор	Пренилцистеиноксидаза 1	Белок FAM26D	PPRR6495
Нейтральная церамидаза	Пефлин	C1q-связанный фактор	RLSC6348
Бета-2-микроглобулин	Пептидил-пролил цис-транс изомераза-подобный 1	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 1	CSRP2BP
Костный морфогенный белок 4	Стволовых клеток простаты антиген	Церебеллин-1	GLLV3061
Биотинидаза	Белок лоскутный гомолог 2	Карбоксипептидаза 0	GWSI6489
Рецептора Scavenger цистеин-богатый типа 1 белок M130	Хитобиосилдифосфолихол бета-маннозилтрансфераза	Миелиновый белок нуль-подобный белок 2 (Эпителиальный V-подобный антиген 1)	кДНК FLJ53955, высокоаналогичная Секретируемому связанному с ожогом белку 4
Карбоксипептидаза B2	Белка sel-1 гомолог 1	Сериновая протеаза 1-подобный белок 1	PPIF
Карбоксипептидаза Z	ProSAAS	Суперспиральный домен-содержащий белок 70	VSSW1971
C-C мотив хемокина 5	Сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 9	C-C мотив хемокина 28	KLIA6249
C-C мотив хемокина 7	SLIT и NTRK-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C4orf29	ALLW1950
C-C мотив хемокина 8	Статерин	CUB домен-содержащий белок 2	GVEI466
CD59 гликопротеин	Тестизин	Трем-подобный транскриптный белок 4	ESFI5812
Фактор комплемента I	Трансмембранный канал-подобный белок 5	Неохарактеризованный белок C6orf58	GNNC2999

Кластерин	Трансмембранная протеаза, сериновая 4	Хондроадгерин	AAGG6488
Коллаген альфа-2(I) цепь	Метастазов-суппрессор KiSS-1	Хрящевого промежуточного слоя белок 2	HNHL751
Коллаген альфа-1(III) цепь	Островковый амилоидный полипептид	Неохарактеризованный белок C10orf25	Бета-дефенсин 108В
Коллаген альфа-1(IV) цепь	Трем-подобный транскриптный белок 2	Истмин-1	Бета-дефенсин 118
Коллаген альфа-3(IV) цепь	Тиоредоксин домен-содержащий белок 12	Цистатин-8	Бета-дефенсин 124
Коллаген альфа-5(IV) цепь	Фактор роста сосудистого эндотелия В	Кардиотропин-1 (СТ-1)	Бета-дефенсин 125
Коллаген альфа-3(VI) цепь	Фактора роста сосудистого эндотелия С	Химотрипсिनоген В	Бета-дефенсин 126
Компонент комплемента С6	Ретикулокальбин-3	С-Х-С мотив хемокина 9	Дезоксирибонуклеаза-1-подобный 2
Коллаген альфа-1(IX) цепь	Фибриллин-1	С-Х-С мотив хемокина 13	Станиокальцин-2
Коллаген альфа-1(X) цепь	Белок FAM3A	EMILIN-3	Эндотелиальная клеточно-специфическая молекула 1
Коллаген альфа-1(XVII) цепь	Белок G7c	Секретагогин	Карбоксилэстераза 7
Коллаген альфа-1(XXI) цепь	Нейропиплин и толлоид-подобный белок 1	Эпидидимальный секреторный белок E3-альфа	Белка NOV гомолог
Коатомер субъединица альфа	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 11	Эпификан	UPF0528 белок FAM172A
Комплементарный рецептор типа 1	Серпин В4	Белок FAM5C	Интерлейкина-27 субъединица бета
Цистатин-SN	ADAM DEC1	Фактор роста фибробластов 20	Белок FAM3C
Дезоксирибонуклеаза-1	АДФ-зависимая глюкокиназа	Фибробластов роста-связывающий белок 3	Стромальных клеток фактор 2-подобный белок 1
Внеклеточный матричный белок 1	Альфа-амилаза 2В	Трансмембранный белок 204	Бутирофилина подсемейства 1 член А1
Низкоаффинный иммуноглобулиновый гамма Fc регион рецептора III-A	UDP-GlcNAc:бетаGal бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 3	Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 4	Кератиноцит-ассоциированный трансмембранный белок 2

Альфа-фетопроtein	Кальцитонин ген- связанный пептид 2	Фактор коагуляции V	Иммуноглобулина альфа Fc-рецептор
Гепарин-связывающий фактор роста 2	Карбоксипептидаза E	Фактор коагуляции VII	EMILIN-2
Фибриноген гамма цепь	Кардиотрофин-подобный цитокиновый фактор 1	Pro-MCH	Эфрина типа-A рецептор 10
Фактор роста/дифференциации 5	Коллаген альфа- 2(VIII) цепь	Фолатный рецептор гамма	Экзостозин-подобный 2
Глиальной клеточной линии-производный нейротрофический фактор	Crumb3 гомолог 2	Муцин-7	Фоллистатин-родственный белок 4
Инсулин-подобного фактора роста- связывающий белок 3	Дентинового матрикса кислотный фосфопротеин 1	Галанин-подобный пептид	Фоллистатин-родственный белок 5
Инсулин-подобный фактор роста IA	Синдрома Дауна клеток адгезивная молекула	Гемицентин-1	Трансмембранный белок 66
Ig гамма-1 цепи C регион	Член 1 суперсемейства иммуноглобулинов	Интерлейкин-6	Фактор роста/дифференциации 2
Ig гамма-2 цепи C регион	Интерлейкин-4	Эмбриональный фактор роста/дифференциации 1	GDNF семейства рецептор альфа-4
Ig гамма-3 цепи C регион	Интерлейкина-6 рецептора субъединица альфа	Интерлейкин-8	Ig гамма-4 цепи C регион
Инсулин-подобный 3	Интерлейкин-24	Гремлин-2	Лимфоцитарный антиген 86
Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь	Ладинин-1	Стромелизин-2	Ингибина бета E цепь
UPF0378 белок KIAA0100	Липазы член I	Вероятный G-белок сцепленный рецептор 171	GRAM домен-содержащий белок 1C
Кининоген-1	Панкреатический липаза-связанный белок 1	Паппализин-2	Интерферон альфа-10
Ламинина субъединица альфа-2	Лейцин-богатый альфа- 2-гликопротеин	Микрофибриллярно- связанный гликопротеин 4	Интерферон альфа-16
Ламинина субъединица альфа-4	Матрикса- ремоделирования- связанный белок 5	Нейромедин-B	Интерферон альфа-6
Ламинина субъединица бета-1	Нетрин-4	Мимекан	Член 21 суперсемейства иммуноглобулинов
Протеин-лизин 6-оксидаза	Рецептор фактора роста гепатоцитов	Металлопротеиназа матрикса-19	Агрин
Мультимерин-1	C-S мотив хемокина 22	Интерлейкин-11	Пролактин

Вазопрессин-нейрофизин 2-копептин	Никталопин	Интерлейкин-17A	Kelch-подобный белок 11
Нидоген-1	Остеокальцин	Интерлейкин-18	Белок Wnt-16
Фосфолипаза A2	Основной слюнный пролин-богатый белок 3	Интерлейкин-26	Пропердин
Перфорин-1	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 10	Интерлейкин-28A	Калликреин-13
Фосфатидилинозитол-гликан-специфическая фосфолипаза D	Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный белок FLRT2	Трансмембранный epr24 домен-содержащий белок 3	1-ацил-sn-глицерин-3-фосфат ацилтрансфераза дельта
Фиброцистин	R-Спондин-3	Интерлейкин-29	Калликреин-9
Фосфолипидов транспортнический белок	Сиалоадгезин	Инсулин-подобный пептид INSL6	Витамин K-зависимый белок S
Кислая фосфатаза простаты	Трипсин-3	Белок Wnt-2b	Бутирофилин-подобный белок 8
Витамин K-зависимый белок Z	Дипептидаза 2	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 1	Ламинина субъединица бета-4
Слюнный кислотный пролин-богатый фосфопротеин 1/2	Коллаген и кальций-связывающий ЭГФ домен-содержащий белок 1	Спермы акросомы мембрана-ассоциированный белок 4	Лимфатических сосудов эндотелиальный рецептор гиалуроновой кислоты 1
Белок зоны беременности	Зародышевых клеток-специфический ген 1-подобный белок	Ламинина субъединица гамма-3	Цистатин-SA
Прорелаксин H2	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 31	Лизилоксидазы гомолог 3	Трансмембранный белок 59
Семафорин-4D	Аполипопротеин O	Нейротензин/нейромедин N	Аполипопротеин (a)-подобный белок 2
Slit гомологичный 2 белок	Дистрогликан	MAM домен-содержащий белок 2	Лизоцим-подобный белок 2
Альфа-текторин	Нейтрофильный дефенсин 4	Микрофибрилярно-связанный белок 2	Лизоцим-подобный белок 4
Тенасцин-X	Амфотерин-индуцированный белок 3	Белок, ингибирующий активность меланомы 2	Рилин
Клеверный фактор 3	Гамма-секретаза субъединица APN-1B	Металлопротеиназа матрикса-24	Ретинол-связывающий белок 4

Трансферрина рецептора белок 1	Аполипопротеин С-IV	Металлопротеиназа матрикса-25	Карбоновая ангидраза 14
Протрансформирующий фактор роста альфа	Арилсульфатаза G	Нетрин-1	Тубулоинтерстициального нефрита антиген
Трансформирующий фактор роста бета-2	Глия-активирующий фактор	Нетрин-3	Нейропептид W
Член 6 суперсемейства лиганда фактора некроза опухолей	Рекрутинга каспазы домен-содержащий белок 18	Альфа-N-ацетилгалактозаминид альфа-2, 6-сиалилтрансфераза 1	Альфа-1, 3-маннозил-гликопротеин 4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза B
Член 1B суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Гепарансульфатглюкозамин 3-O-сульфотрансфераза 3A1	Альфа-N-ацетилгалактозаминид альфа-2, 6-сиалилтрансфераза 3	Трансмембранный emr24 домен-содержащий белок 5
Член 5 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Тиротропин-рилизинг гормона-деградирующий эктоэнзим	Меланома-происходящий белок регуляции роста	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 3
Тромбопоэтин	Гуанилин	FMRФамид-родственные пептиды	Подокан-подобный белок 1
VIP пептиды	Холина транспортера-подобный белок 3	Отоконин-90	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 5
Кислая хитиназа млекопитающих	17-бета-гидроксистероид дегидрогеназа 14	Нейртурин	Кератокан
Цистеин-богатый секреторный белок 2	Иммуноглобулин лямбда-подобный полипептид 1	Нейрексофилин-1	Группы IIE секреторная фосфолипаза A2
Гаптоглобин-родственный белок	DnaJ гомолога подсемейства B член 14	Нейрексофилин-2	Фактор определения лево-право 2
C-C мотив хемокина 26	F-box only белок 8	Вариантный фактор тромбоцитов 4	NKG2D лиганд 2
Коллектин-11	Фибролейкин	Ноцицептин	Макрофаговая металлоэстаза
Цистеин-богатый с EGF-подобным доменом белок 2	Метионин-R-сульфоксидредуктаза В3, митохондриальная	V-набора и трансмембранный домен-содержащий белок 1	Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1
C-X-C мотив хемокина 16	Лейцин-богатый повторяющийся LGI семейства член 2	Пролин-богатый белок 4	Цитокинового рецептора-подобный фактор 1
Фибробластов фактор роста-связывающий белок 1	Транспорта пузырьков белок GOT1B	Пролактин-рилизинг пептид	Секретин

Член 5 семейства Интерлейкина-1	Интегральный мембранный белок GPR177	Сериновая протеаза 33	Стромальных клеток фактор 2
Член 9 семейства Интерлейкина-1	Вероятный G-белок сцепленный рецептор 78	Беременность- специфический бета-1- гликопротеин 8	Лизоцим-подобный белок 6
Калликреин-5	НЕРАСАМ член семейства 2	Ретбиндин	Серпин А9
Матрилин-2	Интерлейкина-27 рецептора субъединица альфа	FMRFамид-родственные пептиды	Склеростин домен- содержащий белок 1
Клеточного поверхностного гликопротеина CD200 рецептор 1	Проэнкефалин -А	Рибонуклеаза К6	Лизокардиолипин ацилтрансфераза 1
Лизофосфатидной кислоты фосфатаза типа 6	Интегрин альфа-10	Рибонуклеаза Т2	Глутамат карбоксипептидаза плазмы
Фактор обмена нуклеотидов SIL1	КТЕL мотив-содержащий белок 1	Репетин	Slit гомологичный 3 белок
Тромбоспондина типа-1 домен-содержащий белок 4	Лейкоцитарного иммуноглобулин- подобного рецептора подсемейства А член 5	Комплемента C1r субкомпонент-подобный белок	С3 и PZP-подобный альфа- 2-макроглобулин домен- содержащий белок 8
WNT1-индуцируемого- сигнального пути белок 2	Лейцин-богатый повторами и фибронектина типа III домен-содержащий белок 3	Неохарактеризованная гликозилтрансфераза AER61	Ретиноевой кислоты рецептора респондерный белок 2
Еромодомен-содержащий белок 9	Утероглобин	Семафорин-3G	Хрящевой кислотный белок 1
CD99 антиген-подобный белок 2	Нетрин-G1 лиганд	Секретоглобина семейства 1C член 1	Станниокальцин-1
Неохарактеризованный белок Clorf159	Паннексин-1	Секретоглобина семейства 1D член 1	Бета-текторин
Карбогидратсульфотрансфе раза 12	Протокадгерин-12	Секретоглобина семейства 1D член 2	Пост-GPI присоединения к белкам фактор 3
Вероятная сериновая карбоксипептидаза CPVL	Протокадгерин альфа- 10	Серпин A12	Зародышевых клеток- специфический ген 1 белок
Муцин-3A	Протокадгерин бета-10	Серпин I2	Интерлейкина-21 рецептор

CUB и вителлиновая зона-подобный домен-содержащий белок 1	Остеопетроз-ассоциированный трансмембранный белок 1	фон Виллебранда фактора С и EGF домен-содержащий белок	V-набор и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 4
Полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 14	Бета-галактозид альфа-2, 6-сиалилтрансфераза 1	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 15	Рецептора Scavenger цистеин-богатый домен-содержащий группы В белок
Галектин-9	GPI трансмидазы компонент PIG-S	Натриевого канала субъединица бета-2	Протиролиберин
Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 17	Пролин-богатый трансмембранный белок 3	Ингибитор металлопротеиназы 4	Семафорин-4А
Лейцин-богатый повторами нейрональный белок 2	Сульфгидрилоксидаза 2	Т-клеток иммуномодуляторный белок	
Бифункциональная гепарансульфат N-деацетилаза/N-сульфотрансфераза 3	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 16	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 10	Член 27 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей
Туфтелин	SH2 домен-содержащий белок 3А	Тимусный стромальный лимфопоэтин	Toll-подобный рецептор 7
Мозговой митохондриальный белок-носитель	SHC-трансформирующий белок 4	Трансмембранный белок 130	
Сигнальный пептид, CUB и EGF-подобный домен-содержащий белок 3	Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 23	Уникальный хрящевой матрикс-ассоциированный белок	Тиоредоксин домен-содержащий белок 16
14-3-3 белок сигма	Трансдуцин бета-подобный белок 2	Урокортин-2	Альфа-2-антиплазмин
Альфа-1-кислый гликопротеин 1	Tudor домен-содержащий белок 10	Урокортин-3 (	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 3
Альфа-1-кислый гликопротеин 2	Трансмембранный 9 член суперсемейства 3	Белок AMBP	Белок WFDC9
фон Виллебранда фактора А домен-содержащий белок 1	фон Виллебранда фактора D и EGF домен-содержащий белок	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 9-подобный	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 14
Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 9	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 17	Фактор ингибирования и дифференциации-родственный белок 88	Адипоцитов плазматическая мембрана-ассоциированный белок

Ангиотензиноген	Трансмембранный канал-подобный белок 2	Белок Wnt-10a	Пероксидазина гомолог
Аполипопротеин А-II (Apo-AII) (ApoA-II)	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 3	Белок Wnt-3a	Прогрессирующего анкилоза белка гомолог
Аполипопротеин А-IV (Apo-AIV) (ApoA-IV)	Теномодулин	Прото-онкогенный белок Wnt-3	Хитиназа-3-подобный белок 1
Аполипопротеин С-II (Apo-CII) (ApoC-II)	Тетраспанин-6	Белок Wnt-6	UPF0672 белок CXorf36
Бета-2-гликопротеин 1	Тиоредоксин домен-содержащий белок 5	Белок Wnt-9a	Арилсульфатаза J
Апоптоз-родственный белок 3	Фактора роста сосудистого эндотелия D	Цитокин SCM-1 бета	Кортистатин
Бета-секретаза 2	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 9	Зимогеновый гранулярной мембраны белок 16	Церулоплазмин
Трансфераза гистосовместимости АВО системы крови	Семафорин-3F	Вителлинового слоя-связывающий белок 1	Ангиопоэтин-родственный белок 5
Катепсин L2	Кислая фосфатаза-подобный белок 2	Антериорного градиентного белка 3 гомолог	Суперспиральный домен-содержащий белок 126
С-С мотив хемокина 3	Аполипопротеин О-подобный	Амелотин	CD177 антиген
С-типа лектинового домена семейства 1 член В	Бета-дефенсин 119	Неохарактеризованный белок C5orf46	Белка сапору гомолог 4
Кальций-активированный хлоридного канала регулятор 1	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 12	Неохарактеризованная aarF домен-содержащая протеинкиназа 1	Фибронектина типа-III домен-содержащий белок C4orf31
Химаза	Белок FAM131A	Драксин	Белок FAM180A
Коллаген альфа-1 (VI) цепь	Белок FAM3B	Фактор роста фибробластов 18	Тромбоцитов основной белок
Компонент комплемента C8 альфа-цепь	Бета-галактозидаза-1-подобный белок	С-Х-С мотив хемокина 11	Интерферон эпсилон
Компонент комплемента C9	Лизоцим g-подобный белок 1	Луб/PLAUR домен-содержащий белок 6	Интеллектин-2

Глюкозы-фруктозы оксидоредуктазы домен-содержащий белок 2	Интер-альфа-трипсин ингибитора тяжелая цепь H5-подобного белка	Химотрипсин-подобной эластазы семейства член 1	Альфа-1, 3-маннозил-гликопротеин 4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза А
DnaJ гомолога подсемейства В член 11	Акрсомы сперматозоидной-ассоциированный белок 5	Рецептор эритропоэтина	Фосфогликопротеин внеклеточного матрикса
Эктонуклеотидных пирозинфосфатазы/фосфодиэстеразы семейства член 7	Лейцин-богатый повторами и иммуноглобулин-подобный домен-содержащий погод-рецептор-взаимодействующий белок 2	МММ домен-содержащий гликозилфосфатидилинозитол-якорный белок 2	кДНК FLJ77863, высокоаналогичная секреторируемому и трансмембранному 1 (SECTM1) белку Homo sapiens мРНК
Аминопептидаза эндоплазматической сети 1	Сурфактант-ассоциированный белок 2	Металлопротеиназа матрикса-27	Эпидидимально-специфический липокалин-6
Рецепторная тирозин-белок киназа erbB-3	Адипонектина рецептора белок 1	Неактивная сериновая протеаза 35	Афамин
Резидентный белок эндоплазматической сети ERp44	Множественные домены, подобные фактору роста эпидермиса 6	Суперспиральный домен-содержащий белок 134	Вероятная катион-транспортирующая АТФаза 13A5
IgGfc-связывающий белок	Нейроэндокринный белок 7B2	Супрабазин	Глутатионпероксидаза 3
Комплемент фактора Н-родственный белок 1	Альфа-1В-гликопротеин	Секретоглобина семейства 1D член 4	Клаудин-18
Полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2	WAP, kazal, иммуноглобулин, kunitz и NTR домен-содержащий белок 2	V-набора и трансмембранный домен-содержащий белок 2A	Мнимый клеток-киллеров иммуноглобулин-подобный рецептор подобный белок KIR3DP1
Гемопексин	Арилцетамид деацеталаза-подобная 1	ADM	Секреторной фосфолипазы A2 рецептор
Активатор фактора роста гепатоцитов	Гистатин-3	Неохарактеризованный белок C2orf82	Гаптоглобин
Главного комплекса гистосовместности класса I-родственный генный белок	Про-нейрегулин-3, мембрана-связанная изоформа	Инсулинового фактора роста-подобный семейства член 1	Карциноэмбриогенная антиген-родственная молекула клеточной адгезии 20

Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок 6	Agouti-сигнализирующий белок	Кадгерин-подобный белок 29	Костный морфогенный белок 3
Tg дельта цепи C регион	Клаудин-8	Костный морфогенный белок 15	Костномозговой стромальный антиген 2
Интерлейкин-1 бета	UPF0454 белок C12orf49	Плазменной сериновой протеазы ингибитор	Цитохром P450 20A1
Низкой плотности липопротеинов рецептор-родственный белок 10	фон Виллебранда фактора А домен-содержащий белок 5B1	Карциноэмбриогенная антиген-родственная молекула клеточной адгезии 21	Бактерицидный/проницаемость-повышающий белок-подобный 3
Соединительная адгезивная молекула C	Кадгерин-6	Альфа-лактальбумин	Велка дру-19 гомолог 2
Неохарактеризованный белок KIAA0319	Кателицидин антимикробный пептид	Сестринский белок когезии хроматид DCC1	Группы IIF секреторная фосфолипаза A2
Ламинина субъединица альфа-5	Ламинина субъединица гамма-1	Галектин-3-связывающий белок	Карбоксипептидаза B
Фибронектина типа III домен-содержащий белок 4	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 7B	Динеина тяжелой цепи домен-содержащий белок 1	Гликозилтрансферазы 8 домен-содержащий белок 2
Липопротеин липаза	C-C мотив хемокина 16	C-C мотив хемокина 17	Белок FAM19A1
Интерстициальная коллагеназа	C-C мотив хемокина 24	Жирнокислая ацил-КоА редуктаза 1	GDNF семейства рецептор альфа-подобный
Металлопротеиназа матрикса-9	HEAT повтор-содержащий белок C7orf27	Fin bud гомолог фактора инициации	Вероятная глутатионпероксидаза 8
Муцин-16	Коллаген альфа-2 (IX) цепь	Полимерный иммуноглобулиновый рецептор	Цистатин-D
Муцин-2	Коллаген альфа-3 (IX) цепь	Прион-подобный белок Doppel	Цистатин-F
Муцин-5B	Колипаза	C-X-C мотив хемокина 6	Тромбоцит-активирующий фактор ацетилгидролаза
Миоцилин	Коллаген альфа-1 (XXVII) цепь	C-X-C мотив хемокина 10	Паппализин-1
Рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности 1	Карбоксипептидазы N субъединица 2	Бета-дефенсин 1	Носителей растворенных веществ семейства 22 член 12
Избыточно экспрессируемого гена 1 белок опухоли простаты	Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный нейрональный белок 4	Гиалуронана и протеогликана шивки белок 2	Хорионический соматомаммотропиновый гормон-подобный 1

