

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047322**

(13) **B1**

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

- | | |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.03 | (51) Int. Cl. <i>C07H 3/02</i> (2006.01)
<i>A61K 38/17</i> (2006.01)
<i>A61K 47/50</i> (2006.01)
<i>A61K 47/55</i> (2006.01)
<i>A61K 47/62</i> (2006.01)
<i>A61K 47/64</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202090685 | |
| (22) Дата подачи заявки
2013.05.16 | |

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА
(ВАРИАНТЫ)**

- | | |
|--|---|
| (31) 61/647,814; 13/488,043 | (56) WO-A1-2012016131
US-A1-20110027350
WO-A2-2008/025856
RU-C1-2391354
THYGESEN Mikkel B. et al. Nucleophilic
Catalysis of Carbohydrate Oxime Formation by
Anilines. The Journal of Organic Chemistry, 2010, T.
75, Vol. 5, pp. 1752-1755, <doi: 10.1021/jo902425v> |
| (32) 2012.05.16; 2012.06.04 | |
| (33) US | |
| (43) 2020.11.30 | |
| (62) 201790935; 2013.05.16 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP) | |
| (72) Изобретатель:
Зикманн Юрген, Хайдер Штефан,
Ротгенштайнер Ханспетер, Турецек
Петер (AT) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к способам получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированный водорастворимый полимер, конъюгированный с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, где указанный водорастворимый полимер представляет собой полисиаловую кислоту (ПСК).

B1

047322

**047322
B1**

Область изобретения

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

Уровень техники

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

Полисиаловая кислота (ПСК), также именуемая как коломиновая кислота (КК), представляет собой встречающийся в природе полисахарид. Это вещество является гомополимером N-ацетилнейраминовой кислоты с α (2 \rightarrow 8) кетокислотной связью и содержит вицинальные диольные группы на невозстанавливаемом конце. Это вещество является отрицательно заряженным и представляет собой природный компонент организма человека. Это вещество может быть легко получено, в больших количествах и с предварительно установленными физическими свойствами, из бактерий (патент США № 5846951). В связи с тем, что полученная с помощью бактерий ПСК является химически и иммунологически идентичной ПСК, синтезированной в организме человека, бактериальная ПСК неиммуногенна даже при связывании с белками. В отличие от других полимеров кислота ПСК способна к биодegradации. Было показано, что ковалентное связывание коломиновой кислоты с каталазой и аспарагиназой увеличивает ферментную стабильность в присутствии протеолитических ферментов или в плазме крови. Сравнительные исследования *in vivo* с полисиалированной и немодифицированной аспарагиназой выявили, что полисиалирование увеличивает период полувыведения данного фермента (Fernandes and Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001;217:215-24).

Обзор связывания производных ПЭГ с пептидами и белками представлен в статье Roberts et al. (*Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:459-76). Одним подходом для связывания водорастворимых полимеров с терапевтическими белками является конъюгация полимеров посредством углеводных компонентов белка. Вицинальные гидроксильные (ОН) группы углеводов в белках могут легко окисляться периодатом натрия (NaIO₄) с образованием активных альдегидных групп (Rothfus et Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten et Ashwell, *J Biol Chem* 1971;246:1889-94). В дальнейшем полимер может соединяться с альдегидными группами углевода с помощью реагентов, содержащих, к примеру, активную гидразидную группу (Wilchek M and Bayer EA, *Methods Enzymol* 1987;138:429-42). Более поздняя технология предполагает использование реагентов, содержащих аминоксигруппы, которые реагируют с альдегидами с образованием оксимных связей (WO 96/40662, WO2008/025856).

Дополнительные примеры, описывающие конъюгацию водорастворимого полимера с терапевтическим белком, описаны в заявке WO 06/071801, в которой сообщается об окислении углеводных компонентов фактора фон Виллебранда и последующем связывании с ПЭГ с применением методов химии гидразидов; в публикации патента США № 2009/007 6237, в которой сообщается об окислении rFVIII, последующем связывании с ПЭГ и другими водорастворимыми полимерами (например, ПСК, ГЭК, декстраном) с применением методов химии гидразидов; в заявке WO 2008/025856, в которой сообщается об окислении разных факторов коагуляции, например, rFIX, FVIII и FVIIa, последующем связывании с, к примеру, ПЭГ с применением методов химии аминоксигрупп путем образования оксимной связи и в патенте США № 5621039, в котором сообщается об окислении FIX и последующем связывании с ПЭГ с применением методов химии гидразидов.

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

Несмотря на то, что анилиновый катализ может ускорить оксимное связывание, обеспечивая короткое время реакции и применение низких концентраций аминоксидного реагента, анилин обладает токсическими свойствами, которые должны быть учтены, например, при получении конъюгированного терапевтического белка, образующего основу фармацевтического препарата. К примеру, было показано, что анилин индуцирует метгемоглобинемию (Harrison, J.H., and Jollow, D.J., *Molecular Pharmacology*, 32(3) 423-431, 1987). Показано, что длительное включение анилина в диету крыс индуцировало образование опухолей в селезенке (Goodman, D.G., et al., *J Natl Cancer Inst.*, 73(1):265-73, 1984). Исследования *in vitro* также показали, что анилин способствует индукции хромосомных мутаций и имеет потенциальную генотоксическую активность (Bombhard E.M. et Herbold B, *Critical Reviews in Toxicology* 35,783-835, 2005).