Рецептор- взаимодействующая сериново/треониновая- протеинкиназа 2	Коллагена тройной спирали повтор- содержащий белок 1	Дизинтегрин и металлопротеиназы домен- содержащий белок 30	Динамики микротубул регуляторный белок 3
Эквилибративный транспортер нуклеозидов 3	Эндотелин-2	Суппрессор слитого гомолога	Ретинолдегидрогеназа 14
Селенопротеин P	Фибромодулин	Фолатный рецептор бета	Галанин
Легочный сурфактант- ассоциированный белок D	Fc-рецептор-подобный B	Внеклеточная сульфатаза Sulf-2	Транскобаламин-2
Стимулируемого ретиновой кислотой гена 6 белка гомолог	Цинк-пальцевый RAD18 домен-содержащий белок Clorf124	Член 14 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей	Катехол-О- метилтрансферазы домен- содержащий белок 1
Клеверный фактор 1	Фактор роста/дифференциации 15	Артемин	Трипептидилпептидаза 1
Ингибитор пути тканевого фактора 2	Глия-производный нексин	Коллаген альфа-1 (XII) цепь	Trem-подобный транскриптный белок 1
Протромбин	Прогонадолиберин-1	Коллаген альфа-1 (XIV) цепь	Гуанилатциклазы активатор 2B
Toll-подобный рецептор 9	Гранзим K	Бета-дефенсин 2	Индуцируемый T-клеточный ко-стимулятор
Межклеточных клеток адгезивная молекула 4	Интерферон альфа-17	Интерлейкин-21	
Интерлейкин-19	Интерферон альфа-21	Интерлейкин-3	
Истмин-2	Интерферон альфа-8	Интерлейкин-7	Notch гомолог 2 N- терминально-подобного белка
Kin IRRE-подобного белка 1	Интерферон омега-1	Ингибина альфа цепь	Ламинина субъединица бета-2
Калликреин-10	Ранний плацентарный инсулин-подобный пептид	Ламинина субъединица альфа-3	Нейропилин-2
Латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающий белок 4	EGF, латрофилин и семь трансмембранных доменов-содержащий белок 1	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства на хромосоме X	ЭГФ-содержащий фибулин- подобный белок внеклеточного матрикса 1
Спаренный иммуноглобулин-подобного типа 2 рецептор альфа	Фибронектин типа 3 и анкирина повторяющиеся домены белок 1	FX1D домен-содержащий регулятор транспортировки ионов 6	Рецепторного типа тирозин-протеин фосфатаза каппа
Регенерирующих островков-происходящий белок 3 альфа	Лизилоксидазы гомолог 4	Инкорпоратор серина 2	Регенерирующих островков-происходящий белок 4

Е3 убиквитин-протеинлигаза RNF5	Люмикан	Стромелизин-3	Тахикинин-4
Протахикинин-1	Адропин	Секретируемый фосфопротеин 1	Металлопротеиназа матрикса-23
Секретируемый связанный с ожогом белок 1, изоформа CRA_a	Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный белок FLRT1	Сериновая бета-лактамаза-подобный белок LACTB, митохондриальный	Комплемента C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 5
Плазминоген-родственный белок B	Нуклеобиндин-2	Галектин-3	Оптицин
Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDHHC16	Фосфолипаза A2	Панкреатический прогормон	Пре-малый/секретируемый гликопротеин
Ангиопоэтин-родственный белок 1	Проэнкефалин -B	Беременность-специфический бета-1-гликопротеин 6	Пентраксин-родственный белок RTX3
UPF0510 белок C19orf63	Распознавания пептидогликана белок I-бета	Dickkopf-родственный белок 3	Карбоксилэстераза 8
Рецептора Scavenger цистеин-богатый типа 1 белок M160	Иммуноглобулина суперсемейства содержащий лейцин-богатый повторами белок 2	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 11	Тиоредоксин-родственный трансмембранный белок 4
ER деградации-усиления альфа-маннозидаза-подобный 2	V-набор и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 2	Регенерирующих островков-происходящий белок 3 гамма	Домен-содержащий белок 2 суперсемейства основного фасилитатора
Бета-галактозидаза-1-подобный белок 2	Пептид YY	RING пальцевый белок 43	Калликреин-12
Интерлейкина-17 рецептор E	Ретинол-связывающий белок 3	Семеногелин-2	Brevican ядерный белок
Интерлейкин-20	Атерин	Муцин-15	Поримин
Интерлейкин-25	Белка транслокации SEC63 гомолог	Костный сиалопротеин 2	Торсин-1A
PDZ домен-содержащий белок 11	Трансформирующий фактор роста бета-3	Лимфотактин	C-C мотив хемокина 23
Релаксин-3	Белок Wnt-10b	Рост-регулируемый белок альфа	Тестикан-3

Ретиноид-индуцируемая сериновая карбоксипептидаза	Реналаза	R-Спондин-2	Основной слюнный пролин-богатый белок 4
Белок, связанный с карциномой эпителия короткого неба, легкого и носа 2	Пропротейн конвертаза субтилизин/кексин типа 4	Трансмембранный и суперспиральный домен-содержащий белок 3	Член 18 суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей
WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 5	Карбоксипептидаза А4	VEGF ко-регулируемый хемокин 1	Братский белок CDO
Тромбоцитарный фактор роста С	Ольфактомедин-4	ADM2	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 4
Дизинтегрин и металлопротеиназы домен-содержащий белок 33	Инсулин-подобного фактора роста-связывающий белок комплексная кислая лабильная цепь	Гидроксистероид 11-бета-дегидрогеназа 1-подобный белок	Дегидрогеназы/редуктазы SDR член семейства 9
BSD домен-содержащий белок 1	Амелогенин, Y изоформа	Дельта-подобный белок 1	Эппин
Клеток адгезивная молекула 3	Арилсульфатаза F	Эфрин-A1	Отоанкорин
CDC45-родственный белок	Хоригонадотропина субъединицы бета вариант 2	Фактора роста фибробластов рецептор-подобный 1	Тенасцин-R
Хондролектин	Бета-дефенсин 104	GDNF семейства рецептор альфа-3	Фактор роста
Диацилглицерин O-ацилтрансфераза 2	Бета-дефенсин 105	Рецептор тромбоцитов Gi24	Белок TSPEAR
3-кето-стероидредуктаза	Бета-дефенсин 107	Прогонанолиберин-2	Гефестин
Интерлейкина-17 рецептор С	Белок WFDC11	Калликреин-7	Бутирофиллин-подобный белок 3
Интерлейкина-17 рецептор D	WAP четырехдисульфидный ядерный доменный белок 6	Аполипопротеин F	Бутирофиллин-подобный белок 9
Интегратора комплексная субъединица 1	Эпиген	Белок CASC4	Ламинина субъединица гамма-2
Соединительная адгезивная молекула-подобная	Белок FAM19A5	VIP36-подобный протеин	Белок LMBR1L
E3 убиквитин-белок лигаза LNX	Клаудин-6	Магния транспортерный белок 1	Муцин-21

Лейцин-богатый повторяющийся трансмембранный нейрональный белок 3	Карциноэмбриогенная антиген-родственная молекула клеточной адгезии 19	Амилорид-чувствительная аминоксидаза [медь-содержащая]	Эдоплазматической сети маннозил-олигосахарид 1,2-альфа-маннозидаза
Метионинаденосилтрансферазы 2 субъединица бета	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 1	ДНК повреждение-регулируемый аутофагии модуляторный белок 2	Панкреатической секреторной гранулярной мембраны главный гликопротеин GP2
Подокаликсин-подобный белок 2	Белок COQ10, митохондриальный	Трансмембранный белок C17orf87	Семафорин-4В
Проминин-2	Неохарактеризованный белок C19orf41	Комплемент фактора Н-родственный белок 5	Семафорин-5В
Плексин домен-содержащий белок 2	Неохарактеризованный белок C21orf36	FK506-связывающий белок 7	Эпсилон-саркогликан
Roundabout гомолог 4	Белка delta гомолог 2	Инкорпоратор серина 1	Гуанилат-связывающий белок 5
Лактозилцерамид альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Кокаин- и амфетамин-регулируемый транскриптный белок	Трансмембранный и убиквитин-подобный домен-содержащий белок 1	Эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза 6
SID1 трансмембранный член семейства 2	Липомы HMGIC слитый партнер-подобный 1 белок	Белок ERGIC-53-подобный	Серпин В3
Sushi домен-содержащий белок 1	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 18	Toll-подобный рецептор 10	Белка RMD5 гомолог В
Сериновая/треониновая-киназа TAO2	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 25	Toll-подобный рецептор 8	Scavenger рецептора класса А член 5
Трансмембранная протеаза, сериновая 2	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 3В	Селенопротеин Т	Семафорин-6В
УДФ-глюкуроновой кислоты декарбоксилаза 1	Лейцин-богатый повтор-содержащий белок 3	Сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 11	Трансмембранный белок 108
Неохарактеризованный белок C10orf58	Lu6/PLAUR домен-содержащий белок 4	Сортирующий нексин-24	Sushi домен-содержащий белок 3
Тиоредоксин-родственный трансмембранный белок 2	Витамин К эпоксидредуктазы комплексная субъединица 1	Комплемент C1q фактор некроза опухолей-родственный белок 1	Латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающий белок 2
СМР-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Дизинтегрин и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 20	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6494/PRO21346	Мнимый неохарактеризованный белок UNQ6190/PRO20217

Мнимый неохарактеризованный белок ENSP00000380674	Мнимый неохарактеризованный белок ENSP00000381830	Секретируемый и трансмембранный 1 прекурсорный вариант	Секретируемый и трансмембранный 1 прекурсорный вариант
Трансмембранный белок 119	Белок критического региона синдрома кошачьего глаза 1	С-типа лектинового домена семейства 18 член А	Коллаген альфа-1 (XX) цепь
Трансмембранный белок 98	Белок экспрессируемой в яичках 101	Цистеин-богатый секреторный белок 3	Нетрина рецептор UNC5D
Пре-В лимфоцитарный белок 3	Ксилосилтрансфераза 2	Комплемент C4-А	Муцин-13
Мнимый неохарактеризованный белок C14orf144	Белок FAM20A	Мнимый неохарактеризованный белок PRO2829	АТР-зависимая металлопротеаза YME1L1
Мембрана-связанный фактор транскрипции сайта-1 протеаза	Трансмембранный и иммуноглобулиновый домен-содержащий белок 1	Кальций-активированный хлоридного канала регулятор 2	Пропротейн конвертаза субтилизин/кексин типа 5
Фиколин (Коллаген/фибриноген доменсодержащий) 3 (Nakata антиген) (NL3) (Фиколин (Коллаген/фибриноген доменсодержащий) 3 (Nakata антиген), изоформа CRA_b)	Мнимый клеток- киллеров иммуноглобулин- подобный рецептор- подобный белок KIR3DX1 (Лейкоцитарного рецептора кластерный член 12)	Нейробластомы суппрессор онкогенности 1	

Терапевтические белки, предложенные здесь, не должны расцениваться как исключительные. Напротив, как следует из раскрытия, представленного здесь, способы изобретения применимы к любому белку, для которого желательно присоединение водорастворимого полимера в соответствии с изобретением. Например, терапевтические белки, описанные в US 2007/0026485, включены в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Белки системы свертывания крови.

Одна из особенностей настоящего изобретения - то, что в качестве исходного материала используется белок системы свертывания крови, который может быть получен из человеческой плазмы, либо произведен способами рекомбинантной инженерии, согласно патентам US No. 4757006; US No. 5733873; US No. 5198349; US No. 5250421; US No. 5919766; а также EP 306968.

Терапевтические полипептиды, в частности, белки, отвечающие за систему свертывания крови, включая фактор IX (Ф IX), фактор VIII (Ф VIII), фактор VIIa (Ф VIIa), фактор фон Виллебранда (ФВф), фактор FV (Ф V), фактор X (Ф X), фактор XI (Ф XI), фактор XII (Ф XII), тромбин (Ф II), протеин С, протеин S, tPA, PAI-1, тканевой фактор (Тф) и протеазу ADAMTS 13 быстро разрушаются протеолитическими ферментами и нейтрализуются антителами. Это способствует уменьшению их периода полужизни и времени циркуляции, что ограничивает их терапевтическую эффективность. Для достижения и поддержания желаемых терапевтических и профилактических эффектов этих белков системы свертывания требуется частое их введение в относительно высоких дозах. Как следствие, сложно достигнуть адекватного регулирования дозы, а необходимость частых внутривенных инъекций накладывает ограничения на образ жизни пациента.

Как указывалось здесь, изобретение охватывает белки свертывания крови, включая фактор IX (Ф IX), фактор VIII (Ф VIII), фактор VIIa (Ф VIIa), фактор фон Виллебранда (ФВф), фактор FV (Ф V), фактор X (Ф X), фактор XI, фактор XII (Ф XII), тромбин (Ф II), протеин С, протеин S, tPA, PAI-1, тканевой фактор (Тф) и протеазу ADAMTS 13, но не ограничиваясь ими. Термин "белок свертывания крови", используемый в этом документе, относится к любому белку из фактора IX (Ф IX), фактора VIII (Ф VIII), фактора VIIa (Ф VIIa), фактора фон Виллебранда (ФВф), фактора FV (Ф V), фактора X (Ф X), фактора XI (Ф XI), фактора XII (Ф XII), тромбина (Ф II), протеина С, протеина S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (Тф) и протеазы ADAMTS 13, проявляющему биологическую активность, аналогичную активности нативного белка свертывания крови.

Каскад свертывания крови разделен на три отдельных сегмента: внутренний, внешний, а также общий пути (Schenone et al., Curr Opin Hematol. 2004; 11:272-7). Каскад включает ряд ферментов (проферментов) сериновых протеаз и белковые кофакторы. При необходимости неактивный профермент-предшественник превращается в активную форму, которая, в свою очередь, преобразует следующий фермент каскада.

Внутренний путь включает в себя факторы свертывания VIII, IX, X, XI и XII. Инициация внутреннего пути происходит тогда, когда прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фактор XI (Ф XI) и фактор XII (Ф XII) вступают в контакт с отрицательно заряженной поверхностью. Также требуются ионы кальция и фосфолипиды, секретируемые из тромбоцитов.

Внешний путь запускается при повреждении внутренних стенок кровеносных сосудов. Обнажается мембранный гликопротеин тканевой фактор, который связывается с циркулирующим фактором VII (Ф VII) и с малыми присутствующими количествами его активированной формы Ф VIIa. Это связывание приводит к полной конверсии Ф VII в Ф VIIa и, последовательно, в присутствии кальция и фосфолипидов, конверсию фактора IX (Ф IX) в фактор IXa (Ф IXa) и фактора X (Ф X) в фактор Xa (Ф Xa). Ассоциирование Ф VIIa с тканевым фактором усиливает протеолитическую активность путем перемещения сайтов связывания Ф VII с субстратами (Ф IX и Ф X) в более доступное положение и путем индукции изменения конформации, усиливающей ферментативную активность Ф VIIa.

Активация Ф X - общая точка обоих путей. Вместе с фосфолипидами и кальцием, факторы Va (Ф Va) и Xa преобразуют протромбин в тромбин (комплекс протромбиназы), который затем разрезает фибриноген с образованием мономеров фибрина. Мономеры полимеризуются, формируя волокна из фибрина. Фактор XIIIa (Ф XIIIa) ковалентно связывает эти волокна друг с другом, формируя жесткую сеть.

Превращение Ф VII в Ф VIIa также катализируется рядом протеаз, включая тромбин, Ф IXa, Ф Xa, фактор XIa (Ф XIa), фактор XIIa (Ф XIIa). Для ингибирования ранних стадий каскада, ингибитор пути тканевого фактора воздействует на комплекс Ф VIIa/тканевой фактор/Ф Xa.

Фактор VIIa.

Ф VII (также известный как стабильный фактор или проконвертин) является гликопротеином, относящимся к группе витамин К-зависимых сериновых протеаз, обладающим ключевой ролью в гемостазе и свертывании крови (Eigenbrot, Curt Protein Pept Sci. 2002; 3:287-99).

Ф VII синтезируется в печени и секретируется в виде одноцепочечного гликопротеина с массой 48 кДа. Ф VII, как и все гликопротеины, относящиеся к группе витамин К-зависимых сериновых протеаз, имеет доменную структуру, содержащую аминокислотный домен гамма-карбоксиглутаминовой кислоты (Gla) с 9-12 остатками, ответственными за взаимодействие белка с липидными мембранами, карбокситерминальный домен сериновой протеазы (каталитический домен), а также два домена, аналогичные доменам фактора роста эпидермиса, содержащие ион кальция, отвечающие за взаимодействие с тканевым фактором. Гамма-глутамилкарбоксилаза катализирует карбоксилирование остатков Gla на аминокислотном участке молекулы. Действие карбоксилазы зависит от восстановленной формы витамина К, который при этом окисляется до эпоксидной формы. Обратное превращение эпоксида витамина К в восстановленную форму происходит под действием витамин-К-эпоксид-редуктазы.

Основная часть Ф VII циркулирует в плазме крови в виде профермента, и активация этой формы происходит при разрезании пептидной связи между 152-м остатком аргинина и 153-м остатком изолейцина. Результирующий активированный Ф VIIa состоит из NH<sub>2</sub>-конечной легкой цепи (20 кДа) и COOH-конечной тяжелой цепи (30 кДа), связанных единственной дисульфидной цепью (цис 135 с цис 262). Легкая цепь содержит мембран-связывающий Gla-домен, в то время, как тяжелая цепь содержит каталитический домен.

Концентрация Ф VII в плазме обусловлена генетическими факторами и факторами окружающей среды, и составляет около 0,5 мг/мл (Pinotti et al., Blood. 2000; 95:3423-8). Различные Ф VII генотипы могут привести к средним уровням Ф VII, отличающимся в несколько раз. Уровень Ф VII в плазме повышается у здоровых женщин во время беременности, кроме того, он повышается с возрастом, выше у женщин и у лиц с гипертриглицеридемией. Ф VII имеет самый короткий период полужизни из всех факторов-прокоагулянтов (3-6 ч). У здоровых людей средняя концентрация Ф VIIa в плазме равна 3,6 нг/мл, период полужизни циркулирующего Ф VIIa относительно велик (2,5 ч) в сравнении с остальными факторами свертывания крови.

Наследственная недостаточность Ф VII - редкое ауточномное рецессивное нарушение системы свертывания крови, распространенность которого в популяции оценивается в 1 случай на 500000 людей (Acharya et al., J Thromb Haemost. 2004; 2248-56). Приобретенная недостаточность Ф VII из-за применения ингибиторов также очень редка. Описаны случаи недостаточности после применения таких препаратов, как цефалоспорины, пенициллины, антикоагулянты для приема внутрь. Кроме того, приобретенная недостаточность Ф VII отмечалась при иных состояниях: миеломе, сепсисе, апластической анемии, при терапии интерлейкином-2 и антитимоцитарным глобулином.

К эталонным полинуклеотидным и полипептидным последовательностям относятся, например, последовательности с номерами доступа GenBank J02933 для геномной последовательности, M13232 для кДНК (Hagen et al., PNAS 1986; 83: 2412-6), и P08709 для полипептидной последовательности (ссылки включены в настоящую заявку во всей полноте). Описано множество полиморфизмов Ф VII, например, см. Sabater-Lleal et al. (Hum Genet. 2006; 118:741-51) (ссылка включена в настоящую заявку во всей полноте).

Фактор IX.

Ф IX - витамин-К-зависимый протеин плазмы, участвующий во внутреннем пути коагуляции крови путем превращения Ф X в его активную форму в присутствии ионов кальция, фосфолипидов и Ф VIIa.

Преобладающая каталитическая способность Ф IX аналогична сериновым протеазам со специфичностью к связи аргинин-изолейцин в Ф X. Активация Ф IX происходит под действием Ф XIa, который отрезает активационный пептид от Ф IX, формируя активированную молекулу Ф IX, содержащую две цепи, связываемые одной или большим количеством дисульфидных связей. Дефекты Ф IX - причина рессивной гемофилии В, сцепленной с X-хромосомой.

Гемофилия А и В - наследственные заболевания, которые характеризуются дефицитом полипептидов Ф VIII и Ф IX, соответственно. Первопричина дефицита зачастую лежит в мутациях в генах Ф VIII и Ф IX, которые расположены в X-хромосоме. Традиционная терапия гемофилии часто заключается во внутривенном введении смешанной плазмы или полуочищенных белков системы свертывания, полученных от людей с нормальной функцией. Эти препараты могут быть загрязнены патогенными агентами или вирусами, например, инфекционными прионами, ВИЧ, парвовирусом, гепатитом А, гепатитом С. Вследствие этого, имеется острая потребность в лекарственных средствах, при производстве которых не используется человеческая сыворотка.

Уровень понижения активности Ф IX прямо пропорционален тяжести гемофилии В. Текущая терапия гемофилии В заключается в замене недостающего белка полученным из плазмы или рекомбинантным Ф IX (так называемая заместительная терапия или лечение Ф IX).

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности Ф IX приведены, например, в базе UniProtKB/Swiss-Prot, номер доступа P00740, базе US Pat. номер 6531298, а также на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1).

Фактор VIII.

Фактор свертываемости VIII (Ф VIII) циркулирует в плазме при очень низкой концентрации, он связан нековалентно с фактором фон Виллебранда (ФВф). Во время гемостаза, Ф VIII отделяется от ФВф и действует как кофактор при активации Ф X, медируемой фактором IX (Ф IXa) посредством увеличения скорости активации в присутствии кальция и фосфолипидов или клеточных мембран.

Ф VIII синтезируется в виде одноцепочечного предшественника с массой примерно 270-330 кДа и с доменной структурой A1-A2-B-A3-C1-C2. При очищении из плазмы (т.н. "полученный из плазмы" или "плазматический"), Ф VIII состоит из тяжелой цепи (A1-A2-B) и легкой (A3-C1-C2). Молекулярная масса легкой цепи равна 80 кДа, в то время, как, вследствие протеолиза В-домена, вес тяжелой цепи варьируется в интервале 90-220 кДа.

Ф VIII также синтезируется как рекомбинантный белок для терапии нарушений свертываемости крови. Для определения потенциальной эффективности рекомбинантного Ф VIII (рФ VIII) как терапевтического средства были разработаны различные анализы *in vitro*. Эти анализы имитируют эффекты эндогенного Ф VIII *in vivo*. Обработка тромбина Ф VIII *in vitro* приводит к быстрому подъему и последующему спаду его прокоагулянтной активности, по данным анализов *in vitro*. Эта активация и деактивация согласуется со специфическим ограниченным протеолизом тяжелой и легкой цепей, что видоизменяет доступность различных связывающих эпитопов Ф VIII, например, позволяя Ф VIII отсоединяться от ФВф и связываться с фосфолипидной поверхностью или изменять способность к связыванию с определенными моноклональными антителами.

Нехватка или дисфункция Ф VIII ассоциированы с наиболее частым нарушением свертываемости крови - гемофилией А. Способ выбора для лечения гемофилии А - заместительная терапия плазмой или концентратами рФ VIII. Пациенты с тяжелой гемофилией А с уровнем Ф VIII ниже 1%, как правило, проходят профилактическую терапию, предназначенную для поддержания уровня Ф VIII выше 1% между его введениями. Принимая во внимание среднее время полужизни различных препаратов Ф VIII при циркуляции, как правило, этот уровень достижим при введениях Ф VIII два-три раза в неделю.

Эталонные полинуклеотидные и полипептидные последовательности включают, например:

UniProtKB/Swiss-Prot

P00451 (FA8\_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, *Nature*, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., Structure of human Factor VIII, *Nature*, 312(5992):337-42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost*, 2003;29;11-29 (2002).

Фактор фон Виллебранда.

Фактор фон Виллебранда (ФВф) - гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде нескольких мультимеров, варьирующихся в размере от 500 до 20000 кДа. Мультимерные формы ФВф составлены из полипептидных субъединиц массой 250 кДа, связанных друг с другом дисульфидными связями. ФВф вызывает первичную адгезию тромбоцитов к субэндотелию поврежденной сосудистой стенки. Только большие мультимеры проявляют гемостатическую активность. Предполагается, что эндотелиальные клетки секретируют большие полимерные формы ФВф, а молекулы ФВф, имеющие низкий молекулярный вес (низкомолекулярные формы ФВф) появляются вследствие протеолитического разрезания. Мультимеры, имеющие большие молекулярные массы, накапливаются в тельцах Вейбеля-Паладе клеток эндотелия и высвобождаются после стимуляции.

ФВф синтезируется эндотелиальными клетками и мегакариоцитами в виде препро-ФВф, состоящего из большого количества повторяющихся доменов. После отрезания сигнального пептида, про-ФВф димеризуется посредством образования дисульфидных связей на С-терминальном участке. Димеры служат протомерами мультимеризации, которая управляется путем образования дисульфидных связей на свободных концах. За объединением в мультимеры следует протеолитическое удаление пропептидной последовательности (Leyte et al., *Biochem. J.* 274 (1991), 257-261).

Первичный продукт трансляции, считываемый с клонированной кДНК ФВф является полипептидом-предшественником, содержащим 2813 остатков (препро-ФВф). Препро-ФВф состоит из 22 аминокислотных остатков сигнального пептида и 741 аминокислотных остатков пропептида, таким образом, зрелый ФВф содержит 2050 аминокислот (Ruggeri Z.A., and Ware, J., *FASEB J.*, 308-316 (1993)).

Дефекты ФВф вызывают болезнь фон Виллебранда (ФВБ), которая характеризуется более или менее выраженной кровоточивостью. ФВБ 3 типа - наиболее тяжелая форма, при которой ФВф полностью отсутствует, ФВБ 1 типа обусловлена количественной потерей ФВф и ее проявления могут быть весьма мягкими, а ФВБ 2 типа характеризуется качественными дефектами ФВф, ее проявления могут быть такими же тяжелыми, как и при 3 типе. ФВБ 2 типа имеет много подтипов, некоторые из которых ассоциированы с отсутствием или уменьшением количества мультимеров с высоким молекулярным весом. Болезнь фон Виллебранда типа 2а (ФВБ-2А) характеризуется утратой мультимеров и промежуточных размеров, и больших размеров. ФВБ-2В характеризуется утратой мультимеров с самым большим молекулярным весом. Специалистам в данной области техники известны и иные болезни и нарушения, связанные с ФВф.

Полинуклеотидная и аминокислотная последовательности препро-ФВф представлены в базе GenBank, номера доступа NM\_000552 и NP\_000543, соответственно.

Иные белки свертывания крови согласно изобретению описаны в области техники, например, Mann KG, *Thromb Haemost.* 1999; 82:165-74.

#### А. Полипептиды.

Одна из особенностей настоящего изобретения - то, что в качестве исходного материала используется белок или полипептид. Как здесь описано, термин терапевтический белок относится к любой молекуле терапевтического белка, проявляющей биологическую активность, связанную с активностью терапевтического белка. В одном из воплощений изобретения, молекула терапевтического белка представляет собой белок полной длины.

Подразумеваемые молекулы терапевтических белков включают протеины, имеющие полную длину, предшественники протеинов полной длины, биологически активные субъединицы или фрагменты протеинов полной длины, а также биологически активные производные или варианты какой-либо из этих форм терапевтических белков. Итак, к терапевтическим белкам относят те, которые (1) имеют аминокислотную последовательность, более, чем на примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% или более идентичную с участком из по меньшей мере около 25, около 50, около 100, около 200, около 300, около 400 и более аминокислот полипептида, закодированного эталонной нуклеиновой кислотой или аминокислотной последовательностью, приведенной здесь; и/или (2) специфически связываются с антителами, например, поликлональными или моноклональными антителами, сформированными против иммуногена, содержащего эталонную аминокислотную последовательность, описанную здесь, ее иммуногенный фрагмент и/или консервативно модифицированный вариант.

Согласно данному изобретению, термин "рекомбинантный терапевтический белок" включает любой терапевтический белок, полученный по технологии рекомбинантной ДНК. В некоторых воплощениях, термин включает описанные здесь белки.

Термин "эндогенный терапевтический белок", используемый в этом документе, включает терапевтические белки, полученные от млекопитающих, предназначенные для терапии. В это понятие также включаются терапевтические белки, транскрибируемые из трансгенной или иной чужеродной ДНК, присутствующей в указанном млекопитающем. Термин "экзогенный терапевтический белок", используемый здесь, включает белки свертывания крови, полученные не от млекопитающих, предназначенные для терапии.

Термины "полученный из плазмы белок свертывания крови" или "плазматический", используемые в этом документе, включают все формы белков, обнаруживаемые в крови млекопитающих, которые способны участвовать в каскаде коагуляции.

Термины "биологически активное производное" или "биологически активный вариант", используемые в этом документе, включают любые производные или варианты молекулы, имеющие аналогичные с упомянутой молекулой функциональные и/или биологические свойства, например, связывающие свойства, и/или аналогичную с ней структуру, например, пептидный скелет или основную полимерную единицу.

"Аналог", такой как "вариант" или "производное" -соединение, в значительной степени сходное по структуре и имеющее такую же биологическую активность, что и природное, хотя и имеющее отличия.

Например, вариант полипептида - полипептид, в значительной степени сходный по структуре и имеющий такую же биологическую активность, что и эталонный полипептид. Варианты или аналоги отличаются по составу аминокислотных последовательностей в сравнении с природными полипептидами, из которых был получен аналог, основываясь на одной и более мутациях, включая (i) делецию одного и большего количества аминокислотных остатков на одном и более концах полипептида и/или на одном и более внутренних участках последовательности природного полипептида (например, фрагменты), (ii) вставку или добавку одной и большего количества аминокислот на одном и более концах полипептида (как правило, "добавление" или "слияние") и/или на одном и более внутренних участках (как правило, "вставка") последовательности природного полипептида или (iii) замещение одной и большего количества аминокислот в последовательности природного полипептида на другие аминокислоты. В качестве примера, "производное" является типом аналога и относится к полипептиду, имеющему аналогичную или в значительной степени сходную структуру с эталонным полипептидом, который был модифицирован, например, химически.

Вариант полипептида является типом аналога полипептида и включает инсерционные варианты, при которых один и большее количество аминокислотных остатков добавлены к аминокислотной последовательности терапевтического белка согласно изобретению. Вставки могут быть расположены на одном или обоих концах протеина, и/или могут располагаться во внутренних участках аминокислотной последовательности терапевтического белка. Инсерционные варианты с дополнительными остатками на одном или обоих концах включают, например, слитые белки и белки, включающие аминокислоты с группами-метками или иные меченые аминокислоты. В одном случае, молекул белка свертывания крови необязательно содержит N-терминальный остаток Met, особенно, если молекула экспрессируется рекомбинантно в бактериальных клетках, например, *E. coli*.

Делеционные варианты отличаются тем, что из полипептидной последовательности терапевтического белка, описанного здесь, удалены один или более аминокислотных остатков. Делеции могут быть расположены на одном или обоих концах полипептида терапевтического белка, и/или могут быть обусловлены удалением одного и большего количества остатков из аминокислотной последовательности терапевтического белка. Делеционные варианты, таким образом, включают фрагменты полипептидной последовательности терапевтического белка.

Заместительные варианты характеризуются тем, что один или более аминокислотных остатков в полипептиде терапевтического белка удалены и замещены другими остатками. В одном случае, замены могут быть консервативными по природе, консервативные замены этого типа хорошо известны в области техники. Альтернативно, изобретение охватывает замены, которые также являются неконсервативными. Примеры консервативных замещений описаны в Lehninger, [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77] и представлены ниже.

Консервативные замещения.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАДИКАЛА	АМИНОКИСЛОТА
Неполярные (гидрофобные) :	
А. Алифатические	A L I V P
В. Ароматические	F W
С. Серосодержащие	M
Д. Граничные	G
Незаряженные полярные :	
А. Гидроксильные	S T Y
В. Амидные	N Q
С. Сульфгидрильные	C
Д. Граничные	G
Положительно заряженные (основные)	K R H
Отрицательно заряженные (кислотные)	D E

Альтернативный примерный перечень консервативных вариантов замен приведен ниже.

## Консервативные замены II.

ИСХОДНЫЙ ОСТАТОК	ПРИМЕРЫ ЗАМЕНЫ
Ала (A)	Вал, Лей, Иле
Арг (R)	Лиз, Глн, Асн
Асн (N)	Глн, Гис, Лиз, Арг
Асп (D)	Глу
Цис (C)	Сер
Глн (Q)	Асн
Глу (E)	Асп
Гис (H)	Асн, Глн, Лиз, Арг
Иле (I)	Лей, Вал, Мет, Ала, Фен,
Лей (L)	Иле, Вал, Мет, Ала, Фен
Лиз (K)	Арг, Глн, Асн
Мет (M)	Лей, Фен, Иле
Фен (F)	Лей, Вал, Иле, Ала
Про (P)	Гли
Сер (S)	Тре
Тре (T)	Сер
Три (W)	Тир
Тир (Y)	Три, Фен, Тре, Сер
Вал (V)	Иле, Лей, Мет, Фен, Ала

## В. Полинуклеотиды.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические белки по изобретению, включают в рамках изобретения, например, гены, пре-мРНК, мРНК, кДНК, полиморфные варианты, аллели, искусственные и природные мутанты, но не ограничиваясь ими.

Полинуклеотиды, кодирующие терапевтические белки, также включают в рамках изобретения, например, но не ограничиваясь ими, те, которые (1) специфически гибридизированы в жестких гибридизационных условиях с нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность, описанную здесь, а также их консервативно модифицированные варианты; (2) имеют нуклеотидную последовательность с более, чем 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99%, и большей идентичностью нуклеотидной последовательности на участке с по меньшей мере около 25, около 50, около 100, около 150, около 200, около 250, около 500, около 1000, и более нуклеотидов (вплоть до полной длины последовательности из 1218 нуклеотидов зрелого белка), с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной здесь. Примером "жестких гибридизационных" условий служит гибридизация при 42°C в 50% формамиде, 5X SSC (цитрат и хлорид натрия), 20 mM Na-PO<sub>4</sub>, pH 6,8; и отмывка в 1X SSC при 55°C в течение 30 мин. Следует понимать, что в зависимости от длины и содержания ГЦ-нуклеотидов гибридизируемых последовательностей, эти примерные условия могут быть изменены. Для определения приемлемых условий гибридизации приемлемы стандартные в данной области техники формулы. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51.

"Природные" полинуклеотидные или полипептидные последовательности, как правило, происходят от млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, приматов, например, человека; грызунов, например, крыс, мышей, хомяков; от коров, свиней, лошадей, овец или иных млекопитающих. Нуклеиновые кислоты и белки в рамках изобретения могут быть рекомбинантными молекулами (например, гетерологическими, кодирующими последовательность дикого типа или ее варианты, или не встречающимися в природе).

## С. Получение терапевтических белков.

Получение терапевтических белков включает любые способы, известные в области техники, предназначенные для: (i) получения рекомбинантной ДНК способами генной инженерии, (ii) внедрения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки посредством, например, но не ограничиваясь ими, трансфекции, электропорации или микроинъекции, (iii) культивирования указанных трансформированных клеток, (iv) экспрессирования терапевтических белков, например, конститутивно или по индукции, а также (v) выделения указанных белков свертывания крови, например, из культураль-

ной среды или путем сбора трансформированных клеток для получения очищенного терапевтического белка.

В иных случаях, терапевтический белок получают путем экспрессии в подходящей прокариотической или эукариотической клеточной системе, характеризующейся способностью к синтезу фармакологически приемлемой молекулы белка свертывания крови. Примерами эукариотических клеток являются клетки млекопитающих, например, CHO, COS, НЕК 293, ВНК, SK-Нер, а также НерG2.

Для получения терапевтических белков используется множество векторов, выбранных из эукариотических и прокариотических векторов экспрессии. Примерами векторов прокариотической экспрессии служат плазмиды, например, но не ограничиваясь ими, рRSET, рЕТ, и рBAD, а промоторы, используемые для прокариотических векторов экспрессии, включают один или более из lac, trc, trp, гесА, или ага-BAD, но не ограничиваясь перечисленными. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) для экспрессии в дрожжах - такие векторы, как рАО, рPIC, рYES, или рMET, но не ограничиваясь ими, с использованием таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, или AUG1, но не ограничиваясь ими; (ii) для экспрессии в клетках насекомых - такие векторы, как рMT, рAc5, рIB, рMIB, или рBAC, но не ограничиваясь ими, с использованием таких промоторов, как PH, р10, MT, Ac5, OpIE2, gr64, или polh, но не ограничиваясь ими, и (iii) для экспрессии в клетках млекопитающих - такие векторы, как рSVL, рCMV, рRc/RSV, рсDNA3, или рBPV, но не ограничиваясь ими, а также векторы, в одном случае, полученные из таких вирусных систем, как вирус осповакцины, аденосателлитные вирусы, вирусы герпеса, или ретровирусы, с использованием таких промоторов, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, и β-актин, но не ограничиваясь ими.

#### D. Введение препарата.

В одном из воплощений, конъюгированный терапевтический белок согласно настоящему изобретению может вводиться путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, либо интраперитонеально.

Для введения композиций человеку или подопытным животным, содержащих конъюгированный терапевтический белок согласно данному изобретению, в их состав могут быть включены один и большее количество фармацевтически приемлемых носителей. Термины "фармацевтически" или "фармакологически приемлемые" относятся к молекулярным структурам и композициям, которые стабильны, ингибируют деградацию белка, например, агрегацию и разрезание, а также не вызывают аллергических реакций и иных нежелательных реакций при введении путями, известными в области техники, как описано ниже. К "фармацевтически приемлемым носителям" относятся все клинически пригодные растворители, диспергенты, пленки, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические растворы и средства для замедления абсорбции и т.д., включая средства, перечисленные выше.

Термин "эффективное количество" при использовании в этом документе обозначает дозу, пригодную для лечения заболевания или нарушения или ослабления симптома заболевания или нарушения. В одном воплощении термин "эффективное количество" обозначает дозу, пригодную для лечения млекопитающего, имеющего описанное здесь расстройство свертывания крови.

Композиции могут вводиться перорально, местно, чрескожно, парентерально, ингаляционным спреем, вагинально, ректально, либо интракраниальной инъекцией. Термин парентерально включает здесь подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные введения, а также инфузии. Введение может осуществляться способами внутривенных, внутривожных, внутримышечных, интрааммарных, интраперитонеальных, интратекальных, ретробульбарных, интрапульмонарных инъекций, а также способом хирургической имплантации в конкретный участок тела. Как правило, композиции не содержат пирогенов, а также иных примесей, которые могут быть опасны для реципиента.

Одно- и многократные введения композиций могут проводиться с уровнями дозировок и по схеме, выбранными лечащим врачом. Для профилактики или лечения болезни, приемлемый уровень дозировки будет зависеть от типа болезни, подлежащей лечению, как описано выше, тяжести и течения болезни, целей применения препарата: профилактических или терапевтических, предшествующей терапии, анамнеза больного и реакции на препарат, а также от индивидуальных суждений лечащего врача.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество конъюгированного терапевтического белка, как описано здесь. Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель, растворитель, соли, буферы или вспомогательные добавки.

Фармацевтическая композиция может использоваться для лечения указанных выше расстройств свертывания крови. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может являться раствором или лиофилизатом. Растворы фармацевтической композиции могут подвергаться любым подходящим лиофилизационным процессам.

Дополнительно, изобретение включает наборы, содержащие композицию согласно изобретению, упакованную таким способом, чтобы облегчить ее введение субъектам. В одном воплощении, в такой набор включено соединение или композиция, описанная здесь (например, композиция, содержащая конъюгированный терапевтический белок), упакованные в контейнер, например, запечатанный флакон или бутыл, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или прилагаемой к упаковке, в которой описано

практическое использование соединения или композиции. В одном воплощении, набор содержит два контейнера, в первом из которых находится композиция, содержащая конъюгированный терапевтический белок, а во втором - физиологически приемлемый раствор для восстановления раствора композиции в первом флаконе. В одном случае соединение или композиция могут быть упакованы в форму, позволяющую дозировать. Набор может дополнительно включать приспособление, предназначенное для введения композиции согласно специфическому способу введения. Предпочтительно, чтобы набор содержал этикетку, в которой описано использование терапевтического белка или пептидной композиции.

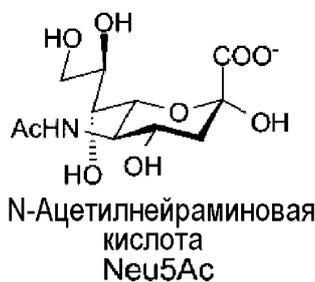
**Водорастворимые полимеры.**

В одном случае, молекула производного терапевтического белка (т.е. конъюгированный терапевтический белок) связана с водорастворимым полимером, включая, полиэтиленгликоль (ПЭГ), разветвленный ПЭГ, полисиаловую кислоту (ПСК), гидроксиалкилкрахмал (ГАК), гидроксилэтилкрахмал (ГЭК), углеводы, полисахариды, пуллулан, хитозан, гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфат, дерматансульфат, крахмал, декстран, карбоксиметил-декстран, полиалкиленоксид (ПАО), полиалкиленгликоль (ПАГ), полипропиленгликоль (ППГ), полиоксазолин, полиакрилоилморфолин, поливинилловый спирт (ПВС), поликарбосилат, поливинилпирролидон, полифосфазен, полиоксазолин, сополимер полиэтилена с малеиновым ангидридом, сополимер полистирола с малеиновым ангидридом, поли(1-гидроксиэтилэтилен гидроксиметилформаль) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфат (МФС), но не ограничиваясь ими. В одном воплощении изобретения, водорастворимый полимер состоит из молекулы сиаловой кислоты, имеющей молекулярный вес, находящийся в пределах 350-120000, 500-100000, 1000-80000, 1500-60000, 2000-45000 Да, 3000-35000 Да, и 5000-25000 Да. Связывание водорастворимого полимера может выполняться путем прямого связывания с белком либо через молекулы сшивающих агентов. Один пример химического сшивающего агента -МВРН (4-[4-N-малеимидофенил]масляной кислоты гидразид), содержащий карбогидрат-селективную гидразидную и сульфгидрил-реактивную малеимидную группы (Chamow et al., J Biol Chem 1992; 267:15916-22). Иные примерные и предпочтительные сшивающие агенты приведены ниже.

В одном воплощении, производное сохраняет полную функциональную активность нативного терапевтического продукта белка, а также обеспечивает увеличенный период полужизни *in vivo* в сравнении с нативными терапевтическими продуктами белков. В другом воплощении, производное сохраняет по меньшей мере 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, или 150% от биологической активности нативного белка свертывания крови. В связанном случае, биологическая активность производного и нативного белков свертывания крови определяется отношениями хромогенной активности антигенов к факторам свертывания крови (фактор свертывания крови: Chr: фактор свертывания крови: Ag). В ином воплощении изобретения, период полужизни конструкции уменьшен или увеличен в 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 раз в сравнении с периодом полужизни нативного терапевтического белка *in vivo*.

**А. Сиаловая кислота и ПСК.**

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



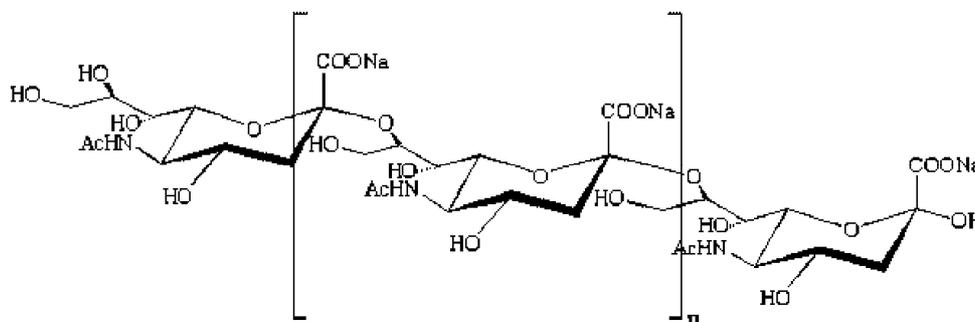
Структура сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты) ПСК и мПСК, как правило, включают линейные полимеры, состоящие, в основном, из фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты, соединенных 2,8- или 2,9-гликозидными связями или их комбинациями (например, чередующимися 2,8- и 2,9-связями). Особенно предпочтительны ПСК и мПСК с  $\alpha$ -2,8 гликозидными связями. Подобные ПСК и мПСК, как правило, получают из коломиновых кислот и обозначаются здесь как "КК" и "МКК". Типичные ПСК и мПСК включают по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 5, более предпочтительно по меньшей мере 10 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 20 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. Таким образом, в них может содержаться от 2 до 300 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты, предпочтительно, от 5 до 200 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты, или, наиболее предпочтительно, от 10 до 100 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. Предпоч-

тительно, чтобы ПСК и КК существенным образом не содержали иных углеводных остатков, кроме как остатков N-ацетилнейраминовой кислоты. Таким образом, ПСК и КК, предпочтительно, содержат по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты.

Если ПСК и КК содержат фрагменты, отличные от N-ацетилнейраминовой кислоты (как, например, в мПСК и мКК), то предпочтительно, чтобы они располагались на одном или обоих концах полимерной цепи. Подобные "отличные" фрагменты, например, могут быть фрагментами, полученными из терминальных фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты окислением или восстановлением.

Например, в WO-A-0187922 описаны подобные мПСК и мКК, у которых невосстанавливающая терминальная единица N-ацетилнейраминовой кислоты превращена в ацетильную группу взаимодействием с натрия периодатом. Помимо этого, в WO 2005/016974 описаны ПСК и КК, в которых восстанавливающая терминальная единица N-ацетилнейраминовой кислоты подвергается восстановлению с восстановительным разрывом кольца восстановительной терминальной единицы N-ацетилнейраминовой кислоты с образованием вицинальной диольной группы, после чего ее окисляют с превращением вицинальной диольной группы в альдегидную группу.

Гликопротеины, богатые сиаловой кислотой, связывают селектин у человека и других организмов. Они играют важную роль при инфекциях гриппа у человека. Так, например, сиаловая кислота может скрывать от манноза-связывающего лектина маннозные антигены на поверхности клеток-хозяев или бактерий. Вследствие этого не происходит активации комплемента. Сиаловые кислоты, также, скрывают предпоследние остатки галактозы, предотвращая быстрый клиренс гликопротеина галактозным рецептором клеток паренхимы печени.



Структура коломиновой кислоты (гомополимера N-ацетилнейраминовой кислоты).

Коломиновые кислоты (подкласс ПСК) являются гомополимерами N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA) с  $\alpha(2\rightarrow8)$  кетозидной связью и производятся, среди прочего, определенными штаммами *Escherichia coli*, несущими антиген K1. Коломиновые кислоты выполняют множество физиологических функций. Они - важное сырье для лекарственных и косметических препаратов.

Сравнительные исследования *in vivo* с полисиалированной и немодифицированной аспарагиназой показали, что полисиалирование повышает период полужизни фермента (Fernandes and Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* 1341: 26-34, 1997).

Термин "фрагменты сиаловых кислот", используемый в этом документе, включает мономеры или полимеры сиаловой кислоты ("полисахариды"), которые растворимы в водном растворе или суспензии и не имеют отрицательных эффектов (либо имеют незначительные), например, побочных эффектов, у млекопитающих при введении конъюгатов ПСК с белками системы свертывания крови в фармацевтически эффективных количествах. Полимеры могут состоять, в одном случае, из 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, или 500 единиц сиаловой кислоты. В ряде случаев различные единицы сиаловой кислоты объединяются в цепочки.