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

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированный водорастворимый полимер, конъюгированный с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH 6,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

б) вторую стадию, включающую добавление избыточной концентрации активированного водорастворимого полимера к раствору, полученному на первой стадии, в течение максимального периода времени 15 мин, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих температуру 22°C, отсутствие света и перемешивание;

с) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих температуру 22°C, отсутствие света и перемешивание;

д) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента перйодата натрия (NaIO₄) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ;

е) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и NaIO₄ в условиях, которые позволяют конъюгировать активированный водорастворимый полимер с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени 2 ч, температуру 22°C; в отсутствие света и при перемешивании, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминоксигруппой на водорастворимом полимере и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

ф) шестую стадию, где конъюгирование водорастворимого полимера с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 минут; температуру от 22°C; отсутствие света и перемешивание;

где указанный водорастворимый полимер представляет собой полисиаловую кислоту (ПСК),

где указанный активированный водорастворимый полимер содержит активную аминоксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер, с активированным аминоксидно-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминоксидно-линкером, причем указанные условия включают период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2 до 8°C; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

2) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения, при температуре от 2 до 8°C.

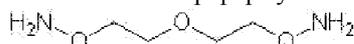
В предпочтительном варианте предложенного способа раствор, содержащий окисленный водорастворимый полимер и активированный аминоксидно-линкер, инкубируют при 4°C в течение 1 ч в отсутствие света при перемешивании.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, очищают с помощью анионообменной хроматографии при температуре 4°C.

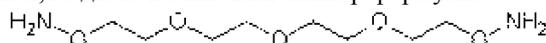
В предпочтительном варианте предложенного способа водорастворимый полимер окисляют путем инкубирования с NaIO_4 до образования окисленного водорастворимого полимера.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный аминокси-линкер выбирают из группы, состоящий из:

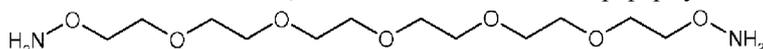
а) 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:



б) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминовый линкер формулы:



и в) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминовый линкер формулы:



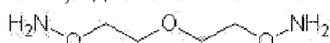
где водорастворимый полимер представляет собой ПСК и ПСК окисляют путем инкубирования с окислителем с образованием концевой альдегидной группы на невозстанавливаемом конце ПСК.

При этом аминокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиамин.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, причем указанные условия включают период времени 1 ч; температуру 4°C ; отсутствие света и перемешивание; тем самым образуя водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

б) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, с помощью анионообменной хроматографии, при температуре 4°C ; где активированный аминокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:



тем самым образуя оксимную связь между водорастворимым полимером и аминокси-линкером.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированный водорастворимый полимер, конъюгированный с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения pH раствора, содержащего терапевтический белок, до значения pH 6,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

б) вторую стадию, включающую добавление избыточной концентрации активированного водорастворимого полимера к раствору с первой стадии в течение максимального периода времени 15 мин, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих температуру 22°C ; отсутствие света и перемешивание;

в) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих температуру 22°C ; отсутствие света и перемешивание.

г) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента периодата натрия (NaIO_4) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ;

д) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и NaIO_4 в условиях, которые позволяют конъюгировать активированный водорастворимый полимер с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени 2 ч, температуру 22°C ; отсутствие света и перемешивание, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминоксигруппой на водорастворимом полимере, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

е) шестую стадию, где конъюгирование водорастворимого полимера с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 мин; температуру от 22°C ; отсутствие света и перемешивание;

где указанный активированный водорастворимый полимер представляет собой полисиаловую кислоту (ПСК);

где указанный активированный водорастворимый полимер содержит активную аминоксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего неокисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между неокисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при температуре 22°C в течение 2 ч; отсутствие света и перемешивание; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

2) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер получают способом, включающим дополнительную стадию добавления дополнительного количества активированного аминокси-линкера, содержащего активную аминоксигруппу, непосредственно перед повышением температуры.

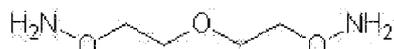
В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) и хроматографии при температуре 22°C.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, дополнительно очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диафильтрации (УФ UF/ДФ) или хроматографии при 4°C.

В предпочтительном варианте предложенного способа активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего неокисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между неокисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при 22°C в течение 2 ч при отсутствии света, при перемешивании; где способ дополнительно включает стадию, на которой повышают температуру раствора до температуры от 32 до 37°C и инкубируют в течение дополнительных 12-24 ч, тем самым образуя водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

б) очистка водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, диализом при температуре 22°C; где активированный аминокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:



тем самым образуя оксимную связь между неокисленным водорастворимым полимером и аминокси-линкером.

В обоих предложенных способах терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из: Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЭПО, интерферона-альфа (ИФН-альфа), консенсусного интерферона, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбopoэтина (ТПО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора IA костного морфогенетического белка, рецептора IB костного морфогенетического белка, рецептора II костного морфогенетического белка, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, белка крипто, криптического белка, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 1 нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2α нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2β нейтрофилов, эндотелиального клеточного фактора роста β, эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эфирегулина, аттрактанта нейтрофилов эпителиального происхождения, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста

фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора $\alpha 1$ нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептора $\alpha 2$ нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, связанного с ростом белка, связанного с ростом белка α , связанного с ростом белка β , связанного с ростом белка γ , связывающего гепарин эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, фактора роста, полученного из гепатомы, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, ингибирующего лейкемию фактора, рецептора а ингибирующего лейкемию фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропозтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина M (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, цепи A тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, цепи B тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора а тромбоцитарного фактора роста, рецептора β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующего фактора роста предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (ФСК), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста α , трансформирующего фактора роста β , трансформирующего фактора роста $\beta 1$, трансформирующего фактора роста $\beta 1.2$, трансформирующего фактора роста $\beta 2$, трансформирующего фактора роста $\beta 3$, трансформирующего фактора роста $\beta 5$, латентного трансформирующего фактора роста $\beta 1$, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста β , тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазмогена урокиназного типа, активирующего белка фосфолипазы (PLA₂), инсулина, лектина рицина, пролактина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреостимулирующего гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α -галактозидазы, β -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротейна, трансферрина, тромбозина, урокиназы, интегрин, тромбина, лептина, Хумиры (адалimumаба), Пролиа (деносумаба), Энбрела (этанерсепта) и белка из таблицы или их биологически активного фрагмента.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов водорастворимый полимер состоит из 10-300 единиц сиаловой кислоты.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов терапевтический белок представляет собой FIX или его биологически активный фрагмент.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов терапевтический белок представляет собой FVIIa или его биологически активный фрагмент.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов терапевтическим белком является FVIII или его биологически активный фрагмент.

В предпочтительных вариантах реализации предложенные способы дополнительно включают стадию очистки модифицированного терапевтического белка.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов модифицированный терапевтический белок очищают способом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.

В предпочтительных вариантах реализации предложенных способов модифицированный терапевтический белок очищают с помощью хроматографии; где используется антихаотропная соль на стадии загрузки хроматографического носителя и на стадии отмывания хроматографического носителя; способ содержит одну или несколько стадий отмывания, на которых направление потока выбрано в восходящем направлении и при этом скорость потока находится равна от 0,2 см/мин до 6,7 см/мин; и одну и более стадий элюирования, на которых направление потока выбрано в нисходящем направлении и при этом скорость потока равна от 0,2 см/мин до 6,7 см/мин; дополнительно включающий концентрирование модифицированного терапевтического белка ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ).

Фигуры

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

На фиг. 2 показано связывание окисленного rFIX с аминокси-ПСК.

На фиг. 3 показан синтез водорастворимых ди-аминоксильных линкеров 3-окса-пентан-1,5-диоксиамина и 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиамина.

На фиг. 4 показано получение аминокси-ПСК.

На фиг. 5 показано наглядное представление конъюгатов ПСК-FIX, полученных в присутствии разных катализаторов методом ДСН-ПААГ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ. а) Сравнение анилина с м-тодуидином при

применении разных концентраций. б) Сравнение анилина с о-аминобензойной кислотой, м-аминобензойной кислотой, п-аминобензойной кислотой, п-аминобензамидом и сульфаниловой кислотой, с) Сравнение анилина и м-толуидина с о-анизидином и м-анизидином.

На фиг. 6 показан процент полисиалирования с разными нуклеофильными катализаторами.

Подробное описание сущности изобретения

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

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

Терапевтические белки.

В определенных вариантах реализации изобретения терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из: Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (ТФ), протеазы ADAMTS 13, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЭПО, интерферона-альфа (ИФН-альфа), консенсусного интерферона, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбопоэтина (ТПО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора IA костного морфогенетического белка, рецептора IB костного морфогенетического белка, рецептора II костного морфогенетического белка, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, белка крипто, криптоического белка, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 1 нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2 α нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2 β нейтрофилов, эндотелиального клеточного фактора роста β , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, аттрактанта нейтрофилов эпителиального происхождения, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора α 1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептора α 2 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, связанного с ростом белка, связанного с ростом белка α , связанного с ростом белка β , связанного с ростом белка γ , связывающего гепарин эпидермаль-

ного фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, фактора роста, полученного из гепатомы, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, ингибирующего лейкемию фактора, рецептора α ингибирующего лейкемию фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейротрофина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина M (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, цепи A тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, цепи B тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора α тромбоцитарного фактора роста, рецептора β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующего фактора роста предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (ФСК), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста α , трансформирующего фактора роста β , трансформирующего фактора роста β 1, трансформирующего фактора роста β 1.2, трансформирующего фактора роста β 2, трансформирующего фактора роста β 3, трансформирующего фактора роста β 5, латентного трансформирующего фактора роста β 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста β , тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазмогена урокиназного типа, активирующего белка фосфолипазы (PLA2), инсулина, лектина рицина, пролактина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреостимулирующего гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α -галактозидазы, β -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрин, тромбина, лептина, Хумиры (адалimumаба), Пролиа (деносумаба), Энбрела (этанерсепта) и белка из таблицы или их биологически активного фрагмента.

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

В других аспектах изобретения терапевтический белок получают экспрессией в подходящей прокариотической или эукариотической системе хозяина, способной продуцировать фармакологически приемлемую молекулу белка коагуляции крови. Примерами эукариотических клеток являются клетки млекопитающих такие как: CHO, COS, HEK 293, VHK, SK-Nер и НерG2.