В одном из воплощений изобретения, фрагмент полисахаридного соединения, состоящий из сиаловой кислоты, очень гидрофилен, в ином воплощении все соединение очень гидрофильно. Гидрофильность в первую очередь обусловлена боковыми карбоксильными группами сиаловой кислоты, а также гидроксильными группами. Сахаридная единица может содержать и иные функциональные группы, например, аминогруппу, гидроксильную или сульфатную группу, а также их комбинации. Эти группы могут присутствовать в природных сахаридных соединениях, либо могут быть введены в получаемые полисахаридные соединения.

Природный полимер ПСК доступен в виде полидисперсного препарата с большим разбросом размеров (например, Sigma C-5762) и высокой полидисперсностью (ПД). Поскольку полисахариды, как правило, получают из бактерий, имеется риск попадания эндотоксинов в продукт при его очистке, а при выделении длинноцепочечных полимеров сиаловой кислоты вероятность повышения содержания эндотоксинов повышается. Короткие молекулы ПСК, содержащие 1-4 остатка сиаловой кислоты также могут быть приготовлены синтетически (Kang S.H. et al., *Chem Commun.* 2000; 227-8; Ress D.K. and Linhardt R.J., *Current Organic Synthesis.* 2004; 1:31-46), что минимизирует риск высокого содержания эндотоксинов. Тем не менее, препараты ПСК с узким распределением размеров и низкой полидисперсностью, а

также свободные от эндотоксинов, могут быть приготовлены в настоящее время. В одном случае в изобретении могут использоваться полисахаридные компоненты, полученные из бактерий. Некоторые из этих природных полисахаридов известны под видом гликолипидов. В одном из воплощений изобретения, полисахаридные соединения практически полностью освобождены от терминальных единиц галактозы.

В. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) и пегилирование.

В качестве особенности изобретения, терапевтические белки конъюгированы с водорастворимым полимером каким-либо из множества химических способов (Roberts J.M. et al., *Advan Drug Delivery Rev* 2002; 54:459-76). Например, в одном воплощении терапевтический белок модифицирован конъюгацией ПЭГ со свободными аминогруппами белка с использованием N-гидроксисукцинимидных (NHS) сложных эфиров. В ином воплощении водорастворимый полимер, например, ПЭГ, соединен со свободными SH-группами малеимидным способом или связыванием гидразидов ПЭГ или аминов ПЭГ с углеводными фрагментами терапевтического белка после предварительного окисления.

В качестве особенности изобретения, конъюгация осуществляется путем прямого связывания (или связывания посредством сшивающих агентов) водорастворимого полимера с терапевтическим белком с образованием стабильных связей. В определенных случаях изобретения могут использоваться разрушаемые, легкоразрушаемые или гидролизуемые системы сшивания

(Tsubery et al. *J Biol Chem* 2004;279:38118-24/Greenwald et al., *J Med Chem* 1999;42:3657-67/Zhao et al., *Bioconj Chem* 2006;17:341-51/WO2006/138572A2/US7259224B2/US7060259B2).

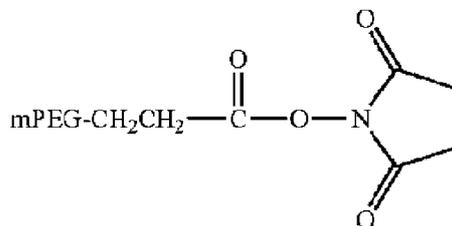
В одном воплощении изобретения, терапевтический белок модифицирован в остатках лизина производными полиэтиленгликоля, содержащими активный N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (NHS), например, сукцинат сукцинимидила, глутарат сукцинимидила или пропионат сукцинимидила. Эти производные реагируют с остатками лизина терапевтического белка в мягких условиях, образуя стабильную амидную связь. В одном воплощении изобретения, длина цепи производного ПЭГ равна 5000 Да. В иных воплощениях могут использоваться другие производные ПЭГ с длиной цепи от 500 до 2000 Да, от 2000 до 5000 Да, более 5000 вплоть до 10000 Да, или более 10000 вплоть до 20000 Да, более 20000 вплоть до 150000 Да, включая линейные и разветвленные структуры.

Среди альтернативных способов пегилирования аминогрупп, но не ограничиваясь перечисленными, можно назвать химическое конъюгирование с карбонатами ПЭГ с образованием уретановых связей, или взаимодействие с альдегидами или кетонами при восстановительном аминировании с образованием вторичных амидных связей.

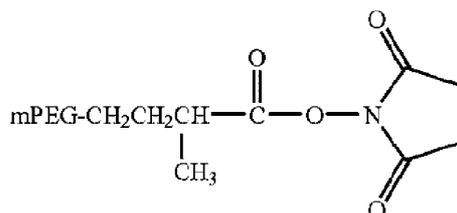
В одном воплощении данного изобретения, молекула терапевтического белка химически модифицирована производными ПЭГ, доступными в продаже. Эти производные ПЭГ в альтернативных вариантах могут иметь линейные или разветвленные структуры. Примеры производных ПЭГ, содержащих группы NHS приведены ниже.

Следующие производные ПЭГ - неисчерпывающий перечень продуктов, коммерчески доступных у Nektar Therapeutics (Хантсвилль, Алабама; см. [www.nektar.com/](http://www.nektar.com/) каталог реагентов ПЭГ; Nektar Advanced PEGylation, прайс-лист 2005-2006).

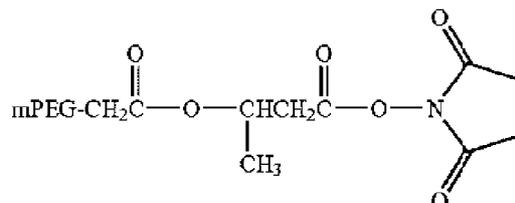
мПЭГ-сукцинимидилпропионат (mPEG-SPA)



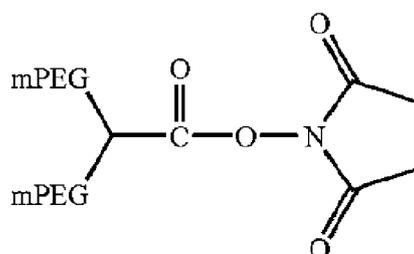
мПЭГ-сукцинимидил-α-метилбутаноат (mPEG-SMB)



mPEG-CM-HBA-NHS (CM=карбоксиметил; HBA=гидроксимасляная кислота)



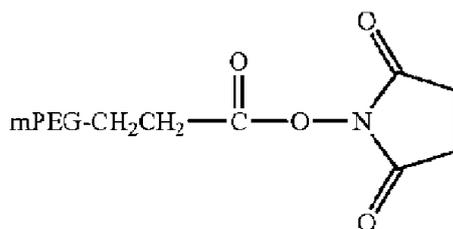
Структура разветвленных производных ПЭГ (Nektar Therapeutics).  
Разветвленный N-гидроксисукцинимид ПЭГ (mPEG2-NHS)



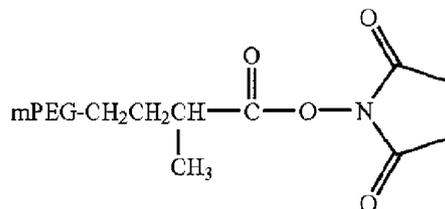
Этот реагент с разветвленной структурой описан более подробно в работе Kozlowski et al. (BioDrugs 2001; 5:419-29).

Еще один неисчерпывающий перечень производных ПЭГ, доступных в продаже у NOF Corporation (Токио, Япония; см. [www.nof.co.jp/english](http://www.nof.co.jp/english); каталог 2005)

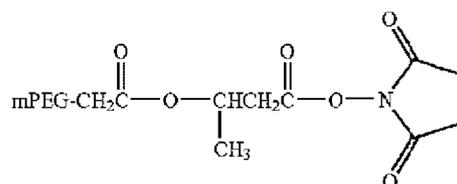
Общая структура линейных производных ПЭГ (NOF Corp.):



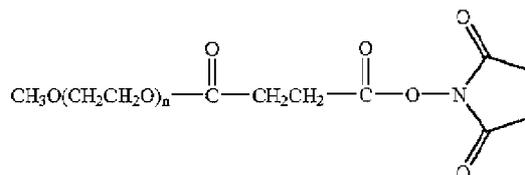
X=карбоксиметил



X=карбокшипентил

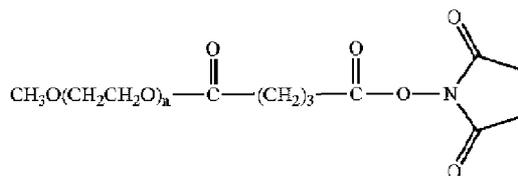


x=сукцинат



mПЭГ Сукцинимидил сукцинат

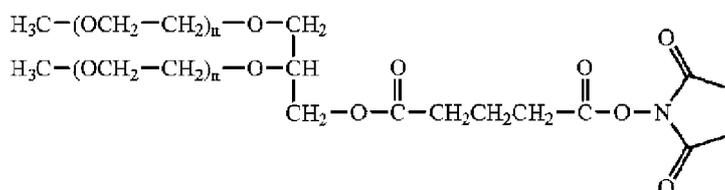
x=глутарат



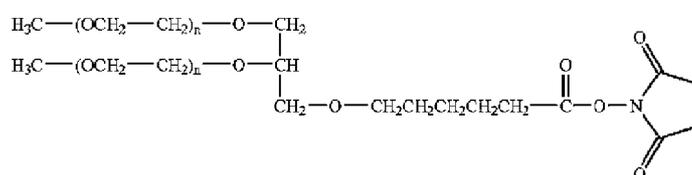
mПЭГ Сукцинимидил глутарат

Структуры разветвленных производных ПЭГ (NOF Corp.).

2,3-бис-(Метилполиоксиэтилен-окси)-1-(1,5-диоксо-5-сукцинимидилокси, пентилокси)пропан



2,3-бис-(Метилполиоксиэтилен-окси)-1-(сукцинимидил карбоксипентилокси)пропан



Данные производные пропана обладают скелетом глицерина с 1,2-замещением. В данном изобретении также могут применяться разветвленные производные ПЭГ на основе структуры глицерина с 1,3-замещением или иные разветвленные структуры, описанные в US2003/0143596A1.

Также могут использоваться производные ПЭГ с легко разрываемыми связями (например, с гидролизруемыми шивками), как описано Tsubery et al. (J Biol Chem 2004;279:38118-24) и Shechter et al. (WO04089280A3).

Как ни удивительно, пегилированный терапевтический белок согласно данному изобретению, обладает функциональной активностью в комбинации с продленным периодом полужизни *in vivo*. Вдобавок, пегилированные рФ VIII, Ф VIIa, Ф IX и иные факторы свертывания крови, видимо, более резистентны к инактивации тромбином.

С. Гидроксиалкилкрахмал (ГАК) и гидроксилэтилкрахмал (ГЭК).

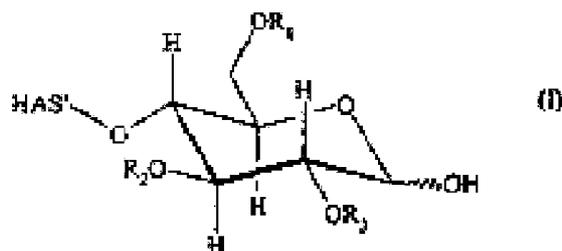
В различных воплощениях настоящего изобретения молекула терапевтического белка химически модифицирована с использованием гидроксиалкилкрахмала (ГАК) или гидроксилэтилкрахмала (ГЭК) или их производных.

ГЭК является производным природного амилопектина и расщепляется в организме альфа-амилазой. ГЭК является замещенным производным углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации вплоть до 95% по массе. ГЭК обладает выгодными биологическими характеристиками и используется в качестве средства для возмещения объема циркулирующей крови и в гемодилюционной терапии в клиниках (Sommermeier et al., 1987, Krankenhauspharmazie, 8 (8), 271-278; и Weidler et al., 1991, Arzneim.-Forschung/Drug Res. g 419, 494-498).

Амилопектин состоит из фрагментов глюкозы, причем в главной цепи присутствуют альфа-1,4-гликозидные связи, а в местах разветвления присутствуют альфа-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы, в основном, определяются типом гликозидных связей. Благодаря альфа-1,4-гликозидной связи, получаются спиральные структуры, содержащие приблизительно шесть мономеров глюкозы на оборот. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера могут быть модифицированы замещением. Гидроксильная группа может быть внедрена щелочным гидроксиэтированием. При адаптации условий реакции возможно добиться различной реакционной способности соответствующей гидроксильной группы незамещенного мономера глюкозы в сравнении с гидроксиэтированием. Благодаря этому факту, специалист может осуществить замещение в желаемой степени.

ГАК обозначает производное крахмала, в котором замещена по меньшей мере одна гидроксиалкильная группа. Таким образом, термин гидроксиалкилкрахмал не ограничивается соединениями, в которых терминальный углеводный фрагмент содержит гидроксиалкильные группы R1, R2, и/или R3, но, также, относится к соединениям, у которых где-либо присутствует по меньшей мере одна гидроксильная группа в терминальном углеводном фрагменте и /или в оставшейся части молекулы крахмала, ГАК', замеще-

на гидроксиалкильной группой R1, R2 или R3.



Алкильная группа может быть линейной или разветвленной алкильной группой, которая тоже может быть замещена нужным образом. Предпочтительно, чтобы в гидроксиалкильной группе содержалось 1-10 атомов углерода, более предпочтительно 1-6 атомов углерода, более предпочтительно 1-4 атомов углерода, еще более предпочтительно 2-4 атомов углерода.

"Гидроксиалкилкрахмал", таким образом, предпочтительно включает гидроксиэтилкрахмал, гидроксипропилкрахмал и гидроксibuтилкрахмал, причем особенно предпочтительны гидроксиэтилкрахмал и гидроксипропилкрахмал.

Гидроксиалкилкрахмал, который содержит две или более различных гидроксиалкильных групп, также охватывается настоящим изобретением. По меньшей мере, одна из гидроксиалкильных групп, содержащихся в ГАК, может содержать две или более гидроксильных групп. В соответствии с одним воплощением по меньшей мере одна из гидроксиалкильных групп, находящихся в ГАК, содержит одну гидроксигруппу.

Термин ГАК, также, включает производные, в которых алкильная группа моно- или полизамещена. В одном воплощении алкильная группа замещена галогеном, в частности, фтором, либо арильной группой, так, чтобы ГАК оставался растворимым в воде. Помимо этого, терминальная гидроксигруппа гидроксиалкильной группы может входить в состав сложного или простого эфира. Производные ГАК описаны в WO/2004/024776, который включен в эту заявку во всей полноте посредством ссылки.

#### D. Способы присоединения.

Терапевтический белок может быть ковалентно связан с полисахаридными соединениями различными способами, известными специалистам в этой области техники. В качестве особенности изобретения, фрагменты сиаловой кислоты связаны с терапевтическим белком, например, Ф IX, Ф VIII, Ф VIIa или ФVf, например, по способу, описанному в патенте US No. 4356170, который включен в данную заявку по ссылке.

В рамках изобретения также предполагается возможность использования иных известных способов связывания ПСК с полипептидами. Например, в публикации US No. 2007/0282096 описано конъюгирование amino- или гидразидных производных, например, ПСК, с белками. Помимо этого, в публикации US No. 2007/0191597 описаны производные ПСК, содержащие альдегидную группу, взаимодействующую с субстратами (например, белками) на их восстанавливающем конце. Эти публикации включены по ссылке во всей полноте.

Различные способы приведены в колонке 7, строке 15, колонке 8, строке 5 патента U.S. No. 5846951 (включен по ссылке во всей полноте). Среди примеров способов можно назвать связывание посредством образования пептидной связи между карбоксильной группой того или иного белка свертывания крови или полисахарида и аминогруппой белка свертывания крови или полисахарида, либо сложноэфирной связи между карбоксильной группой белка свертывания крови или полисахарида и гидроксильной группой терапевтического белка или полисахарида. Другой пример ковалентного связывания терапевтического белка с полисахаридным соединением - через основание Шиффа, т.е. путем взаимодействия свободной аминогруппы белка свертывания крови с альдегидной группой, формируемой на невосстанавливаемом конце полисахарида при периодатном окислении (Jennings H.J. and Lugowski C., J Immunol. 1981; 127:1011-8; Fernandes A.I. and Gregoriadis G., Biochim Biophys Acta. 1997; 1341; 26-34). В одном случае образовавшееся основание Шиффа стабилизируется путем специфического восстановления при помощи NaCNBH<sub>3</sub> с образованием вторичного амина. Альтернативный подход - формирование терминальных свободных аминогрупп в ПСК путем восстановительного аминирования с NH<sub>4</sub>Cl после предварительного окисления. Для связывания двух amino- или двух гидроксильных групп могут быть использованы бифункциональные реагенты. Например, ПСК, содержащая аминогруппу может быть связана с аминогруппой белка при помощи реагентов типа BS3 (бис-(сульфосукцинимидил)суберат/Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Помимо этого, например, для связывания amino- и тиоловых групп могут использоваться гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие реагенты по типу Sulfo-EMCS (N-ε-малеимидокапроилокси)сульфосукцинимидный сложный эфир/Pierce).

По иному способу, готовят гидразид ПСК и связывают его с углеводными фрагментами белка после предварительного окисления с формированием альдегидных групп.

Как описано выше, свободная аминогруппа терапевтического протеина реагирует с 1-карбоксильной группой остатка сиаловой кислоты с образованием пептидной связи или сложноэфир-

ная связь образуется между 1-карбоксильной группой кислоты и гидроксильной или иной подходящей активной группой белка свертывания крови. В качестве варианта, карбоксильная группа может образовывать пептидную связь с деацетилированной 5-аминогруппой или альдегидная группа молекулы терапевтического белка может образовывать основание Шиффа с N-деацетилированной 5-аминогруппой остатка сиаловой кислоты.

Альтернативно, полисахаридное соединение связано нековалентно с терапевтическим белком. Например, полисахаридное соединение и фармацевтически активное соединение в одном случае соединяются в одно целое посредством гидрофобных взаимодействий. Иные нековалентные способы связи включают электростатические взаимодействия, при которых противоположно заряженные ионы притягиваются друг к другу.

В различных воплощениях, терапевтический белок связан или ассоциирован с полисахаридным соединением в стехиометрических отношениях (например, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10, и т.д.). В различных воплощениях, 1-6, 7-12 или 13-20 полисахаридов связаны с белком свертывания крови. В иных воплощениях, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и более полисахаридов связаны с белком свертывания крови.

В различных воплощениях, терапевтический белок модифицирован, то есть, в него внедрены сайты гликозилирования (т.е. сайты, отличные от нативных сайтов гликозилирования). Такая модификация может быть выполнена стандартными способами молекулярной биологии, известными в данной области техники. Более того, терапевтический белок перед конъюгированием с водорастворимым полимером может быть гликозилирован *in vivo* или *in vitro*. Эти гликозилированные сайты могут служить мишенями для конъюгации белков с водорастворимыми полимерами (заявка на патент US No. 20090028822, заявка на патент US No. 2009/0093399, заявка на патент US No. 2009/0081188, заявка на патент US No. 2007/0254836, заявка на патент US No. 2006/0111279, а также DeFrees S. et al., *Glycobiology*, 2006, 16, 9, 833-43). Например, белок, который не гликозилирован в природе *in vivo* (например, белок, который не является гликопротеином), может быть модифицирован так, как описано выше.

#### Е. Аминоокси-связывание.

В одном воплощении изобретения, для приготовления конъюгатов белков системы свертывания крови используется взаимодействие гидроксилamina или гидроксилamиновых производных с альдегидами (например, с углеводными фрагментами, окисленными периодатом натрия) с образованием оксимной группы. Например, гликопротеин (например, терапевтический белок согласно данному изобретению) вначале окисляется окислителем типа периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ) (Rothfus J.A. et Smith E.L., *J Biol Chem* 1963, 238, 1402-10; и Van Lenten L. and Ashwell G., *J Biol Chem* 1971, 246, 1889-94). Периодатное окисление гликопротеинов основывается на классической реакции Малапрада, описанной в 1928 г., а именно на окислении вицинальных диолов периодатом с образованием активной альдегидной группы (Malaprade L., *Analytical application, Bull Soc Chim France*, 1928, 43, 683-96). Окислителями также могут дополнительно выступать тетраацетат свинца ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ), ацетат марганца ( $\text{MnO}(\text{Ac})_3$ ), ацетат кобальта ( $\text{Co}(\text{OAc})_2$ ), ацетат таллия ( $\text{TlOAc}$ ), сульфат церия ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) (US 4367309) или перрутнат калия ( $\text{KRuO}_4$ ) (Marko et al., *J Am Chem Soc* 1997, 119, 12661-2). Под "окислителем" подразумевается соединение, обладающее мягкими окислительными свойствами, позволяющими произвести окисление вицинальных диолов в углеводы и сформировать активные альдегидные группы при протекании реакции в физиологических условиях.

Второй этап - связывание полимера, содержащего аминооксигруппы, с окисленными углеводными фрагментами с образованием оксимной связи. В одном воплощении изобретения, этот этап может проводиться в присутствии каталитических количеств нуклеофильного катализатора анилина или его производных (Dirksen A. et Dawson P.E., *Bioconjugate Chem.* 2008; Zeng Y. et al., *Nature Methods* 2009; 6:207-9). Анилиновый катализ существенно ускоряет образование оксимных связей, что позволяет использовать очень малые концентрации реагентов. В другом воплощении данного изобретения оксимная связь стабилизируется восстановлением  $\text{NaCNBH}_3$  с образованием алкоксиаминовой связи (фиг. 2). Дополнительные катализаторы описаны ниже.

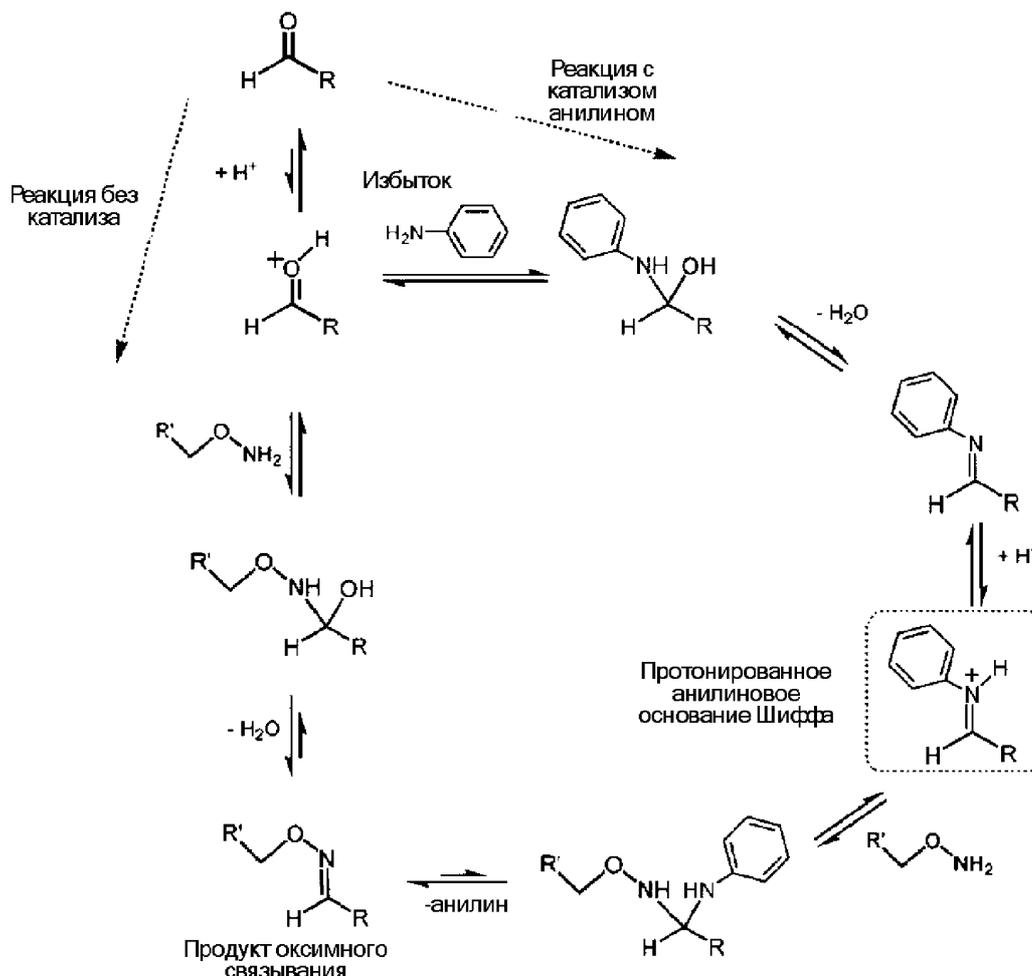
Дополнительные сведения по технологии аминоокси-связывания приведены в следующих источниках, каждый из которых включен в своей полноте: EP 1681303A1 (эритропозтин, связанный с гидроксилалкилкрахмалом); WO 2005/014024 (конъюгаты полимера и белка, связанные оксимной группой); WO 96/40662 (сшивающие агенты, содержащие аминооксигруппы и их применение для изготовления конъюгатов); WO 2008/025856 (модифицированные протеины); Peri F. et al., *Tetrahedron* 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J. et. Pozsgay V., *J Org Chem* 2005, 70, 6887-90; Lees A. et al., *Vaccine* 2006, 24(6), 716-29; и Heredia K.L. et al., *Macromolecules* 2007, 40(14), 4772-9.

В различных воплощениях изобретения, водорастворимый полимер, соединенный согласно аминоокси-технологии, описанной здесь, с окисленными углеводными фрагментами терапевтического белка (например, Ф VIII, Ф VIIa, или Ф IX), включает, например, но не ограничиваясь перечисленными примерами, полиэтиленгликолем (ПЭГ), разветвленным ПЭГ, полисиаловой кислоты (ПСК), углеводами, полисахаридами, пуллуланом, хитозаном, гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатом, дерматансульфатом, крахмалом, декстраном, карбоксиметил-декстраном, полиалкиленоксидом (ПАО), полиалкиленгликолем (ПАГ), полипропиленгликолем (ППГ), полиоксазолином, полиакрилоилморфолином, поливинило-

вым спиртом (ПВС), поликарбонатом, поливинилпирролидоном, полифосфазеном, полиоксазолином, сополимером полиэтилена с малеиновым ангидридом, сополимером полистирола с малеиновым ангидридом, поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформалем) (ПГФ), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфатом (МФС).

Нуклеофильные катализаторы.

Как описано здесь, конъюгирование водорастворимых полимеров с терапевтическими белками может быть катализировано анилином. Анилин выраженно катализирует реакции в воде альдегидов и кетон с аминами с образованием стабильных иминов, таких как гидразоны и оксимы. На диаграмме ниже сравниваются некатализируемая и анилин-катализируемая реакция оксимного связывания (Kohler J.J., ChemBioChem 2009; 10:2147-50).



Однако, в связи с тем, что анилин вреден для здоровья, желательны другие катализаторы. В настоящем изобретении в качестве альтернативных катализаторов оксимного связывания предлагаются анилиновые производные. Подобные анилиновые производные включают, но не ограничиваясь перечисленным, о-аминобензойную кислоту, м-аминобензойную кислоту, п-аминобензойную кислоту, сульфаниловую кислоту, о-аминобензамид, о-толуидин, м-толуидин, п-толуидин, о-анизидин, м-анизидин и п-анизидин.

В одном воплощении изобретения для катализа реакций конъюгации, описанных здесь, используется м-толуидин (также называемый мета-толуидином, м-метиланилином, 3-метиланилином или 3-амино-1-метилбензолом). М-толуидин и анилин обладают сходными физическими свойствами и практически одинаковой величиной рКа (м-толуидин: рКа 4,73, анилин: рКа 4,63).

Нуклеофильные катализаторы по изобретению пригодны для оксимного связывания (например, с использованием аминокси-связывания) или образования гидразонов (например, по гидразидной химии). В различных воплощениях изобретения нуклеофильный катализатор вводится в реакцию конъюгации в концентрации 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мМ. В одном воплощении нуклеофильный катализатор вводится в концентрации 1-10 мМ. В различных воплощениях изобретения интервал рН реакции конъюгации равен 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 и 7,5. В одном воплощении рН лежит в пределах 5,5-6,5.

Очистка конъюгированных белков.

В различных воплощениях желательна очистка белка, который был инкубирован с окислителем

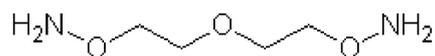
и/или терапевтического белка, который был конъюгирован с водорастворимым полимером согласно данному раскрытию. В области техники известно множество способов очистки, включая, без ограничений, хроматографические способы, такие как ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, эксклюзионная хроматография и аффинная хроматография или их комбинации, способы фильтрования и способы осаждения (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology Vol 463 (edited by Burgess R.R. and Deutscher MP), 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press 2009).

Следующие примеры не исчерпывающи, но приведены лишь в качестве приблизительных способов воплощения изобретения.

### Примеры

Пример 1. Приготовление гомобифункционального сшивающего агента  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$ .

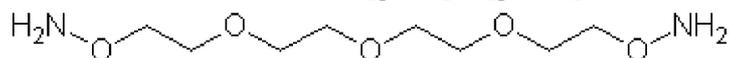
Гомобифункциональный сшивающий агент  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$



(3-Оксопентан-1,5-диоксиамин), содержащий две активные аминоксигруппы, был синтезирован согласно Botyryn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) по двухэтапной органической реакции, включающей модифицированную реакцию Габриэля для синтеза первичных аминов (фиг. 3). На первом этапе одна молекула 2,2-хлордиэтилового эфира взаимодействовала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в диметилформамиде (ДМФ). Целевой гомобифункциональный продукт приготавливали из полученного интермедиата путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 2. Приготовление гомобифункционального сшивающего агента  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$ .

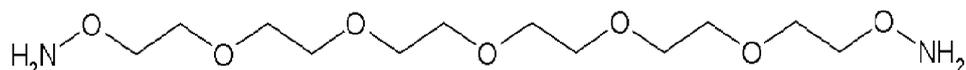
Гомобифункциональный сшивающий агент  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$



(3,6,9-Триоксоундекан-1,11-диоксиамин), содержащий две активные аминоксигруппы, был синтезирован согласно Botyryn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) по двухэтапной органической реакции, включающей модифицированную реакцию Габриэля для синтеза первичных аминов (фиг. 3). На первом этапе одна молекула бис-(2-(2-хлорэтокс)-этилового) эфира взаимодействовала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в диметилформамиде (ДМФ). Целевой гомобифункциональный продукт приготавливали из полученного интермедиата путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 3. Приготовление гомобифункционального сшивающего агента  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$ .

Гомобифункциональный сшивающий агент  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$



(3,6,9,12,15-Пентаоксопентадекан-1,17-диоксиамин), содержащий две активные аминоксигруппы, был синтезирован согласно Botyryn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) по двухэтапной органической реакции, включающей модифицированную реакцию Габриэля для синтеза первичных аминов. На первом этапе одна молекула гексаэтиленгликоля дихлорида взаимодействовала с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в диметилформамиде (ДМФ). Целевой гомобифункциональный продукт приготавливали из полученного интермедиата путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 4. Детальный синтез реактива аминокси-ПСК.

3-Оксопентан-1,5-диоксиамин был синтезирован согласно Botyryn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) двухэтапным способом органического синтеза, описанным в примере 1.

Этап 1.

К раствору эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида (59,0 г; 1,00 экв.) в 700 мл безводного N,N-диметилформамида добавили безводный  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (45,51 г; 1,00 экв.) и 2,2-дихлордиэтиловый эфир (15,84 мл; 0,41 экв.). Реакционную смесь перемешивали 22 ч при 50°C. Смесь была выпарена досуха под пониженным давлением. Остаток был суспендирован в 2 л дихлорметана и экстрагирован дважды насыщенным раствором NaCl в воде (каждый раз по 1 л). Дихлорметановый слой был высушен над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпарен досуха под пониженным давлением, высушен под высоким вакуумом. Было получено 64,5 г желтоватого порошка 3-оксопентан-1,5-диокси-эндо-2',3'-дикарбоксиддимиднорборнена (промежуточный продукт 1).

Этап 2.

К раствору промежуточного продукта 1 (64,25 г; 1,00 экв.) в 800 мл безводного этанола, добавили 31,0 мл гидразингидрата (4,26 экв.). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником 2 ч. Концентрация смеси была увеличена путем упаривания раствора до половины исходного объема под пониженным давлением. Выпавший осадок был отфильтрован. Оставшийся этаноловый слой был выпарен досуха под пониженным давлением. Остаток, содержащий сырой продукт 3-оксопентан-1,5-диоксиамина был высушен в вакууме, было получено 46,3 г продукта. Сырой продукт был далее очищен хроматографией на колонке (силикагель 60; изократическое элюирование смесью дихлорметан-метанол, 9/1), было

получено 11,7 г чистого конечного продукта 3-оксопентан-1,5-диоксиамина.

Пример 5. Приготовление аминокси-ПСК.

1000 мг окисленной ПСК (молекулярный вес 20 кДа), полученной из Института сывороток Индии (Пуна, Индия), были растворены в 16 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 6,0. Затем к реакционной смеси добавили 170 мг 3-оксопентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 2 ч при комнатной температуре, добавили 78,5 мг цианоборогидрида натрия, реакцию оставили на ночь на 18 ч. Затем реакционная смесь была подвергнута процедуре ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране из регенерированной целлюлозы (Millipore) с порогом фильтрации 5 кДа (50 см<sup>2</sup>, Millipore).

Пример 6. Приготовление аминокси-ПСК с использованием этапа хроматографической очистки.

1290 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной от Института сывороток Индии (Пуна, Индия), растворили в 25 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 6,0 (буфер А). Затем к реакционной смеси добавили 209 мг 3-оксопентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 1 ч при комнатной температуре, добавили 101 мг натрия цианоборогидрида, реакцию выдержали 3 ч. Затем смесь подвергли этапу слабой анионообменной хроматографии на хроматографическом геле Fractogel EMD DEAE 650-М (измерения колонки: XK26/135). Реакционную смесь разбавили 110 мл буфера А и загрузили в колонку DEAE, предварительно уравновешенную буфером А на скорости потока 1 см/мин. Затем колонку промывали 20 ОК буфера В (20 мМ Hepes, pH 6,0) для удаления свободного 3-оксопентан-1,5-диоксиамина и цианида на скорости потока 2 см/мин. Реагент аминокси-ПСК затем элюировали ступенчатым градиентом, состоящим из 67% буфера В и 43% буфера С (20 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Элюат концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны 5 кДа из полиэфирсульфона (50 см<sup>2</sup>, Millipore). Финальный этап диафильтрации проводили против буфера D (20 мМ Hepes, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследовали аналитически путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего содержания аминоксигрупп (анализ TNBS) для определения степени модифицирования. Помимо этого, определяли полидисперсность и содержание свободных 3-оксопентан-1,5-диоксиамина и цианида.

Пример 7. Приготовление аминокси-ПСК без этапа восстановления.

573 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной от Института сывороток Индии (Пуна, Индия), растворили в 11,3 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 6,0 (буфер А). Затем к реакционной смеси добавили 94 мг 3-оксопентан-1,5-диоксиамина. После встряхивания в течение 5 ч при комнатной температуре смесь подвергли этапу слабой анионообменной хроматографии на хроматографическом геле Fractogel EMD DEAE 650-М (измерения колонки: XK16/105). Реакционную смесь разбавили 50 мл буфера А и загрузили в колонку DEAE, предварительно уравновешенную буфером А на скорости потока 1 см/мин. Затем колонку промывали 20 ОК буфера В (20 мМ Hepes, pH 6,0) для удаления свободного 3-оксопентан-1,5-диоксиамина и цианида на скорости потока 2 см/мин. Реагент аминокси-ПСК затем элюировали ступенчатым градиентом, состоящим из 67% буфера В и 43% буфера С (20 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Элюат концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны 5 кДа из полиэфирсульфона (50 см<sup>2</sup>, Millipore). Финальный этап диафильтрации проводили против буфера D (20 мМ Hepes, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследовали аналитически путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего содержания аминоксигрупп (анализ TNBS) для определения степени модифицирования. Помимо этого, определяли полидисперсность и содержание свободных 3-оксопентан-1,5-диоксиамина.

Пример 8. Приготовление аминокси-ПСК без этапа восстановления в присутствии нуклеофильного катализатора м-толуидина.

573 мг окисленной ПСК (ММ=20 кДа), полученной от Института сывороток Индии (Пуна, Индия), растворяют в 9 мл 50 мМ фосфатного буфера с pH 6,0 (буфер А). Затем к этому раствору добавляют 94 мг 3-оксопентан-1,5-диоксиамина. После этого к этой реакционной смеси добавляют 2,3 мл 50 мМ базового раствора м-толуидина. После встряхивания в течение 2 ч при комнатной температуре смесь подвергают этапу слабой анионообменной хроматографии на хроматографическом геле Fractogel EMD DEAE 650-М (измерения колонки: XK16/105). Реакционную смесь разбавляют 50 мл буфера А и загрузили в колонку DEAE, предварительно уравновешенную буфером А на скорости потока 1 см/мин. Затем колонку промывают 20 ОК буфера В (20 мМ Hepes, pH 6,0) для удаления свободного 3-оксопентан-1,5-диоксиамина и цианида на скорости потока 2 см/мин. Реагент аминокси-ПСК затем элюируют ступенчатым градиентом, состоящим из 67% буфера В и 43% буфера С (20 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Элюат концентрируют ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны 5 кДа из полиэфирсульфона (50 см<sup>2</sup>, Millipore). Финальный этап диафильтрации проводят против буфера D (20 мМ Hepes, 90 мМ NaCl, pH 7,4). Препарат исследуют аналитически путем измерения общей ПСК (анализ с резорцином) и общего содержания аминоксигрупп (анализ TNBS) для определения степени модифицирования. Помимо этого, определяют полидисперсность и содержание свободного 3-оксопентан-1,5-диоксиамина.

Пример 9. Приготовление реагента аминокси-ПСК.

Реагент аминокси- ПСК изготавливался в соответствии с примерами 4-8. После диафильтрации продукт замораживали при -80°C и лиофилизировали. После лиофилизации реагент растворяли в нужном объеме воды и использовали для изготовления конъюгатов ПСК-белок посредством углеводного

модифицирования.

Пример 10. Оценивание эффективности различных альтернативных нуклеофильных катализаторов.

рф IX был инкубирован с натрия периодатом, реагентом аминокси-ПСК в стандартных условиях (1 мг/мл рф IX в 20 мМ L-гистидине, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,0, 5-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК, 100 мкМ NaIO<sub>4</sub>) с использованием различных нуклеофильных катализаторов (анилина, м-толуидина, о-анизида, м-анизида, о-аминобензойной кислоты, м-аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, п-аминобензамида, сульфаниловой кислоты/стандартная концентрация: 10 мМ). Реакцию проводили в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливали в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением водного раствора цистеина с конечной концентрацией 1 мМ.

Эффективность спаривания оценивалась способом SDS-PAGE с использованием системы Invitrogen X-cell mini. Образцы метились буфером лития додецилсульфата (LDS) и денатурировались 10 мин при 70°C. Затем образцы наносили на 3-8% гель TRIS-ацетат и снимали при 150 В в течение 60 мин. После этого гель прокрашивали Coomassie.

Образцы дополнительно характеризуют аналитически.

Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77).

50 мкл образцов инжескировали неразведенными и элюировали изократически 0,22 мкм фильтрованным раствором 20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,1 со скоростью потока 0,5 мл/мин. Схему элюирования снимали при 280 нм.

Результаты отражены на фиг. 5А-С и 6 (SDS PAGE) и в табл. 2 (результаты SEC- HPLC). Промонстрирован каталитический эффект различных препаратов. Показано, что при использовании м-толуидина достигаются такие же результаты, как и с анилином.

Таблица 2

нуклеофильные катализаторы	ди-ПСК-лированный рф IX	моно-ПСК-лированный рф IX	свободный рф IX
без катализаторов	4,5%	24,9%	70,6%
10 мМ анилин	47,7%	33,6%	18,7%
10 мМ м-толуидин	31,4%	40,8%	27,8%
10 мМ о-аминобензойная кислота	30,9%	38,5%	30,6%
10 мМ м-аминобензойная кислота	27,6%	38,0%	34,4%
10 мМ п-аминобензойная кислота	18,1%	39,3%	42,6%
10 мМ о-аминобензамид	15,9%	38,4%	45,7%
10 мМ сульфаниловая кислота	11,8%	35,8%	52,4%

Пример 11. Полисалирование рф IX с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

12,3 мг рф IX растворяли в 6,1 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавили 254 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 6,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (8,8 мл), содержащий окисленный рф IX смешивают с 2,46 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавили реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубировали 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Свободный рф IX удаляли при помощи анионообменной хроматографии (АЕС). Реакционную смесь

разбавили 15 мл буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюировали Буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Свободный рф IX элюируется при проводимости 12-25 мСм/см, а конъюгат - при 27-45 мСм/см. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимали до 190 мСм/см Буфером С (50 мМ Hepes, 5М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9; и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9). Свободный аминокси-ПСК реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера Е (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировались способом ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужном фильтраторе Vivaspin 15R 10 кДа. Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Препарат был аналитически исследован измерением общего содержания белка (Брэдфорд) и хромогенной активности Ф IX. Конъюгат ПСК-рф IX проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным рф IX.

#### Способ 2.

12,3 мг рф IX растворяют в L-гистидиновом буфере, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>) до конечной концентрации белка в 1 мг рф IX/мл. Добавляют 5 мМ водный раствор периодата натрия до конечной концентрации 100 мкМ и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании при pH 6,0, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина (или иного гасителя) до конечной концентрации 10 мМ. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Полученный ретентат (8,8 мл), содержащий окисленный рф IX смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) до конечной концентрации 10 мМ и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют при pH 6,0 в течение 2,5 ч при комнатной температуре; от 0,5 ч до 18 ч при +4°C) в темноте при осторожном перемешивании.

Свободный рф IX удаляют при помощи анионообменной хроматографии (АЕС). Реакционную смесь разбавляют достаточными количествами буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) для корректировки проводимости растворов и величины pH перед загрузкой в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Свободный рф IX элюировали ступенчатым градиентом с использованием 25% буфера В, что дало проводимость в пределах 12-25 мСм/см в полученной фракции, и конъюгат с использованием ступенчатого градиента 50% буфера В, что дало проводимость в пределах 27-45 мСм/см в конъюгатной фракции. Проводимость конъюгат-содержащей фракции затем поднимали до 190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9; или с использованием антихаотропических солей, таких, как аммония сульфат, аммония ацетат и т.д.) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут; или в аналогичную среду для гидрофобной хроматографии), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9). Свободный аминокси-ПСК реагент вымывают 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера Е (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводят против L-гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и хромогенной и коагулирующей активностей Ф IX. Конъюгат ПСК-рф IX проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным рф IX.

#### Способ 3.

25,4 мг рф IX растворяли в 18,7 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавили 531 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и 5,07 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Затем добавили реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 25 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Свободный рф IX удаляли при помощи анионообменной хроматографии (АЕС). Реакционную смесь разбавили 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюировали Буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Свободный рф IX элюировали при проводимости 12-25 мСм/см, а конъюгат - при 27-45 мСм/см. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимали до 190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9). Свободный

аминокси-ПСК реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 mM NaCl и 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Препарат был аналитически исследован измерением общего содержания белка (Брэдфорд) и хромогенной активности Ф IX. Конъюгат ПСК-рф IX проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным рф IX. Конъюгат дополнительно характеризовали аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Было показано, что в препарате не содержится свободного Ф IX. Конъюгат состоял из 57% моно-полисиалированного и 31% ди-полисиалированного и 12% три-полисиалированного продукта.

Способ 4.

25,4 мг рф IX растворяли в L-гистидиновом буфере, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) до конечной концентрации белка в 2 мг рф IX/мл. После этого в течение 15 мин добавляли 5 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 mM водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 mM в течение периода времени в 30 мин. Затем добавили реагент аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0, смесь инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 M водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 mM.

Свободный рф IX удаляли при помощи ионообменной хроматографии (ИЕ). Реакционную смесь разбавили достаточными количествами буфера A (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) для корректировки проводимости растворов и величины pH перед загрузкой в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером A. Затем колонку элюировали буфером B (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Свободный рф IX элюировали ступенчатым градиентом с использованием 25% буфера B, что дало проводимость в пределах 12-25 мСм/см в полученной фракции, и конъюгат с использованием ступенчатого градиента 50% буфера B, что дало проводимость в пределах 27-45 мСм/см в конъюгатной фракции. Проводимость конъюгат-содержащей фракции затем поднимали до 190 мСм/см буфером C (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9; с использованием антихаотропических солей, таких, как аммония ацетат) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут; или в аналогичную среду для гидрофобной хроматографии), предварительно уравновешенную буфером D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9). Свободный аминокси-ПСК реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против L-гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 mM NaCl и 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Препарат аналитически исследовали измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и хромогенной и коагулирующей активностей Ф IX. Конъюгат ПСК-рф IX проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным рф IX. Конъюгат дополнительно характеризовали аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Было показано, что в препарате не содержится свободного Ф IX. Конъюгат состоял из 57% моно-полисиалированного и 31% ди-полисиалированного и 12% три-полисиалированного продукта.

Пример 12. Полисиалирование рф VIII с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

50 мг рф VIII перенесли в реакционный буфер (50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавили NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводили при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию остановили цистеином (конечная концентрация: 10 mM) в течение 60 мин при комнатной температуре. Раствор пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером A (20 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонка была уравновешена 5 ОК буфера A. Затем окисленный рф VIII был элюирован Буфером B (20 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, pH 7,0). Были собраны фракции, содержащие рф VIII. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до pH 6,0 капельным добавлением 0,5 M HCl. Затем был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 mM). Реакция спаривания проводилась в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток реактива аминокси-ПСК удаляли при помощи гидрофобной хроматографии. Проводи-

мость реакционной смеси поднимали до 130 мСм/см добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 мМ аммония ацетата, pH 6,9) и загружали в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Нерес, 2,5 мМ аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюировали 50 мМ буфером Нерес с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирали фракции, содержащие ПСК-рФ VIII и подвергали ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на 30 кДа мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, Millipore). Препарат был аналитически исследован измерением общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и хромогенной активности Ф VIII. Конъюгат ПСК-рФ VIII проявлял удельную активность >70% в сравнении с нативным рФ VIII.