Для получения терапевтического белка используется большое разнообразие векторов и они выбираются из эукариотических и прокариотических векторов экспрессии. Примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды такие как и без ограничения: pRSET, pET и pBAD, в которых промоторы, используемые в векторах прокариотической экспрессии, включают один или более таких и без ограничения: lac, trc, trp, gcsA или araBAD. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) для экспрессии в дрожжах, векторы такие как и без ограничения pAO, pPIC, pYES или pMET, используя промоторы такие как и без ограничения AOX1, GAP, GAL1 или AUG1; (ii) для экспрессии в клетках насекомых, векторы такие как и без ограничения pMT, pAc5, pIB, pMIB или pBAC, используя промоторы такие как и без ограничения PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 или polh, и (iii) для экспрессии в клетках млекопитающих, векторы такие как и без ограничения pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3 или pBPV, и векторы, полученные из, в одном аспекте изобретения, вирусных систем таких как и без ограничения вируса осповакцины, аденоассоциированные вирусы, герпес-вирусы или ретровирусы, используя промоторы такие как и без ограничения CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актин.

Введение.

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

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

раскрытые выше.

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

Такие композиции могут вводиться перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или с помощью внутривенной инъекции. Термин "парентеральный", как используется в данном документе, включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интракостальную инъекцию или процедуру инфузии. Также это подразумевает введение внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекцией и/или хирургическим имплантированием в конкретное место. Обычно, композиции преимущественно свободны от пирогенов, а также от других примесей, которые могут быть опасными для реципиента.

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

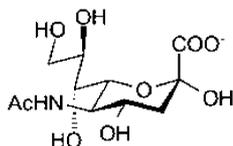
Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество конъюгированного терапевтического белка, как определено в данном документе. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, растворитель, соль, буферное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

В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, которые содержат композицию данного изобретения, упакованную способом, который облегчает ее использование для введения субъектам. В одном варианте реализации изобретения такой набор включает вещество или композицию, описанные в данном документе (например, композиция, содержащая конъюгированный терапевтический белок), упакованные в контейнер, такой как закрытый флакон или сосуд с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или помещенной в упаковку, которая описывает применение вещества или композиции при практической реализации этого способа изобретения. В одном варианте реализации изобретения этот набор содержит первый контейнер с композицией, содержащей конъюгированный терапевтический белок и второй контейнер с физиологически приемлемым восстанавливающим раствором для композиции в первом контейнере. В одном аспекте изобретения вещество или композиция упакованы в форме однодозовой дозы. Набор может дополнительно включать устройство, пригодное для введения композиции в соответствии со специфическим путем введения. Предпочтительно, чтобы набор содержал этикетку, которая описывает применение терапевтического белка или пептидной композиции.

Водорастворимые полимеры.

Сиаловая кислота и ПСК.

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



N- Ацетилнейраминовая кислота
Neu5Ac

Структура сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты).

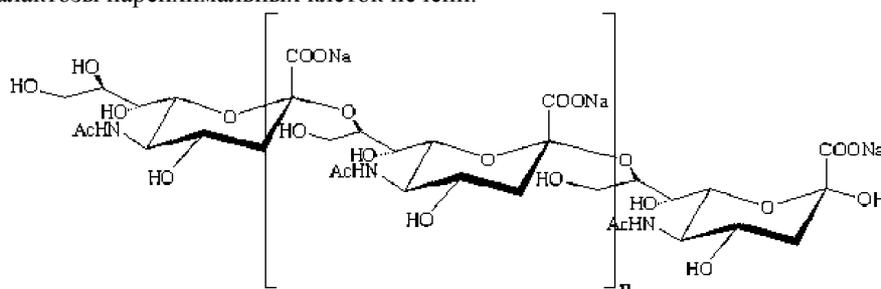
ПСК и мПСК обычно включают линейные полимеры, состоящие в основном из фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты связанных 2,8-или 2,9-гликозидными связями или их комбинациями (например, чередующимися 2,8- и 2,9-связями). В частности, для ПСК и мПСК предпочтительными являются гликозидные связи α -2,8. Такие ПСК и мПСК удобно получают из коламиновых кислот, которые называются в данном документе как "КК" и "мКК". Обычные ПСК и мПСК содержат по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 5, предпочтительнее по меньшей мере 10 и предпочтительнее всего по меньшей мере 20 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. Таким образом, они могут содержать

от 2 до 300 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты, предпочтительно от 5 до 200 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты или предпочтительнее всего от 10 до 100 фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты. ПСК и мПСК преимущественно в основном свободны от компонентов Сахаров отличных от N-ацетилнейраминовой кислоты. Поэтому ПСК и КК предпочтительно содержат по меньшей мере 90%, предпочтительнее по меньшей мере 95% и предпочтительнее всего по меньшей мере 98% фрагментов N-ацетилнейраминовой кислоты.

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

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

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



Структура коломиновой кислоты (гомополимер N-ацетилнейраминовой кислоты).

Коломиновые кислоты (подкласс ПСК) представляют собой гомополимеры N-ацетилнейраминовой кислоты (НАНК) с α (2→8) кетозидной связью и синтезируются, в частности, отдельными штаммами *Escherichia coli*, несущими антиген K1. Коломиновые кислоты обладают многими физиологическими функциями. Они важны в качестве сырья для производства лекарственных и косметических средств.

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

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

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

Встречающийся в природе полимер ПСК доступен в виде полидисперсного препарата, демонстрирующего широкое распределение размеров молекул (например, Sigma C-5762) и высокую полидисперсность (ПД). Благодаря тому, что полисахариды обычно синтезируются в бактериях, несущих неотъемлемый риск совместно выделяемых эндотоксинов, очистка длинных полимерных цепей сиаловой кислоты может повысить вероятность увеличенного содержания эндотоксинов. Короткие молекулы ПСК с 1-4 остатками сиаловой кислоты также могут быть получены синтетическим путем (Kang SH et al., *Chem Commun.* 2000;227-8; Ress DK and Linhardt RJ, *Current Organic Synthesis.* 2004;1:31-46), при этом миними-

зируется риск получения высоких концентраций эндотоксинов. Несмотря на это, в данное время могут производиться препараты ПСК с узким распределением размеров молекул и низкой полидисперсностью, которые также свободны от эндотоксинов. Полисахаридные соединения специального применения для данного изобретения, в одном аспекте, синтезируются бактериями. Некоторые из этих встречающихся в природе полисахаридов известны как гликолипиды. В одном варианте реализации полисахаридные соединения практически свободны от концевых остатков галактозы.

Способы присоединения.

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

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

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

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

Выше описано, что свободная аминокислотная группа терапевтического белка реагирует с 1-карбоксильной группой остатка сиаловой кислоты с образованием пептидной связи или эфирная связь образуется между 1-карбоксильной группой кислоты и гидроксильной или другой подходящей активной группой белка коагуляции крови. Альтернативно, карбоксильная группа образует пептидную связь с деацетилированной 5-аминокислотной группой или альдегидная группа молекулы терапевтического белка образует основание Шиффа с N-деацетилированной 5-аминокислотной группой остатка сиаловой кислоты.

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

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

В разных вариантах реализации изобретения терапевтический белок модифицируют для введения сайтов гликозилирования (т.е. сайты отличные от нативных сайтов гликозилирования). Такие модификации могут быть выполнены с использованием стандартных молекулярно-биологических методик, известных в этой области. Более того, терапевтический белок перед конъюгацией с водорастворимым полимером с помощью одного или большего количества углеводных фрагментов может быть гликозилированный *in vivo* или *in vitro*. Эти гликозилированные сайты могут служить мишенями для конъюгации

белков с водорастворимыми полимерами (патентная публикация США № 20090028822, патентная публикация США № 2009/0093399, патентная публикация США № 200 9/0081188, патентная публикация США № 2007/0254836, патентная публикация США № 2006/0111279 и статья DeFrees S. et al., *Glycobiology*, 2006, 16, 9, 833-43). К примеру, белок, который не является природногликозилированным *in vivo* (например, белок, который не является гликопротеином) может быть гликозилирован как описано выше.

Е. Аминоокси связывание.

В одном варианте реализации изобретения реакция гидроксилamina или производных гидроксилamina с альдегидами (например, с углеводным фрагментом после окисления периодатом натрия) с образованием оксимной группы применяется для получения конъюгатов белка коагуляции крови. К примеру, гликопротеин (например, терапевтический белок согласно настоящему изобретению) вначале окисленный окисляющим агентом таким как периодат натрия (NaIO_4) (Rothfus JA et Smith EL., *J Biol Chem* 1963, 238, 1402-10 и Van Lenten L и Ashwell G., *J Biol Chem* 1971, 246, 1889-94). Окисление периодатом гликопротеинов основано на классической реакции Малапрада, описанной в 1928 году, окисление вицинальных диолов периодатом с образованием активной альдегидной группы (Malaprade L., *Analytical application*, *Bull Soc Chim France*, 1928, 43, 683-96). Дополнительные примеры такого окисляющего агента являются: тетраацетат свинца ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$), ацетат марганца ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$), ацетат кобальта ($\text{Co}(\text{OAc})_2$), ацетат таллия (TlOAc), сульфат церия ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) (патент США 4367309) или перрутенат калия (KRuO_4) (Marko et al., *J Am Chem Soc* 1997, 119, 12661-2). Под термином "окисляющий агент" подразумевается соединение-мягкий окислитель, который способен окислять вицинальные диолы в углеводах, благодаря чему образуются активные альдегидные группы при реакции в физиологических условиях.

Второй стадией является связывание полимера, содержащего аминоксигруппу, с окисленным углеводным фрагментом с образованием оксимной связи. В одном варианте реализации изобретения эта стадия может выполняться в присутствии каталитических количеств нуклеофильного катализатора анилина или производных анилина (Dirksen A et Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* 2008; Zeng Y et al., *Nature Methods* 2009;6:207-9). Анилиновый катализ значительно ускоряет оксимное лигирование, что позволяет использовать очень низкие концентрации реагентов. В другом варианте реализации изобретения оксимная связь стабилизируется восстановлением NaCNBH_3 с образованием алкоксиаминной связи (фиг. 2). Дополнительные катализаторы описаны ниже.

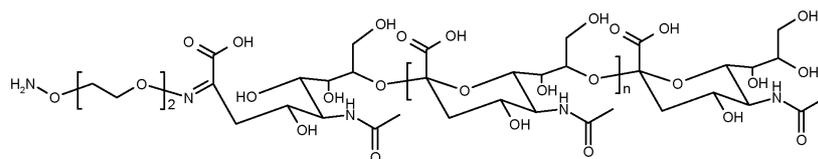
Дополнительная информация по аминоокси технологии может быть найдена по следующим ссылкам, содержание каждой из которых включено в данный документ полностью: EP 1681303A1 (соединенный с ГАК эритропоэтин); WO 2005/014024 (конъюгаты полимера и белка, связанные оксимной связывающей группой); WO96/40662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

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

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

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

В качестве основного продукта методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии была определена следующая структура:



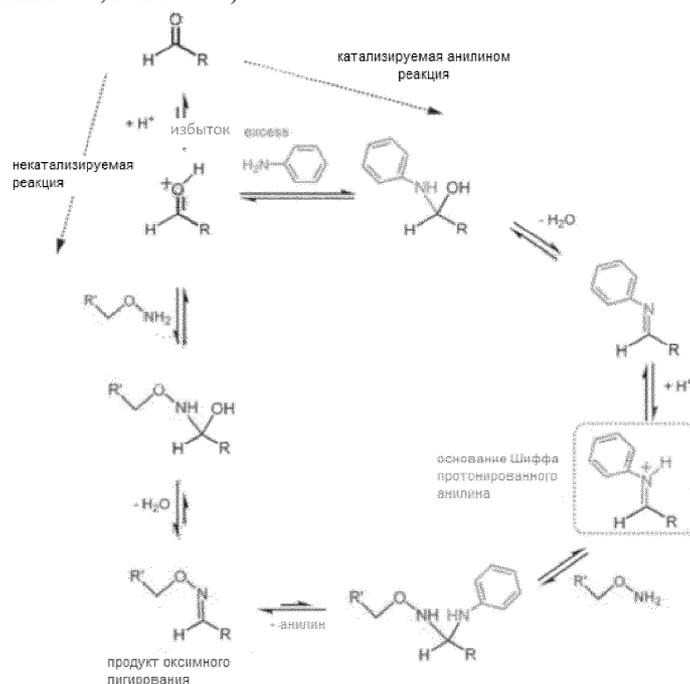
Эта реакция может быть перенесена на другие углеводы, подобные декстрану и крахмалу или другим полисахаридам, содержащие восстанавливающие концевые группы. Также предусмотрено использование нуклеофильного катализатора, подобного м-толуидину или анилину. Таким образом, в данном документе предложено приготовление реагентов аминокси-ПСК с использованием нативной ПСК (т.е. без предварительного окисления), которые потом могут применяться для химической модификации терапевтических белков.

Поэтому, в разных вариантах настоящего раскрытия изобретения представлены способы, в которых описаны условия связывания (например, температура инкубации $2-8^\circ\text{C}$) диаминоокси линкера с водорастворимым полимером, таким как окисленная ПСК, благоприятные для связывания с любым невосстанавливающим концом или, в одном альтернативном варианте, в котором условия связывания (например, комнатная температура инкубации) диаминоокси линкера с водорастворимым полимером, таким как нативная неокисленная ПСК, благоприятные для связывания с любым восстанавливающим концом.

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

Нуклеофильные катализаторы.

Как описано в данном документе, конъюгация водорастворимых полимеров с терапевтическими белками может катализироваться анилином. Анилин сильно катализирует водные реакции альдегидов и кетонов с аминами с образованием стабильных иминов, таких как гидразоны и оксимы. На следующей диаграмме сравниваются некатализируемая и катализируемая анилином реакция оксимного лигирования (Kohler JJ, ChemBioChem 2009;10:2147-50):



Однако, принимая во внимание многочисленные риски для здоровья, связанные с анилином, желательно использование альтернативных катализаторов. В настоящем изобретении предложены производные анилина в качестве альтернативных катализаторов оксимного лигирования. Такие производные анилина включают м-толуидин.

В одном варианте реализации изобретения м-толуидин (известный как мета-толуидин, м-метиланилин, 3-метиланилин или 3-амино-1-метилбензол) применяют для катализа реакций конъюгации, описанных в данном документе. М-толуидин и анилин обладают подобными физическими свойствами и, особенно, одинаковым значением рКа (м-толуидин: рКа 4,73, анилин: рКа 4,63).

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

Очистка конъюгированных белков.

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

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

Примеры

Пример 12.

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

Способ 1:

В реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) перенесли 50 мг rFVIII и разбавили его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавили NaO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Провели окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию остановили цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Полученный раствор перенесли на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая была уравновешена Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ СаСl₂, рН 7,0). Колонку уравновесили 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный rFVIII элюировали Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ СаСl₂, 1М NaCl, рН 7,0). Собрали фракции, содержащие rFVIII. Определили содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), скорректировали его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и скорректировали рН до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl. Потом добавили 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания провели в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании и при комнатной температуре. Избыток реагента аминокси-ПСК удалили с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси повысили до 130 мСм/см добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь нанесли на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,9. Далее конъюгат элюировали 50 мМ буферным раствором Гэпэс с рН 7,5, содержащим 5 мМ СаСl₂. Наконец, содержащие ПСК-rFVIII фракции собрали и подвергли УФ/ДФ с использованием мембраны на 30 КДа, сделанной из регенерированной целлюлозы (88 см², Millipore). Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и хромогенной активности FVIII. Определили, что конъюгат ПСК-rFVIII показал удельную активность >70% по сравнению с активностью нативного rFVIII.

Способ 2:

58 мг рекомбинантного фактора VIII (rFVIII), полученного в процессе производства ADVATE в буферном растворе Гэпэс (50 Мм ГЭПЭС, ~350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,1% полисорбата 80, рН 7,4), растворяют в реакционном буферном растворе (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) для достижения конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30±5 мин при температуре (Т) Т= +22±2°С. Потом реакцию останавли-

вают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T=+22\pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

Далее к элюату, содержащему очищенный окисленный rFVIII, добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК- ONH_2) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин в темноте при температуре (Т) $T=+22\pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании.