#### Способ 2.

58 мг рекомбинантного фактора VIII (рФ VIII), полученного при процессе ADVATE в буфере Нерес (50 мМ НЕРЕС, ~350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,1% Полисорбата 80, pH 7,4) растворяют в реакционном буфере (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный рФ VIII далее очищают анионообменной хроматографией на EMD TMAE (M) (Merck). Смесь разбавляют буфером А (20 мМ Нерес, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5) до получения проводимости 5 мсм/см. Полученный раствор загружают в ионообменную колонку (высота слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл с использованием скорости потока 1,5 см/мин. Колонку впоследствии промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (м/м) буфера А и буфера В (20 мМ Нерес, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Затем окисленный рФ VIII элюируют смесью 50:50 (м/м) буфера А и буфера В с постэлюировочным этапом в 5 ОК буфера В. Этапы элюирования проводят со скоростью потока 1,0 см/мин.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный рФ VIII в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПСК-рФ VIII очищают гидрофобной хроматографией (НС) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь добавляют аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Нерес, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 мМ аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в НС колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием >3 ОК уравновешивающего буфера (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 2,5 мМ аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с >5 ОК отмывочного буфера 1 (50 мМ Нерес, 3 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата ПСК-рФ VIII в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 мМ Нерес, 1,5 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 мМ Нерес, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПСК-рФ VIII отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат, собирают в пределах <4 ОК. Пост-элюировочный этап проводят с >3 ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало прореагировавшего и/или немодифицированного рФ VIII от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с отсечением молекулярной массы в 30 кДа (88 см<sup>2</sup>, Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывали путем измерения общего содержания белка, хромогенной активности Ф VIII и определяли степени полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином). Для полученного конъюгата были определены удельная активность > 50% и степень ПСК >5,0.

#### Способ 3.

50 мг рФ VIII перенесли в реакционный буфер (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Был добавлен 50-кратный

молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакция спаривания проводилась в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию остановили цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (конечная концентрация: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси поднимали до 130 мСм/см добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 мМ аммония ацетата, pH 6,9) и загружали в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 мМ аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюировали 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирали фракции, содержащие ПСК-рФ VIII и подвергали ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на 30 кДа мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, Millipore). Препарат был аналитически исследован измерением общего содержания белка (Брэдфорд) и хромогенной активности Ф VIII. Конъюгат ПСК-рФ VIII проявлял удельную активность  $\geq 70\%$  в сравнении с нативным рФ VIII.

#### Способ 4.

50 мг рекомбинантного фактора VIII (рФ VIII), полученного при процессе ADVATE в 50 мМ буфере Hepes (50 мМ HEPES, ~350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,1% Полисорбата 80, pH 7,4) растворяли в реакционном буфере (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляли к этому раствору рФ VIII в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляли водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец добавляли 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубировали  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливали добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ПСК-рФ VIII очищали гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь вносили аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Hepes, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 мМ аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивали с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводили до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора NaOH. Данную смесь загружали в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняли этап отмывания с использованием  $>3$  ОК уравновешивающего буфера (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 2,5 мМ аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняли второй этап отмывания с  $>5$  ОК отмывочного буфера 1 (50 мМ Hepes, 3 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняли элюирование очищенного конъюгата рФ VIII в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 мМ Hepes, 1,5 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПСК-рФ VIII отслеживали на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат, собирали в пределах  $<4$  ОК. Пост-элюировочный этап проводили с  $>3$  ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало прореагировавшего и/или немодифицированного рФ VIII от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрировали ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с отсечением молекулярной массы в 30 кДа (88 см<sup>2</sup>, Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывали путем измерения общего содержания белка, хромогенной активности Ф VIII и определяли степени полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Аналитические данные (среднее 6 последовательных серий):

выход процесса (Bradford): 58,9%

выход процесса (хром. Ф VIII): 46,4%

удельная активность: (хром. Ф VIII/мг белка): 4148 МЕ/мг

удельная активность (% исходного материала): 79,9%

степень ПСК (моль/моль): 8,1.

Пример 13. Пегилирование рФ VIII с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

рФ VIII пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 14,7 мг рФ VIII растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют 296 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (10,9 мл), содержащий окисленный рФ VIII смешивают с 2,94 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-рФ VIII очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4 содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны 30 кДа (50 см<sup>2</sup>, Millipore). Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и хромогенной активности Ф VIII. Ожидается, что конъюгат ПЭГ-рФ VIII будет обладать удельной активностью >70% относительно нативного рФ VIII.

Способ 2.

рФ VIII пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную массу или концентрацию рФ VIII растворяют или переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный рФ VIII далее очищают анионообменной хроматографией на EMD TMAE (M) (Merck). Смесь разбавляют буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5) до получения проводимости 5 мсм/см. Полученный раствор загружают в ионообменную колонку (высота слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл с использованием скорости потока 1,5 см/мин. Колонку впоследствии промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (м/м) буфера А и буфера В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,0 М NaCl, pH 7,0). Затем окисленный рФ VIII элюируют смесью 50:50 (м/м) буфера А и буфера В с постэлюировочным этапом в 5 ОК буфера В. Этапы элюирования проводят со скоростью потока 1,0 см/мин.

После этого реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный рФ VIII в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-рФ VIII очищают гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь вносят аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Hepes, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием >3 ОК уравновешивающего буфера (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 2,5 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с >5 ОК отмывочного буфера 1 (50 мМ Hepes, 3 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата рФ VIII в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 мМ Hepes, 1,5 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПЭГ-

рФ VIII отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат, собирают в пределах <4 ОК. Пост-элюировочный этап проводят с >3 ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало про-реагировавшего и/или немодифицированного рФ VIII от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с отсечением молекулярной массы в 30 кДа (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 3.

рФ VIII пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 7,84 мг рФ VIII, растворенного в 6 мл буфера Hepes (50 mM Hepes, 150 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) смешивают с 314 мкл водного раствора периодата натрия (10 mM) и 1,57 мл водного раствора м-толуидина (50 mM). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл 1 M водного раствора цистеина (1 M).

Наконец, конъюгат ПЭГ-рФ VIII очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 mM буфером Hepes, pH 7,4 содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 mM буфером Hepes, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub> и 500 mM натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны 30 кДа (88 см<sup>2</sup>, Millipore). Аналитическая характеристика конъюгата путем определения хромогенной активности Ф VIII и определения общего содержания белка (Брэдфорд) показала удельную активность в >60% в сравнении с исходным материалом рФ VIII.

#### Способ 4.

рФ VIII пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу рФ VIII переносят или растворяют в буфере Hepes (50 mM Hepes, 150 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг рФ VIII/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 mM водный раствор натрия периодата до конечной концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 mM водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 mM в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описанный выше) до достижения 20-кратного молярного избытка. После доведения pH до 6,0, смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 M водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 mM.

Свободный рФ VIII удаляют при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Реакционную смесь разбавили достаточными количествами буфера А (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) для корректировки проводимости растворов и величины pH перед загрузкой в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюировали буфером В (50 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Свободный рФ VIII элюировали ступенчатым градиентом с использованием 25% буфера В, что дало проводимость в пределах 12-25 мСм/см в полученной фракции, и конъюгат с использованием ступенчатого градиента 50% буфера В, что дало проводимость в пределах 27-45 мСм/см в конъюгатной фракции. Проводимость конъюгат-содержащей фракции затем поднимали буфером С (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9; с использованием антихаотропических солей, таких, как аммония ацетат, аммония сульфат и т.д.) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут; или в аналогичную среду для гидрофобной хроматографии), предварительно уравновешенную буфером D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9). Свободный ПЭГ-реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера E (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности по известным способам.

Пример 14. Полисалирование рФ VIIa с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Начальную концентрацию или массу рекомбинантного фактора VIIa (рФ VIIa) переносят или растворяют в реакционном буфере (50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до

конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 N водного раствора NaOH. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 50 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный рФ VIIa далее очищают анионообменной хроматографией на EMD TMAE (M) (Merck). Смесь разбавляют буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,5) до получения проводимости 5 мсм/см. Полученный раствор загружают в ионообменную колонку (высота слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл с использованием скорости потока 1,5 см/мин. Колонку впоследствии промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (м/м) буфера А и буфера В (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1,0 М NaCl, pH 7,0). Затем окисленный рФ VIIa элюируют смесью 50:50 (м/м) буфера А и буфера В с постэлюировочным этапом в 5 ОК буфера В. Этапы элюирования проводят со скоростью потока 1,0 см/мин.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный рФ VIIa в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПСК-рФ VIIa очищают гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь добавляют аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Hepes, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 N водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием  $>3$  ОК уравнивающего буфера (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 2,5 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с  $>5$  ОК отмывочного буфера 1 (50 мМ Hepes, 3 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата рФ VIIa в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 мМ Hepes, 1,5 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПСК-рФ VIIa отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат, собирают в пределах  $<4$  ОК. Пост-элюировочный этап проводят с  $>3$  ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало прореагировавшего и/или немодифицированного рФ VIIa от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/дифильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (например, 10 кДа MWCO, 88 см<sup>2</sup>, Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 2.

Начальную массу или концентрацию рФ VIIa растворяют или переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 N водного раствора NaOH.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору рФ VIIa в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 150 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ПСК-рФ VIIa очищают гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь вносят аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Hepes, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной

смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 N водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием >3 ОК уравнивающего буфера (50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 2,5 M аммония ацетата, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с >5 ОК отмывочного буфера 1 (50 mM Hepes, 3 M натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата рФ VIIa в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 mM Hepes, 1,5 M натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 mM Hepes, 5 mM кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПСК-рФ VIIa отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат собирали в пределах <4 ОК. Пост-элюировочный этап проводят с >3 ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало прореагировавшего и/или немодифицированного рФ VIII от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/диализацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 15. Пегилирование рФ IX с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

рФ IX пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную массу или концентрацию рФ IX растворяют или переносят в реакционный буфер (50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5 N водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 M) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 mM в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный рФ VIII далее очищают анионообменной хроматографией на EMD TMAE (M) (Merck). Смесь разбавляют буфером А (20 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Полученный раствор загружают в ионообменную колонку (высота слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл с использованием скорости потока 1,5 см/мин. Колонку впоследствии промывают (скорость потока: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (м/м) буфера А и буфера В (20 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,0 M NaCl, pH 7,0). Затем окисленный рФ IX элюируют смесью 50:50 (м/м) буфера А и буфера В с постэлюировочным этапом в 5 ОК буфера В. Этапы элюирования проводят со скоростью потока 1,0 см/мин.

После этого реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный рФ IX в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 mM) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 mM. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-рФ IX очищают гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (ОК) 81 мл.

В реакционную смесь вносят аммония ацетат добавлением 50 mM буфера Hepes, содержащего 350 mM натрия хлорида, 8 M аммония ацетата, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 N водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием >3 ОК уравнивающего буфера (50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 2,5 M аммония ацетата, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с >5 ОК отмывочного буфера 1 (50 mM Hepes, 3 M натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата рФ IX в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 mM Hepes, 1,5 M натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 mM Hepes, 5 mM кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПЭГ-рФ IX отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат собирают в пределах <4 ОК. Пост-

элюировочный этап проводят с >3 ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало про-реагировавшего и/или немодифицированного рФ IX от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с отсечением молекулярной массы в 10 кДа (88 см<sup>2</sup>, Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 2.

рФ IX пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу рФ IX переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг рФ IX/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до конечной концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминоксиг-ПЭГ с ММ 20 кДа (описанный выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения рН до 6,0, смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Свободный рФ IX удаляют при помощи ионообменной хроматографии (ИЕХ). Реакционную смесь разбавили достаточными количествами буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5) для корректировки проводимости растворов и величины рН перед загрузкой в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюировали буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5). Свободный рФ IX элюировали ступенчатым градиентом с использованием 25% буфера В, что дало проводимость в пределах 12-25 мСм/см в полученной фракции, и конъюгат с использованием ступенчатого градиента 50% буфера В, что дало проводимость в пределах 27-45 мСм/см в конъюгатной фракции. Проводимость конъюгат-содержащей фракции затем поднимали буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 6,9; с использованием антихаотропических солей, таких, как аммония ацетат и т.д.) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут; или в аналогичную среду для гидрофобной хроматографии), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 6,9). Свободный аминоксиг-ПЭГ реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера E (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5).

Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности по известным способам.

Пример 16.

Пегилирование рФ VIIa с использованием реактива аминоксиг-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора

Способ 1.

рФ VIIa пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную массу или концентрацию рФ VIIa растворяют или переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора NaOH. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 50 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный рФ VIIa далее очищают анионообменной хроматографией на EMD TMAE (M) (Merck). Смесь разбавляют буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 6,5) до получения проводимости 5 мСм/см. Полученный раствор загружают в ионообменную колонку (высота слоя: 5,4 см) с объемом колонки 10 мл с использованием скорости потока 1,5 см/мин. Колонку впоследствии промывают (скорость: 1,5 см/мин) 5 ОК смеси 92:8 (м/м) буфера А и буфера В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,0 М NaCl, рН 7,0). Затем окисленный рФ VIIa элюируют смесью 50:50 (м/м) буфера А и буфера В с постэлюировочным этапом в 5 ОК буфера В. Этапы элюирования проводят со скоростью потока 1,0 см/мин.

После этого реактив аминоксиг-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный рФ VIIa в течение максимального периода времени (t) 15

мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-рФ VIIa очищают гидрофобной хроматографией (HIC) с использованием смолы Phenyl Sepharose FF low sub resin (GE Healthcare), заполненной в колонку производства GE Healthcare с высотой слоя (h) 15 см и итоговым объемом колонки (OK) 81 мл.

В реакционную смесь вносят аммония ацетат добавлением 50 мМ буфера Hepes, содержащего 350 мМ натрия хлорида, 8 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Два объема реакционной смеси смешивают с 1 объемом аммония ацетата, содержащего буферную систему, величину pH доводят до pH 6,9 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора NaOH. Данную смесь загружают в HIC колонку со скоростью потока 1 см/мин, после чего выполняют этап отмывания с использованием  $>3$  ОК уравнивающего буфера (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 2,5 М аммония ацетата, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9).

Для удаления побочных продуктов реакции и анти-хаотропической соли выполняют второй этап отмывания с  $>5$  ОК отмывочного буфера 1 (50 мМ Hepes, 3 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) в режиме восходящего потока со скоростью потока 2 см/мин. Затем выполняют элюирование очищенного конъюгата рФ VIIa в нисходящем режиме со ступенчатым градиентом 40% отмывочного буфера 2 (50 мМ Hepes, 1,5 М натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9) и 60% элюирующего буфера (20 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5) со скоростью потока 1 см/мин. Элюирование конъюгата ПЭГ-рФ VIIa отслеживают на УФ 280 нм и элюат, содержащий конъюгат, собирают в пределах  $<4$  ОК. Пост-элюировочный этап проводят с  $>3$  ОК элюирующего буфера в тех же условиях для отделения мало прореагировавшего и/или немодифицированного рФ VIIa от основного продукта.

Наконец, очищенный конъюгат концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с отсечением молекулярной массы в 10 кДа (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

рФ VIIa пегилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для пегилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу рФ VIIa переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг рФ VIIa/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описанный выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0, смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Свободный рФ VIIa удаляют при помощи ионообменной хроматографии (IEC). Реакционную смесь разбавили достаточными количествами буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5) для корректировки проводимости растворов и величины pH перед загрузкой в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюировали буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5). Свободный рФ VIIa элюировали ступенчатым градиентом с использованием 25% буфера В, что дало проводимость в пределах 12-25 мСм/см в полученной фракции, и конъюгат с использованием ступенчатого градиента 50% буфера В, что дало проводимость в пределах 27-45 мСм/см в конъюгатной фракции. Проводимость конъюгат-содержащей фракции затем поднимали буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,9; с использованием анти-хаотропических солей, таких, как аммония ацетат) и загружали в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут; или в аналогичную среду для гидрофобной хроматографии), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,9). Свободный ПЭГ-реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюировали 100% буфера E (50 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы ( $88 \text{ см}^2$ , порог отсечения 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5).

Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и BSA) и биологической активности по известным способам.

Пример 17. Полисиалирование рф IX в присутствии о-аминобензойной кислоты.

Способ 1.

8,2 мг рф IX растворяют в 4,0 мл гистидинового буфера, рН 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют 82 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 4 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 6 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (6,5 мл), содержащий окисленный рф IX, смешивают с 1,64 мл водного раствора о-аминобензойной кислоты (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Дальнейшую очистку конъюгата производят так, как описано здесь.

Способ 2.

Был приготовлен раствор 1 мг рф IX в 0,65 мл натрийфосфатного буфера, рН 6,0, содержащего 5-кратный молярный избыток аминокси-ПСК реактива с ММ 20 кДа (описан выше). Затем добавляли 333 мкл водного раствора о-аминобензойной кислоты (30 мМ) в качестве нуклеофильного катализатора до конечной концентрации 10 мМ. Последовательно добавляли 20 мкл водного раствора NaIO<sub>4</sub> (5 мМ) до конечной концентрации 100 мкМ. Процесс связывания производили в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном встряхивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 мкл 1 М водного раствора цистеина (1 М). Дальнейшую очистку конъюгата производят так, как описано здесь.

Пример 18. Полисиалирование ЭПО с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию эритропоэтина (ЭПО) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов, или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфера А. Затем окисленный ЭПО элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, рН 7,0). Далее собирают ЭПО-содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до рН 6,0 капельным добавлением 0,5 М HCl.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток реактива аминокси-ПСК удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, рН 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с рН 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ЭПО и подвергали ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (номинальный порог отсеивания 10 кДа, 50 см<sup>2</sup>, Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 1 производят следующим образом.

10 мг ЭПО растворяют в 5 мл гистидинового буфера, рН 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный ЭПО, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив

аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании. Свободный ЭПО удаляют при помощи анионообменной хроматографии (АЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфера E (50 мМ Hepes, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Конъюгат ПСК-ЭПО проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным ЭПО. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободного ЭПО.

#### Способ 2.

ЭПО переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный ЭПО далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ЭПО, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ЭПО в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ЭПО далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-ЭПО, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсеком молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Эритропоэтин (ЭПО) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ЭПО и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Номинальный порог отсека 10 кДа, 88 см<sup>2</sup>, Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 3 производят следующим образом. 10 мг ЭПО растворяют в 8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 200 мкл водно-

го раствора периодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). После этого добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию останавливают в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Свободный ЭПО удаляют при помощи анионообменной хроматографии (АЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реагент вымывали 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфера E (50 мМ Hepes, pH 7,4). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Конъюгат ПСК-ЭПО проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным ЭПО. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободного ЭПО.

#### Способ 4.

ЭПО переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору ЭПО в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали 60±5 мин.

Полученный конъюгат ПСК-ЭПО очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-ЭПО и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Номинальный порог отсечения 10 кДа, 88 см<sup>2</sup>, Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 19. Полисиалирование Ang-2 с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Начальную концентрацию ангиопоэтина-2 (Ang-2) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и побочных продуктов, или, альтернативно, пропускают через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфера А. Затем окисленный Ang-2 элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают Ang-2-содержащие фракции. Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем его доводят до 1 мг/мл реакционным буфером и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М HCl по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концен-

трация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактанта удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 мМ аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 мМ аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Ang-2 и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 1 производят следующим образом. Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактанта удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Наконец, собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-Ang-2 и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

Ang-2 переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Ang-2 далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Ang-2, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Ang-2 в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-Ang-2 далее очищают ионообменной хроматографией.

Фракции, содержащие конъюгат ПСК-Ang-2, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 мМ аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phe-

nyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, рН 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, рН 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Ang-2 и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 3 производят следующим образом. Ангиопоэтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-Ang-2 и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

Ang-2 растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору Ang-2 в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали 60±5 мин.

Полученный конъюгат ПСК-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-Ang-2 и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 20. Полисиалирование VEGF с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Начальную концентрацию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах VivaSpin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов, или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК буфера А. Затем окисленный VEGF элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, рН 7,0). Далее собирают VEGF-содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до рН 6,0 добавлением по каплям 0,5 М NaOH.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, рН 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут),

предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-VEGF и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 1 производят следующим образом. Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-VEGF и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

VEGF переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный VEGF далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный VEGF, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный VEGF в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-VEGF далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-VEGF, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-VEGF и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 3 производят следующим образом. Фактор роста сосудисто-го эндотелия (VEGF) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-VEGF и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 4.

VEGF растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору VEGF в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали 60±5 мин.

Полученный конъюгат VEGF очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-VEGF и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 21. Полисиалирование ФРЭ с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию фактора роста эпидермиса (ФРЭ) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах VivaSpin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов, или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфера А. Затем окисленный ФРЭ элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают ФРЭ-содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до pH 6,0 капельным добавлением 0,5 М HCl.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФРЭ и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 1 производят следующим образом. Фактора роста эпидерми-

са (ФРЭ) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ФРЭ и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

ФРЭ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный ФРЭ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФРЭ, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФРЭ в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ФРЭ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-ФРЭ, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Фактор роста эпидермиса (ФРЭ) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФРЭ и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 3 производят следующим образом. Фактор роста эпидермиса (ФРЭ) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при

осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 4.

ФРЭ растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору ФРЭ в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ФРЭ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-ФРЭ, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 22. Полисиалирование ФРН с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию фактора роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтратах Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов, или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфера А. Затем окисленный ФРН элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают ФРН-содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до pH 6,0 капельным добавлением 0,5 М HCl.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с MM 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФРН, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 1 производят следующим образом. Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ФРН и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

ФРН переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный ФРН далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФРН, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ФРН далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-ФРН, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФРН и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном воплощении способ 3 производят следующим образом. Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описана выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Затем собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ФРН и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

## Способ 4.

ФРН растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 Н водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору ФРН в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ФРН очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-ФРН и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на мембране, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 23. Полисиалирование ГРЧ с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

## Способ 1.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

Начальную концентрацию гормона роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буфер (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергается ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтрах Vivaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропускают через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Нерес, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфера А. Окисленный ГРЧ элюируют буфером В (20 мМ Нерес, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают ГРЧ-содержащие фракции.

Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд) и доводят его до 1 мг/мл реакционным буфером, и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М HCl по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактанта удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9) и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Нерес, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Нерес с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ГРЧ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники. ГРЧ переносят в реакционный буфер (50 мМ Нерес, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие ПСК-ГРЧ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

ГРЧ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный ГРЧ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ГРЧ, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ГРЧ в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при рН 6,0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ГРЧ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-ГРЧ, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

Гормон роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводят реакцию смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, рН 6,9) и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, рН 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, рН 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ГРЧ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники. ГРЧ переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ)

и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Затем собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ГРЧ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

ГРЧ растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокислотно-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору ГРЧ в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном встряхивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ГРЧ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-ГРЧ, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 24. Полисиалирование ФНО-альфа с использованием аминокислотно-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Начальную концентрацию фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах VivaSpin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный ФНО-альфа элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают ФНО-альфа-содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд) и оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером, и доведено до pH 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокислотно-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокислотно-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФНО-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5

мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов. Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ФНО-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Способ 2. ФНО-альфа переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6.0), чтобы получить конечную концентрацию белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора  $\text{HCl}$ . После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный ФНО-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФНО-альфа, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФНО-альфа, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при рН 6,0 в темноте, при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ФНО-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-ФНО-альфа, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Способ 3.

Фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, рН 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, рН 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, рН 7.5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-ФНО-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хро-

матографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-ФНО-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) на с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

ФНО-альфа растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору ФНО-альфа в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата, чтобы получить концентрацию 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-ФНО-альфа, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 25. Полисиалирование инсулина с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники. Начальную концентрацию инсулина перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vivaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный инсулин элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают инсулин-содержащие фракции. Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд) и доводят его до 1 мг/мл реакционным буфером, и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М HCl по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реакта удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-инсулин и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники. Инсулин переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К это-

му раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-инсулин, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

Инсулин переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный инсулин далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный инсулин, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный инсулин, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при pH 6, 0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-инсулин далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-инсулин, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

Инсулин переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7.5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-инсулин, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощение способ 3 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по мень-

шей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

Инсулин переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-инсулин, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 4.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в области техники.

Инсулин растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору инсулина в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) T=+22±2°C при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Полученный конъюгат инсулина очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-инсулин, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 26. Полисиалирование интерферона-альфа с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию интерферона-альфа перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vi-vaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный интерферон-альфа элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают интерферон-альфа-содержащие фракции. Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем его доводят до 1 мг/мл реакционным буфером и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М HCl по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-интерферон-альфа, и подвергают ультрафильтра-

ции/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Интерферон-альфа переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реагента удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-интерферон-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 2.

Интерферон-альфа перенесли или растворили в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 капельным добавлением 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный интерферон-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный интерферон-альфа, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-гамма, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при pH 6, 0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-интерферон-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-интерферон-альфа, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

#### Способ 3.

Интерферон-альфа переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего добавляют м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7,5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-интерферон-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Интерферон-альфа переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток

реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и  $\text{NaIO}_4$  (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-интерферон-альфа, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

Интерферон-альфа растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору интерферона-альфа в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат интерферона-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-интерферон-альфа, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 27. Полисиалирование интерферона-гамма с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

10 мг интерферона-гамма растворяют в 5 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при  $4^\circ\text{C}$  и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный интерферон-гамма, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Свободный интерферон-гамма удаляют при помощи катионообменной хроматографии (СЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до  $\sim 190$  мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реагент вымывали 5 ОК буфером D. Затем конъюгат элюируют 100% буфером E (50 мМ Hepes, pH 6,9). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы ( $88 \text{ см}^2$ , порог отсеивания 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Конъюгат ПСК-интерферон-гамма проявлял удельную активность  $>50\%$  в сравнении с нативным интерфероном-гамма. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный интерферон-гамма.

## Способ 2.

10 мг интерферона-гамма растворяют в 8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl). Затем добавляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 mM) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 mM). После этого добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 M водного раствора цистеина.

Свободный интерферон-гамма удаляют при помощи катионообменной хроматографии (СЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 mM Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную Буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реагент вымывали в 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфером Е (50 mM Hepes, pH 6,9). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 mM NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили характерную активность >50% в сравнении с нативным интерфероном-гамма. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный интерферон-гамма

## Способ 3.

10 мг интерферона-гамма растворяют в 8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl). Затем добавляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 mM) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 mM). После этого добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 M водного раствора цистеина.

Свободный интерферон-гамма удаляют при помощи катионообменной хроматографии (СЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 mM Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 mM Hepes, 1 M NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 mM Hepes, 5 M NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 mM Hepes, 3 M NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реагент вымывали в 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфером Е (50 mM Hepes, pH 6,9). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 mM NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Конъюгат ПСК-интерферон-гамма проявлял удельную активность >50% в сравнении с нативным интерфероном-гамма. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный интерферон-гамма.

## Способ 4.

Интерферон-гамма растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору интерферона-гамма в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 mM) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 mM. Наконец, добавляют 40 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном перемешивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубировали  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат интерферона-гамма очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-интерферон-гамма, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 28. Полисиалирование Г-КСФ с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтратах Vivaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный Г-КСФ элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 М  $\text{NaCl}$ , pH 7,0). Далее собирают Г-КСФ-содержащие фракции. Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем его доводят до 1 мг/мл реакционным буфером и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М  $\text{HCl}$  по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Г-КСФ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Гранулоцит-колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтратов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов. Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-Г-КСФ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 2.

Г-КСФ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH рас-

творя корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) T=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при T=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный Г-КСФ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Г-КСФ, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Г-КСФ, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) T=+22±2°C, при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-Г-КСФ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-Г-КСФ, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определения степени полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Гранулоцит-колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7.5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Г-КСФ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Гранулоцит-колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-Г-КСФ, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

Г-КСФ растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0 ± 0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору Г-КСФ в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) T=+22±2°C при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Полученный конъюгат Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-Г-КСФ, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 29. Полисиалирование Numi<sub>g</sub> с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию Numi<sub>g</sub> перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ.

Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vivaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный Numi<sub>g</sub> элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают Numi<sub>g</sub> -содержащие фракции. Было определено содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем оно было доведено до 1 мг/мл реакционным буфером и доведено до pH 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Numi<sub>g</sub>, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Numi<sub>g</sub> переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO<sub>4</sub> до конечной концентрации 200 мкМ. Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Потом раствор подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов. Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи ионообменной хроматографии. Собирают фракции, содержащие ПСК-Numi<sub>g</sub>, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

Способ 2.

Numi<sub>g</sub> переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный Numiḡa далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Numiḡa, собирают и используют для реакции конъюгации.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Numiḡa, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С, при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-Numiḡa далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПСК-Numiḡa, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

#### Способ 3.

Numiḡa переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7.5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Numiḡa, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Numiḡa переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ) и конъюгат далее очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат ПСК-Numiḡa, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 4.

Numiḡa растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка 1,0 ± 0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору Numiḡa в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Полученный конъюгат Numiḡa очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-Numiḡa, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в

области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 30. Полисиалирование Prolia с использованием аминокси-ПСК и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Начальную концентрацию Prolia перенесли в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавили до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют  $\text{NaIO}_4$  до конечной концентрации 200 мкМ.

Окисление проводят при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, осторожно встряхивая. Затем реакцию гасят цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем раствор подвергли ультрафильтрации/диафильтрации на центрифужных фильтраторах Vivaspin для удаления избытка периодата, замедлителя и их побочных продуктов или, альтернативно, пропустили через ионообменную колонку с объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена буфером А (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0). Колонку уравновешивают 5 ОК буфером А. Затем окисленный Prolia элюируют буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 М NaCl, pH 7,0). Далее собирают Prolia -содержащие фракции. Определяют содержание белка (Coomassie, Брэдфорд), затем его доводят до 1 мг/мл реакционным буфером и доводят до pH 6,0 добавлением 0,5 М HCl по каплям.

Был добавлен 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Избыток аминокси-реактива удаляют при помощи гидрофобной хроматографии. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную 80 мл Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes с pH 7,5, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Prolia, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. 10 мг Prolia растворяют в 5 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный Prolia, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Свободный Prolia удаляют при помощи катионообменной хроматографии (СЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный Prolia элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реактив вымывали в 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфера E (50 мМ Hepes, pH 6,9). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа, Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Для конъюгата ПСК-Prolia определили характерную активность >50% в сравнении с нативным Prolia. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный Prolia.

## Способ 2.

Prolia переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Prolia далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Prolia, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ONH<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Prolia в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат Prolia далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат Prolia, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

## Способ 3.

Prolia переносят в реакционный буфер (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и разбавляют до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реактива аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше), после чего был добавлен м-толуидин в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация 10 мМ) и NaIO<sub>4</sub> (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию спаривания проводят в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре и при осторожном встряхивании. Затем реакцию гасят цистеином в течение 60 мин при комнатной температуре (концентрация цистеина: 10 мМ). Затем проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буфера, содержащего аммония ацетат (50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 8 М аммония ацетата, pH 6,9), и загружают в колонку, заполненную Phenyl Sepharose FF (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную 50 мМ Hepes, 2,5 М аммония ацетата, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, 0,01% Твин-80, pH 6,9. Затем конъюгат элюируют 50 мМ Hepes, 5 мМ кальция хлорида, pH 7.5. Наконец, собирают фракции, содержащие ПСК-Prolia, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (Millipore). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. 10 мг Prolia растворяют в 8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). После этого добавляют реактив аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Свободный Prolia удаляют при помощи катионообменной хроматографии (СЕС). Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный Prolia элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Проводимость конъюгат-содержащих фракций затем поднимают до ~190 мСм/см буфером С (50 мМ Hepes, 5 М NaCl, pH 6,9) и загружают в 20 мл колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером D (50 мМ Hepes, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный ПСК-реактив вымывали в 5 ОК буфера D. Затем конъюгат элюируют 100% буфером Е (50 мМ Hepes, pH 6,9). Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Для конъюгата ПСК-Prolia определили характерную активность >50% в сравнении с нативным Prolia. Конъюгат дополнительно характеризуют

аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный Prolia.

Способ 4.

Prolia растворяют или переносят в реакционный буфер (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl.

После этого реактив аминокси-полисиаловой кислоты (ПСК-ОНН<sub>2</sub>) в 50-кратном молярном избытке добавляют к этому раствору Prolia в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Полученный конъюгат Prolia очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие ПСК-Prolia, и концентрируют способом ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

Конъюгаты, приготовленные по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка, биологической активности, в соответствии со способами, известными в области техники, и определяют степень полисиалирования, измеряя содержание ПСК (анализ с резорцином).

Пример 31. Полисиалирование других терапевтических белков.

Реакции полисиалирования, которые проводятся в присутствии альтернативных нуклеофильных катализаторов типа м-толуидина или о-аминобензойной кислоты, как описано здесь, могут быть распространены на другие терапевтические белки. Например, в различных аспектах изобретения описанные выше реакции полисиалирования или ПЭГилирования с ПСК-аминокси или ПЭГ-аминокси реагентами повторяются с терапевтическими белками, такими, как те белки, которые описаны здесь.

Пример 32. ПЭГилирование ЭПО с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Эритропоэтин (ЭПО) ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ЭПО растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ЭПО, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией (например, Q Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4 содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. ЭПО ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг ЭПО растворяют в 5 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный ЭПО, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив

аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники. Для конъюгата ПЭГ-ЭПО определили характерную активность >50% в сравнении с нативным ЭПО. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный ЭПО.

#### Способ 2.

ЭПО ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония).

ЭПО переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный ЭПО далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ЭПО, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ЭПО в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-ЭПО далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ЭПО, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в области техники.

#### Способ 3.

ЭПО ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ЭПО растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. ЭПО ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг ЭПО растворяют в ~8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добав-

ляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). После этого добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 7,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep QFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Для конъюгата ПЭГ-ЭПО определили характерную активность >50% в сравнении с нативным ЭПО. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный ЭПО.

#### Способ 4.

ЭПО ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу ЭПО переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка 2 мг ЭПО/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-ЭПО очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически исследуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности согласно известным способам.

Пример 33. ПЭГилирование Ang-2 с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Ang-2 ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Ang-2 растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Ang-2, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией (например, на Q Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Ang-2 ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу.

Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Ang-2 растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Ang-2, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

Ang-2 ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония).

Ang-2 переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Ang-2 далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Ang-2, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Ang-2, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-Ang-2 далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-Ang-2, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

Ang-2 ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Ang-2 растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Ang-2 ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Ang-2 растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и

смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Способ 4.

Ang-2 ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу Ang-2 переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6.0) до конечной концентрации белка 2 мг Ang-2/ мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-Ang-2 очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и BCA) и биологической активности согласно известным способам.

После этого свободный Ang-2 удаляют при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ).

Пример 34. ПЭгилирование VEGF с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

VEGF ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). VEGF растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный VEGF, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-VEGF очищают ионообменной хроматографией (например, на Q Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. VEGF ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). VEGF растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный VEGF, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-VEGF очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

VEGF ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). VEGF переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный VEGF далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный VEGF, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный VEGF, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-VEGF далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-VEGF, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсеком молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

VEGF ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). VEGF растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-VEGF очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. VEGF ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). VEGF растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-VEGF очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

## Способ 4.

VEGF ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу VEGF переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг VEGF/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-VEGF очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности согласно известным способам.

Пример 35. ПЭГилирование ФРЭ с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

## Способ 1.

ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРЭ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФРЭ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭ очищают ионообменной хроматографией (например, на Q Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРЭ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФРЭ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

## Способ 2.

ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., То-

кио, Япония). ФРЭ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный ФРЭ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФРЭ, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-ФРЭ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ФРЭ, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРЭ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭ очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРЭ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРЭ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

ФРЭ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу ФРЭ переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг ФРЭ/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-ФРЭ очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности согласно известным способам.

Пример 36. ПЭГилирование ФРН с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРН растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФРН, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРН растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФРН, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Способ 2.

ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРН переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный ФРН далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФРН, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осто-

рожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-ФРН далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ФРН, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРН растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФРН растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФРН очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

ФРН ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу ФРН переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг ФРН/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-ФРН очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и VSA) и биологической активности согласно известным способам.

Пример 37. ПЭГилирование ГРЧ с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

## Способ 1.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

ГРЧ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ГРЧ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 mM) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 M водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ГРЧ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 mM) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают ионообменной хроматографией (например, на Q Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 mM буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 mM буфером Hepes, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub> и 500 mM натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

ГРЧ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ГРЧ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 mM) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 M водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ГРЧ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 mM) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

## Способ 2.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

ГРЧ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ГРЧ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкM. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 M) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 mM в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный ГРЧ далее очищают ионообменной хроматографией.

Фракции элюата, содержащие окисленный ГРЧ, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ГРЧ, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осто-

рожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-ГРЧ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ФРН, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

ГРЧ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ГРЧ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники. ГРЧ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ГРЧ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

ГРЧ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу ГРЧ переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг ГРЧ/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени в 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-ГРЧ очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мем-

браны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 38. ПЭГилирование ФНО-альфа с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

ФНО-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФНО-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФНО-альфа, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. ФНО-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФНО-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный ФНО-альфа, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

ФНО-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФНО-альфа переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный ФНО-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный ФНО-альфа, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный ФНО-альфа, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т= +22±2°C при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

ФНО-альфа ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФНО-альфа растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, рН 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, рН 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. ФНО-альфа ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ФНО-альфа растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

ФНО-альфа ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу ФНО-альфа переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг ФНО-альфа/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения рН до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-ФНО-альфа очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 39. ПЭгилирование инсулина с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники. Инсулин ПЭгилируют с использованием линейного

20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Инсулин растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный инсулин, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулин очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером HEPES, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером HEPES, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники. Инсулин ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Инсулин растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный инсулин, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулин очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

Инсулин ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Инсулин переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ HEPES, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию гасят добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный инсулин далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный инсулин, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный инсулин, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т= +22±2°C, при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-инсулин далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-инсулин, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с ис-

пользованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

Инсулин ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминокислотную группу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Инсулин растворяют в буфере Hepes (50 mM Hepes, 150 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 mM) и с водным раствором м-толуидина (50 mM). Затем добавляют аминокислотный реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 M).

Наконец, конъюгат ПЭГ-инсулин очищают ионообменной хроматографией на Q Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 mM буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 mM буфером Hepes, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub> и 500 mM натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники. Инсулин ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминокислотную группу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Инсулин растворяют в буфере Hepes (50 mM Hepes, 150 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 mM) и с водным раствором м-толуидина (50 mM). Затем добавляют аминокислотный реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 M).

Наконец, конъюгат инсулина очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

Как описано здесь, аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют, чтобы внедрить по меньшей мере один сайт гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* способами, известными в данной области техники.

Инсулин ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминокислотную группу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу инсулина переносят или растворяют в буфере Hepes (50 mM Hepes, 150 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг инсулина/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 mM водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 mM в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокислот-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 M водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 mM.

Конъюгат ПЭГ-инсулин очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 40. ПЭГилирование интерферона-альфа с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 mM) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 M водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный интерферон-альфа, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 mM) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 mM буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 mM буфером Hepes, содержащим 5 mM CaCl<sub>2</sub> и 500 mM натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-альфа растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 mM) и инкубируют реакцию смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 M водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный интерферон-альфа, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 mM) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Способ 2.

Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-альфа переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 mM Hepes, 350 mM натрия хлорида, 5 mM кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 mM водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°C. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 M) в течение 15 мин при Т=+22±2°C до конечной концентрации 10 mM в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный интерферон-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный интерферон-альфа, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с MM 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-альфа, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 mM) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 mM. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°C, при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 3.

Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-альфа растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, рН 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, рН 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-альфа растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

Интерферон-альфа ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу интерферона-альфа переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг интерферона-альфа/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения рН до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-интерферон-альфа очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 41. ПЭГилирование интерферона-гамма с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Интерферон-гамма ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг интерферона-гамма растворяют в 5 мл гистидинового буфера, рН 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем

реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный интерферон-гамма, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-гамма очищают ионообменной хроматографией на SP Sephagose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Для конъюгата ПЭГ-интерферон-гамма определили характерную активность >50% в сравнении с нативным интерфероном-гамма. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный интерферон-гамма.

Способ 2. Интерферон-гамма ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу.

Примером этого типа реактивов служит Sunbright® СА серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Интерферон-гамма переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректировали до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т=+22±2°С. Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при Т=+22±2°С до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют 60±5 мин.

Окисленный интерферон-гамма далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный интерферон-гамма, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-гамма, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют 120±10 мин в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С, при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-интерферон-гамма далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-интерферон-гамма, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсекаем молекулярной массы (Millipore).

Конъюгат, приготовленный по этой процедуре, аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Способ 3.

Интерферон-гамма ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® СА серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг интерферона-гамма растворяют в ~8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). После этого добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Наконец, конъюгат ПЭГ-интерферон-гамма очищают ионообменной хроматографией на SP-Sephagose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SP FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный интерфе-

рон-гамма элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Для конъюгата ПЭГ-интерферон-гамма определили характерную активность >50% в сравнении с нативным интерфероном-гамма. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный интерферон-гамма

#### Способ 4.

Интерферон-гамма ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу интерферона-гамма переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг интерферона-гамма/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат ПЭГ-интерферон-гамма очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и VCA) и биологической активности известными способами.

Пример 42. ПЭГилирование Г-КСФ с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

#### Способ 1.

Г-КСФ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Г-КСФ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Г-КСФ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Г-КСФ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Г-КСФ растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Г-КСФ, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 2.

Г-КСФ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Г-КСФ переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Г-КСФ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Г-КСФ, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Г-КСФ, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-Г-КСФ далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-Г-КСФ, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсекаем молекулярной массы (Millipore).

#### Способ 3.

Г-КСФ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Г-КСФ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Г-КСФ ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Г-КСФ растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Г-КСФ очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

## Способ 4.

Г-КСФ ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу Г-КСФ переносят или растворяют в буфере HEPES (50 мМ HEPES, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг Г-КСФ/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат Г-КСФ очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера HEPES (50 мМ HEPES, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 43. ПЭГилирование Num1a с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

## Способ 1.

Num1a ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Num1a растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Num1a, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Num1a очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером HEPES, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером HEPES, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Num1a ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Num1a растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Num1a, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Num1a очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции элюата, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсека по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

## Способ 2.

Num1a ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® SA серий от NOF (NOF

Согр., Токио, Япония). Numiḡa переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка  $1,0 \pm 0,25$  мг/мл. Затем рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Numiḡa далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Numiḡa, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Numiḡa, в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-Numiḡa далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-Numiḡa, собирают и концентрируют ультра/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

#### Способ 3.

Numiḡa ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® СА серий от NOF (NOF Согр., Токио, Япония). Numiḡa растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Numiḡa очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, рН 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, рН 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом. Numiḡa ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® СА серий от NOF (NOF Согр., Токио, Япония). Numiḡa растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Numiḡa очищают ионообменной хроматографией. Собирают фракции, содержащие конъюгат, и подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Способ 4.

Numiḡa ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® СА серий от NOF (NOF Согр., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу Numiḡa переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, рН 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг Numiḡa/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения рН до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат Numiḡa очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с исполь-

зованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 44. ПЭГилирование Prolia с использованием реактива аминокси-ПЭГ и м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора.

Способ 1.

Prolia ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Prolia растворяют в 7,0 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>). Затем добавляют водный раствор периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 7,5 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат, содержащий окисленный Prolia, затем смешивают с водным раствором м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте, при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Prolia очищают ионообменной хроматографией (например, на Q-Sepharose FF). Например, 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны с подходящим порогом отсечения по молекулярной массе. Далее препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Coomassie, Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 1 выполняют следующим образом. Prolia ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг рф IX растворяют в 5 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 100 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч в темноте при 4°C и осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 50 мкл 1 М водного раствора цистеина. Потом смесь подвергают ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) с использованием центрифужных фильтраторов Vivaspin 15R 10 кДа для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов.

Ретентат (приблизительно 7 мл), содержащий окисленный Prolia, смешивают с 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описано выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Эту смесь инкубируют 2,5 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном перемешивании.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Prolia очищают ионообменной хроматографией на SP Sepharose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SP FF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный Prolia элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Для конъюгата ПЭГ-Prolia определили характерную активность >50% в сравнении с нативным Prolia. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный Prolia.

Способ 2.

Prolia ПЭГилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭГилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Prolia переносят или растворяют в реакционном буфере (например, 50 мМ Hepes, 350 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Затем pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5н. водного раствора HCl. После этого в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 200 мкМ. Реак-

цию окисления проводят в течение  $30 \pm 5$  мин при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем реакцию останавливают добавлением водного раствора L-цистеина (1 М) в течение 15 мин при  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$  до конечной концентрации 10 мМ в реакционной смеси и инкубируют  $60 \pm 5$  мин.

Окисленный Prolia далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции элюата, содержащие окисленный Humiga, собирают и используют для реакции конъюгации.

Реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа в 50-кратном молярном избытке добавляют к элюату, содержащему очищенный окисленный Prolia в течение максимального периода времени (t) 15 мин при осторожном перемешивании. Затем добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) в течение 15 мин до конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют  $120 \pm 10$  мин в темноте при температуре (Т)  $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ , при осторожном встряхивании.

Полученный конъюгат ПЭГ-Prolia далее очищают ионообменной хроматографией. Фракции, содержащие конъюгат ПЭГ-Prolia, собирают и концентрируют ультра/дифильтрацией (УФ/ДФ) с использованием мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы с подходящим отсечением молекулярной массы (Millipore).

#### Способ 3.

Prolia ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). ЭПО растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) и смешивают с водным раствором периодата натрия (10 мМ) и с водным раствором м-толуидина (50 мМ). Затем добавляют аминокси-реактив до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 8 мкл водного раствора цистеина (1 М).

Наконец, конъюгат ПЭГ-Prolia очищают ионообменной хроматографией на Q-Sepharose FF. 1,5 мг белка/мл геля загружают в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Hepes, pH 7,4, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Конъюгат элюируют 50 мМ буфером Hepes, содержащим 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 500 мМ натрия хлорида, pH 7,4, а затем подвергают ультрафильтрации/дифильтрации (УФ/ДФ) с использованием мембраны. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники.