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

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

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

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

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

Способ 3:

В реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) перенесли 50 мг rFVIII и разбавили его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавили 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO_4 (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания провели в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании и при комнатной температуре. Далее реакцию остановили цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси повысили до 130 мСм/см добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь нанесли на колонку, заполненную 80 мл фенолсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюировали раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-rFVIII фракции собрали и подвергли УФ/ДФ с использованием мембраны на 30 кДа, сделанной из регенерированной целлюлозы (88 см^2 , Millipore). Полученный препарат был исследован аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и хромогенной активности FVIII. Для конъюгата ПСК-rFVIII определили удельную активность $\geq 70\%$ по сравнению с активностью

нативного rFVIII.

Способ 4:

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

Далее добавили реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке к этому раствору rFVIII при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавили водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. В заключение, добавили 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

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

В заключение, очищенный конъюгат сконцентрировали с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы с отсеканием молекулярной массы 30 кДа (88 см², Millipore).

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

Данные анализа (среднее из 6 последовательных серий):

Технологический выход (метод Брэдфорда): 58,9%.

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

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

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

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

Пример 18.

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

Способ 1:

Исходную концентрацию эритропоэтина (ЭПО) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

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

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

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток реагента аминокси-ПСК удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравнированную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с рН 7,5, содержащим 5 мМ CaCl_2 . Наконец, содержащие ПСК-ЭПО фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (ПОММ 10 кДа, 50 см², Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения Способ 1 выполняется следующим образом.

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

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

Свободный ЭПО удаляют с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, рН 7,5) и наносят на колонку *HiPrep QFF 16/10* объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравнированную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl , рН 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl , рН 6,9) и наносят на колонку *HiPrep Butyl FF 16/10* объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравнированную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl , рН 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, рН 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см², порог отсекаания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с рН 7,2, содержащего 150 мМ NaCl . Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-ЭПО определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ *Agilent 1200*, оборудованную колонкой *Shodex KW 803* в описанных ранее условиях (Kolarich et al, *Transfusion* 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

Способ 2:

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

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ЭПО, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в

течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

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

Способ 3:

Эритропоэтин (ЭПО) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO_4 (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ЭПО фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (ПОММ 10 кДа, 88 см^2 , Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

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

Свободный ЭПО удаляют с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, pH 7,5) и наносят на колонку HiPrep QFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, pH 7,5). Свободный ЭПО элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до $\sim 190 \text{ мСм/см}$ Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 7,4). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см^2 , порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 7,2, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-ЭПО определили удельную активность $>50\%$ по сравнению с активностью нативного ЭПО. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного ЭПО.

Способ 4:

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

Далее к этому раствору ЭПО добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения

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

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

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

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

Пример 19.

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

Способ 1:

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

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl_2 , pH 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный Ang-2 элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl_2 , 1 М NaCl , pH 7,0). Собирают фракции, содержащие Ang-2. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl .

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

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

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

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

Способ 2:

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

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный Ang-2, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 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-Ang-2 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии.

Содержащие конъюгат ПСК-Ang-2 фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/дифильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекающей молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

Ангиопозтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Гвина 80, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, рН 7,5. Наконец, содержащие ПСК-Ang-2 фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Ангиопозтин-2 (Ang-2) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Ang-2 фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

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

Далее к этому раствору Ang-2 добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до полу-

чения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 20.

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

Способ 1:

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

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

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

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

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

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

Способ 2:

ФРЭС переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ

хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРЭС, добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 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-ФРЭС дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ФРЭС фракции собирают и концентрируют с помощью ультра/диализации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекаания молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, рН 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФРЭС фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРЭС фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

ФРЭС растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

Далее к этому раствору ФРЭС добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь вод-

ного раствора L-цистеина (1 М) до получения конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубацией в течение 60±5 мин.

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

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

Пример 21:

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

Способ 1:

Исходную концентрацию эпидермального фактора роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, pH 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ЭФР элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ЭФР. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-ЭФР фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

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

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

Способ 2:

ЭФР переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка 1,0±0,25 мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации

200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ЭФР, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

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

Способ 3:

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ЭФР фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

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

Далее к этому раствору ЭФР добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 минут. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 22.

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

Способ 1:

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

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

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

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

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

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

Способ 2:

ФРН переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом pH раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl . Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в

пределах 15 мин при $T=+22\pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ФРН, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) $T=+22\pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

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

Способ 3:

Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФРН фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Фактор роста нервов (ФРН) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ, и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Потом содержащие ПСК-ФРН фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

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

Далее к этому раствору ФРН добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

Полученный конъюгат ФРН очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФРН фракции элюата собирают и концентрируют ультра-/диафильтрацией (УФ/ДФ) с использованием

мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore).

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

Пример 23.

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

Способ 1:

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

Исходную концентрацию гормона роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка перйодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, pH 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ГРЧ элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ГРЧ. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-ГРЧ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* в соответствии с известными в этой области способами. ГРЧ переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

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

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

Способ 2:

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

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

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ГРЧ, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

Полученный конъюгат ПСК-ГРЧ дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ГРЧ фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/дифiltrации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекаания молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

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

Гормон роста человека (ГРЧ) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ГРЧ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* в соответствии с известными в этой области способами. ГРЧ переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Потом содержащие ПСК-ГРЧ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

В данном документе описано, что аминокислотную последовательность гормона роста человека (ГРЧ) сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После

очистки ГРЧ гликозилируют *in vitro* в соответствии с известными в этой области способами.

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

Далее к этому раствору ГРЧ добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 24.