В альтернативном варианте воплощения способ 3 выполняют следующим образом.

Prolia ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). 10 мг Prolia растворяют в ~8 мл гистидинового буфера, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Затем добавляют 200 мкл водного раствора периодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). После этого добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ 20 кДа (описан выше) до достижения 5-кратного молярного избытка реактива. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Наконец, конъюгат ПЭГ-Prolia очищают ионообменной хроматографией на SP-Sepharose FF. Реакционную смесь разбавляют 20 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 6,5) и загружают в 20 мл колонку HiPrep SPFF 16/10 (GE Healthcare, Фэйрфилд, Коннектикут), предварительно уравновешенную буфером А. Затем колонку элюируют буфером В (50 мМ Hepes, 1 М NaCl, pH 6,5). Свободный Prolia элюируют, промывая колонку 25% буфером В, конъюгат - 50% буфером В. Конъюгат-содержащие фракции концентрировали ультрафильтрацией/дифильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсечения 10 кДа/Millipore). Конечный этап дифильтрации проводили против гистидинового буфера, pH 6, 9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат аналитически охарактеризовывают путем измерения общего содержания белка (Брэдфорд) и биологической активности в соответствии со способами, известными в данной области техники. Для конъюгата ПЭГ-Prolia определили характерную активность >50% в сравнении с нативным Prolia. Конъюгат дополнительно характеризуют аналитически Эксклюзионной ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200, оснащенной колонкой Shodex KW 803, в описанных ранее условиях (Kolarich et al., Transfusion 2006; 46:1959-77). Показано, что в препарате не содержится свободный Prolia.

#### Способ 4.

Prolia ПЭгилируют с использованием линейного 20 кДа реактива для ПЭгилирования, содержащего аминоксигруппу. Примером этого типа реактивов служит Sunbright® CA серий от NOF (NOF Corp., Токио, Япония). Начальную концентрацию или массу Humiga переносят или растворяют в буфере Hepes (50 мМ Hepes, 150 мМ натрия хлорида, 5 мМ кальция хлорида, pH 6,0) до конечной концентрации белка 2 мг Prolia/мл. После этого в течение 15 мин добавляют 5 мМ водный раствор натрия периодата до концентрации 100 мкМ, затем добавляют 50 мМ водного раствора м-толуидина до получения конечной концентрации в 10 мМ в течение периода времени 30 мин. Затем добавляют реактив аминокси-ПЭГ с ММ

20 кДа (описано выше) до достижения 20-кратного молярного избытка реактива. После доведения pH до 6,0 смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре, при осторожном перемешивании, затем реакцию гасят в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 1 М водного раствора L-цистеина до конечной концентрации 10 мМ.

Конъюгат Prolia очищают при помощи ионообменной хроматографии (ИЕС). Конъюгат-содержащие фракции элюата концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием 10 кДа мембраны, изготовленной из регенерированной целлюлозы (88 см<sup>2</sup>, порог отсека 10 кДа/Millipore). Конечный этап диафильтрации проводили против буфера Hepes (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5).

Препарат аналитически характеризуют измерением общего содержания белка (процедура Брэдфорд и ВСА) и биологической активности известными способами.

Пример 45. ПЭГилирование терапевтического белка при помощи разветвленного ПЭГ.

ПЭГилирование терапевтического белка согласно изобретению может осуществляться также и с разветвленным или линейным реагентом для ПЭГилирования, который приготовлен из альдегида и подходящего сшивающего агента, содержащего активную аминоксигруппу.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ конъюгирования водорастворимого полимера с окисленным углеводным фрагментом терапевтического белка, где указанный способ включает:

а) первый этап, включающий корректировку величины pH раствора, содержащего терапевтический белок, до уровня pH от 5,0 до 8,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет от 0,3 до 3,0 мг/мл;

б) второй этап, включающий контактирование терапевтического белка с желаемой избыточной концентрацией активированного водорастворимого полимера, при этом избыточная концентрация составляет от 1- до 300-молярного избытка, в условиях, включающих период времени от 15 мин до 24 ч, температуру от 2 до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

в) третий этап, включающий добавление м-толуидина к раствору, полученному на втором этапе, при этом м-толуидин добавляют к полученному раствору в таком количестве, чтобы итоговая концентрация составила от 1 до 50 мМ, в условиях, которые включают период времени от 0,1 до 30 мин; температуру от 2 до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

г) четвертый этап, включающий добавления окислителя к раствору, полученному на третьей стадии до итоговой концентрации от 50 до 1000 мкМ, где окислитель выбран из группы, состоящей из натрия периодата (NaIO<sub>4</sub>), свинца тетраацетата (Pb(OAc)<sub>4</sub>) и калия перрутената (KRuO<sub>4</sub>);

д) пятый этап, на котором терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и окислителем в условиях, позволяющих конъюгацию активированного водорастворимого полимера с одним или более окисленных углеводных фрагментов терапевтического белка, где указанные условия включают период времени от 0,5 до 24 ч; температуру от 2 до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него, где один или более углеводных фрагментов терапевтического белка окисляют окислителем и между окисленным углеводным фрагментом и активной аминоксигруппой на активированном водорастворимом полимере формируется оксимная связь, где формирование указанной оксимной связи катализируется м-толуидином;

е) шестой этап, на котором конъюгацию водорастворимого полимера с одним или более окисленных углеводных фрагментов терапевтического белка, начатую на пятом этапе, останавливают путем добавления гасителя, выбранного из группы, состоящей из L-цистеина, метионина, глутатиона, глицерина, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (натрия метабисульфита), триптофана, тирозина, гистидина или его производных, крезола, имидазола и их комбинаций; при этом гаситель добавляется, чтобы итоговая концентрация составила от 1 до 100 мМ гасителя, в условиях, которые включают период времени от 5 до 120 мин; температуру от 2 до 37°C; при наличии или в отсутствие света и при перемешивании или без него;

где указанный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветвленного ПЭГ, PolyPEG®, полисиаловой кислоты (ПСК), полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, декстрана, карбоксиметил-декстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, сополимера этилена с малеиновым ангидридом, сополимера стирола с малеиновым ангидридом, поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформала) (ПГФ); и

терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из фактора IX (Ф IX), фактора VIII (Ф VIII), фактора VIIa (Ф VIIa), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), эритропоэтина (ЕРО), интерферона-альфа (IFN-альфа), интерферона-гамма, ангиопоэтина-2 (Ang-2), фактора роста васкулярного эндотелия (VEGF), гормона роста человека (HGH), фактора роста нервов (NGF), фактора некроза опухолей, инсулина, Humira (адалIMUMаба) и Prolia (денозумаба).

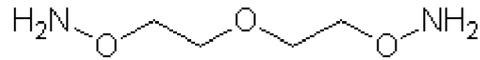
2. Способ по п.1, включающий:
- a) первый этап, включающий корректировку величины рН раствора, содержащего терапевтический белок, до уровня рН, равного 6,0, где концентрация терапевтического белка составляет от 1,0 мг/мл;
  - b) второй этап, включающий контактирование терапевтического белка с желаемой избыточной концентрацией активированного водорастворимого полимера, где избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих период времени 15 мин, температуру 22°C; в отсутствие света и при перемешивании;
  - c) третий этап, где м-толуидина добавляют в таком количестве, чтобы итоговая концентрация составила от 10 мМ;
  - d) четвертый этап, где окислитель представляет собой натрия периодат (NaIO<sub>4</sub>) и добавляется до итоговой концентрации от 400 мкМ;
  - e) пятый этап, на котором указанные условия включают период времени 2 часа; температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание; где один или более углеводных фрагментов терапевтического белка окисляют окислителем; и
  - f) шестой этап, на котором гаситель представляет собой из L-цистеин, который добавляют, чтобы итоговая концентрация составила 10 мМ в условиях, которые включают период времени 60 мин; температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание.
3. Способ по п.1 или 2, в котором стадии от a) до f) выполняют в одном сосуде.
4. Способ по любому из пп.1-3, где водорастворимым полимером является ПСК, которая состоит из 10-300 единиц сиаловой кислоты.
5. Способ по любому из пп.1-4, где терапевтический белок представляет собой белок свертывания крови.
6. Способ по п.5, где терапевтический белок представляет собой Ф IX или его биологически активный фрагмент.
7. Способ по п.5, в котором терапевтический белок представляет собой Ф VIIa или его биологически активный фрагмент.
8. Способ по п.5, где терапевтический белок представляет собой Ф VIII или его биологически активный фрагмент.
9. Способ по п.1, в котором м-толуидин присутствует в реакции конъюгации в концентрации 10 мМ.
10. Способ по любому из пп.1-9, дополнительно включающий стадию очистки конъюгированного терапевтического белка.
11. Способ по п.10, в котором конъюгированный терапевтический белок очищают способом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.
12. Способ по п.11, где хроматография выбрана из группы, состоящей из хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), ионообменной хроматографии (IEC), эксклюзионной хроматографии (SEC), аффинной хроматографии и обратно-фазовой хроматографии.
13. Способ по п.12, отличающийся тем, что на хроматографическом этапе загрузки и хроматографическом этапе промывания используют антиагглютирующую соль.
14. Способ по п.12, отличающийся тем, что хроматографию выполняют в колонке.
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что в колонке содержится хроматографическая смола, выбранная из группы, состоящей из фенил-сефарозы FF и бутил-сефарозы FF.
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что в колонке находится слой смолы высотой от 5 до 20 см.
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что высота слоя составляет 10 см.
18. Способ по п.14, отличающийся тем, что содержит один или более этапов отмывания, при которых поток направляется вверх и при которых скорость потока составляет от 0,2 до 6,7 см/мин.
19. Способ по п.18, отличающийся тем, что скорость потока составляет 2 см/мин.
20. Способ по любому из пп.14-19, отличающийся тем, что содержит один или более этапов элюирования, при которых поток направляется вниз и при которых скорость потока составляет от 0,1 до 6,7 см/мин.
21. Способ по п.20, отличающийся тем, что скорость потока составляет 1 см/мин.
22. Способ по любому из пп.10-21, отличающийся тем, что дополнительно содержит концентрирование конъюгированного терапевтического белка способом ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ).
23. Способ по любому из пп.10-22, отличающийся тем, что итоговая концентрация терапевтического белка составляет от 0,5 до 3 мг/мл.
24. Способ по любому из пп.10-23, отличающийся тем, что терапевтический белок включает 5-11 фрагментов водорастворимого полимера.
25. Способ по п.10, где конъюгированный терапевтический белок очищают при помощи хроматографии; при этом на этапе загрузки и на этапе промывки используют антиагглютирующую соль; способ, который содержит один или более этапов промывания, при которых поток направляется вверх и при которых скорость потока составляет от 0,2 до 6,7 см/мин, и один или более этапов элюирования, при которых поток направляется вниз и при которых скорость потока составляет от 0,2 до 6,7 см/мин; дополни-



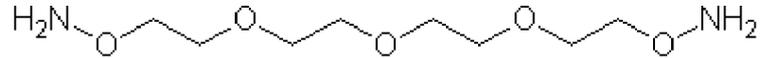
35. Способ по п.4, где ПСК получают взаимодействием активированного аминокси-линкера с окисленной ПСК;

где аминокси-линкер выбирают из группы, состоящей из:

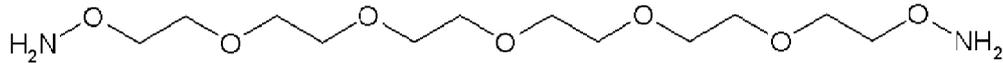
а) 3-оксапентан-1,5-диоксиаминового линкера формулы



б) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминового линкера формулы

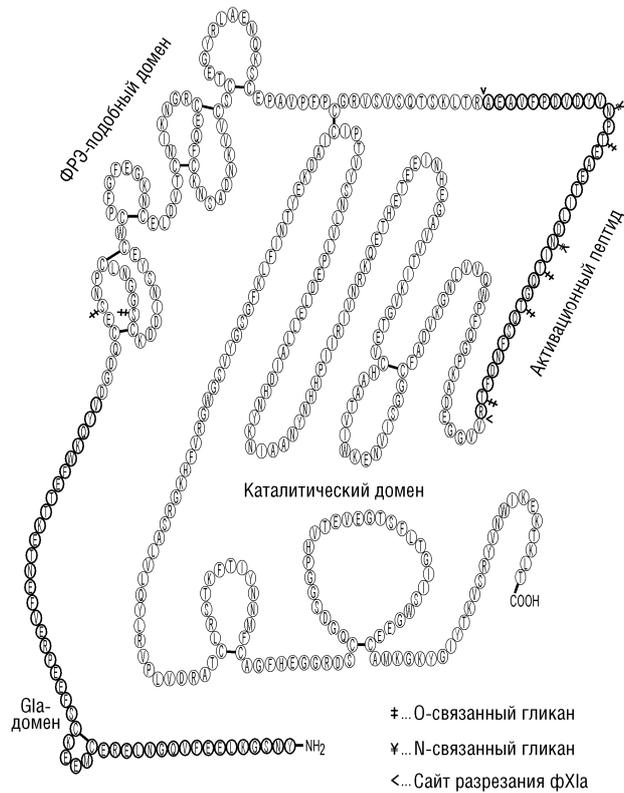


в) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминового линкера формулы



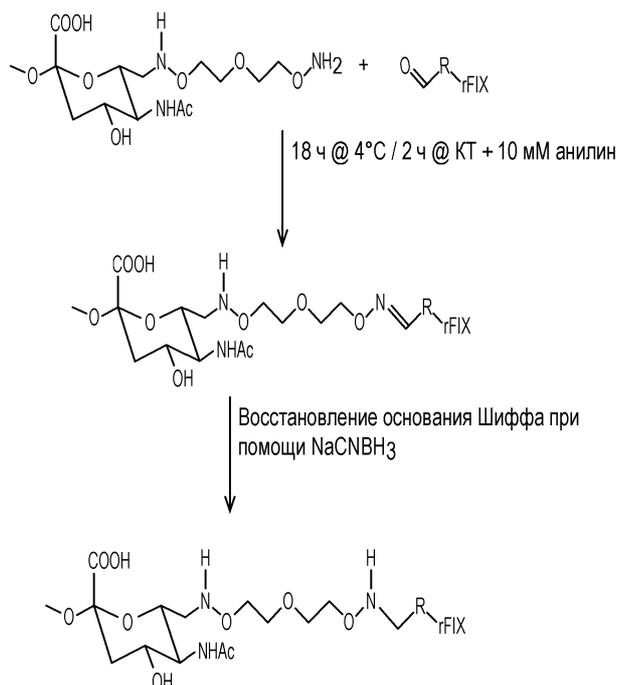
где ПСК окисляют инкубированием с окислителем с образованием терминальной альдегидной группы на невозстанавливаемом конце ПСК.

36. Способ по п.35, где аминокси-линкер представляет собой 3-оксапентан-1,5-диоксиамин.

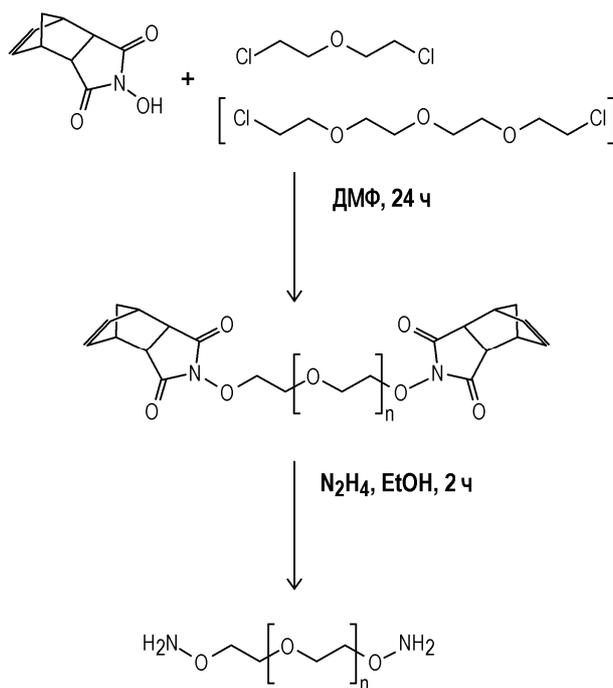


Фиг. 1

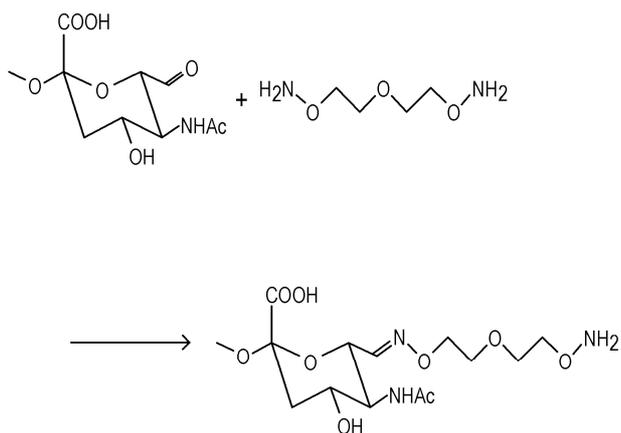
044273



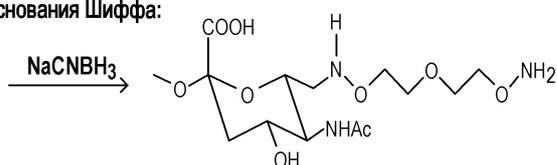
Фиг. 2



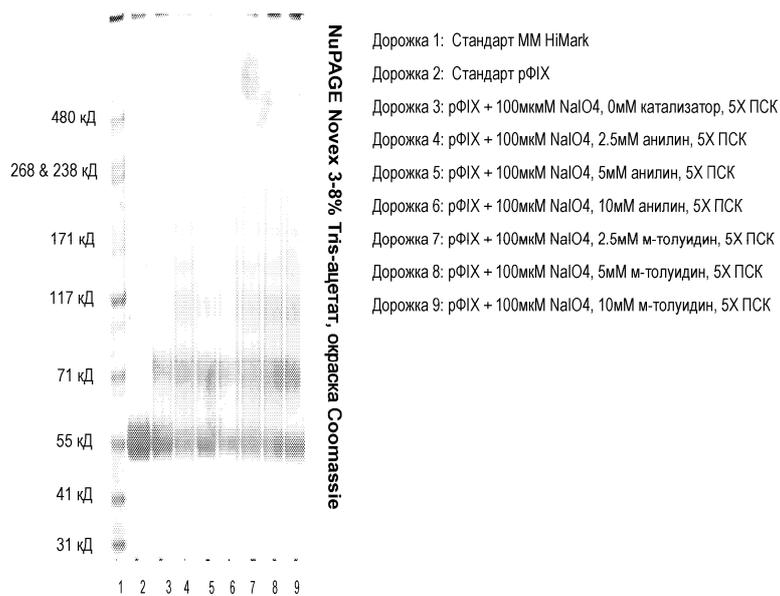
Фиг. 3



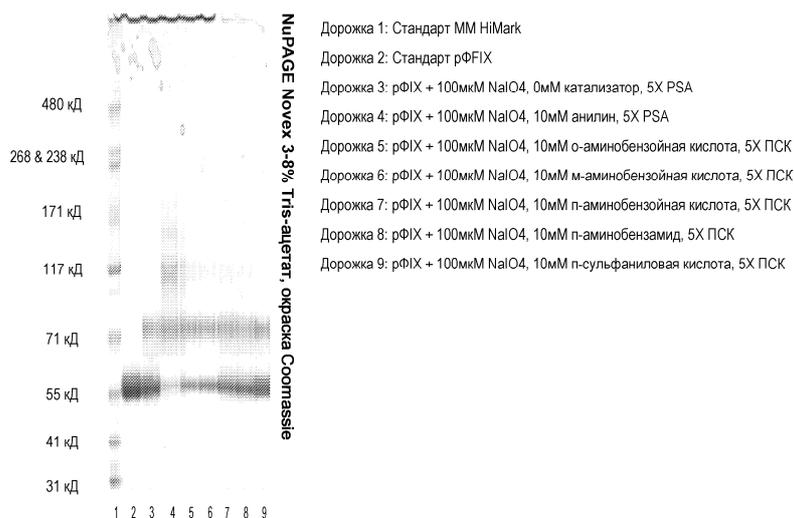
Этап восстановления  
для стабилизации  
основания Шиффа:



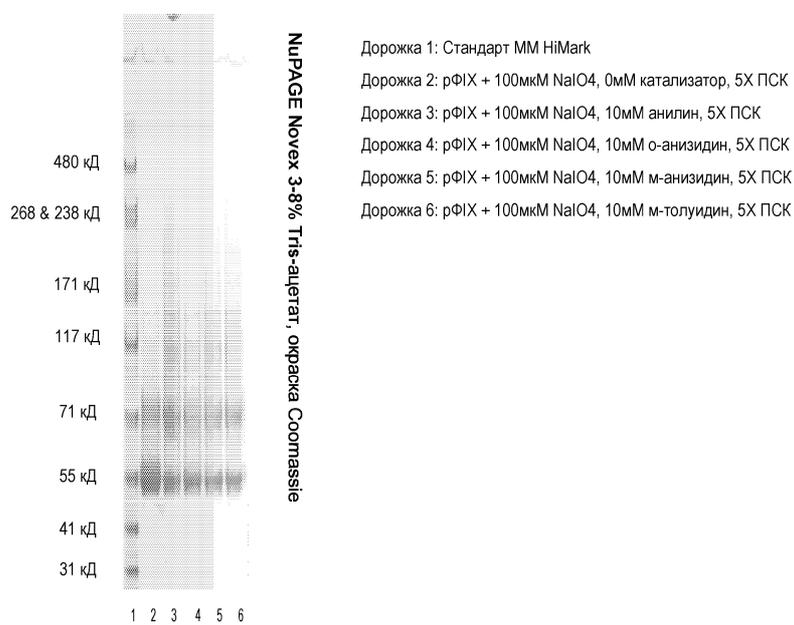
Фиг. 4



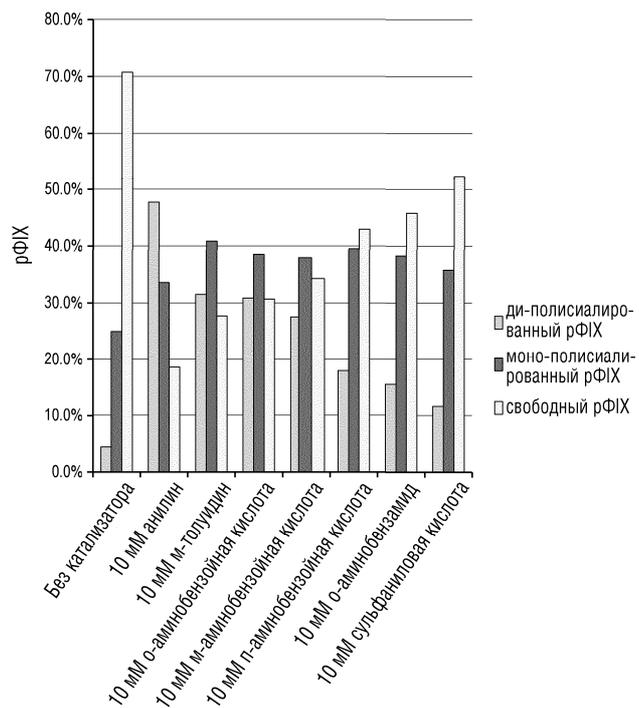
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 6