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

Исходную концентрацию фактора некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, pH 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный ФНО-альфа элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие ФНО-альфа. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной темпе-

ратуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 2:

ФНО-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный ФНО-альфа, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 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 дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекаания молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, рН 7,5. Наконец, содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-ФНО-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

ФНО-альфа растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка

1,0±0,25 мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

Далее к этому раствору ФНО-альфа добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 25.

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

Способ 1:

В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* в соответствии с известными в этой области способами. Исходную концентрацию инсулина переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, рН 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный инсулин элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, рН 7,0). Собирают фракции, содержащие инсулин. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют до рН 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с рН 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-инсулин фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. В данном документе описано, что аминокислотную последовательность инсулина сначала модифицируют для внедрения по меньшей мере одного сайта гликозилирования. После очистки инсулин гликозилируют *in vitro* в соответствии с известными в этой области способами. Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств

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

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

Способ 2:

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

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

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный инсулин, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 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-инсулина дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-инсулина фракции собирают и концентрируют с помощью ультра/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекаания молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

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

Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, рН 7,5. Наконец, содержащие ПСК-инсулин фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

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

Инсулин переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида на-

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

Способ 4:

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

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

Далее к этому раствору инсулина добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 26.

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

Способ 1:

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

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

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

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

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

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств VivaSpin для удаления избытка периодата, гасителя реакции и их побочных продуктов.

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

Способ 2:

Интерферон-альфа переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl . Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный интерферон-гамма, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК- ONH_2) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при рН 0,6 в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

Способ 3:

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

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Интерферон-альфа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO_4 (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-интерферон-альфа фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

Интерферон-альфа растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl .

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

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

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

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

Пример 27.

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

Способ 1:

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

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

Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, рН 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl , рН 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~ 190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl , рН 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl , рН 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, рН 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см^2 , порог отсекаания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диализации проводят против гистидинового буферного раствора с рН 6,9, содержащего 150 мМ NaCl . Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата

ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

Способ 2:

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

Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 mM Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 mM Гэпэс, 1 M NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 mM Гэпэс, 5 M NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 mM Гэпэс, 3 M NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 mM Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см², порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 mM NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

Способ 3:

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

Свободный интерферон-гамма удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 mM Гэпэс, pH 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 mM Гэпэс, 1 M NaCl, pH 6,5). Свободный интерферон-гамма элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 mM Гэпэс, 5 M NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 mM Гэпэс, 3 M NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 mM Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см², порог отсекания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 mM NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-интерферон-гамма определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного интерферона-гамма. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного интерферона-гамма.

Способ 4:

Интерферон-гамма растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 mM Гэпэс, 350 mM хлорида натрия, 5 mM хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации

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

Далее к этому раствору интерферона-гамма добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 28.

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

Способ 1:

Исходную концентрацию гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, pH 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный Г-КСФ элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, pH 7,0). Собирают фракции, содержащие Г-КСФ. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют pH до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с pH 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-Г-КСФ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной темпе-

ратуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Г-КСФ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 2:

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

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный Г-КСФ, добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

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

Способ 3:

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-Г-КСФ фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-Г-КСФ фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

Г-КСФ растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$

мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

Далее к этому раствору Г-КСФ добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 29.

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

Способ 1:

Исходную концентрацию белка Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, рН 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный белок Хумира элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, рН 7,0). Собирают фракции, содержащие белок Хумира. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют рН до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с рН 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-белок Хумира фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 1 выполняется следующим образом. Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с применением центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя реакции и их побочных продуктов. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-белок Хумира фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими

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

Способ 2:

Белок Хумира переносят или растворяют в реакционном буферном растворе (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl. Далее в течение 10 мин добавляют 40 мМ водный раствор перйодата натрия до получения концентрации 200 мкМ. Реакцию окисления выполняют в течение 30 ± 5 мин при температуре (Т) $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Потом реакцию останавливают добавлением в реакционную смесь водного раствора L-цистеина (1 М) в пределах 15 мин при $T = +22 \pm 2^\circ\text{C}$ до получения конечной концентрации 10 мМ и инкубацией в течение 60 ± 5 мин.

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

К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Хумира, добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120 ± 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-белок Хумира дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие конъюгат ПСК-белок Хумира фракции собирают и концентрируют с помощью ультра-/диафильтрации (УФ/ДФ), используя мембрану, сделанную из регенерированной целлюлозы, с подходящим порогом отсекаания молекулярной массы (Millipore).

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

Способ 3:

Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, рН 7,5. Наконец, содержащие ПСК-белок Хумира фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. Белок Хумира переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ и конъюгат очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие ПСК-белок Хумира фракции элюата собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

Способ 4:

Белок Хумира растворяют или переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) до достижения конечной концентрации белка $1,0 \pm 0,25$ мг/мл. Потом рН раствора корректируют до 6,0 добавлением по каплям 0,5 н. водного раствора HCl.

Далее к этому раствору белка Хумира добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК-

ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Пример 30.

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

Способ 1:

Исходную концентрацию белка Пролиа переносят в реакционный буферный раствор (например, 50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. К этому раствору добавляют NaIO₄ до получения конечной концентрации 200 мкМ. Проводят окисление при КТ в течение 30 мин в темноте при осторожном встряхивании. Потом реакцию останавливают цистеином (конечная концентрация: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ.

После этого раствор подвергают УФ/ДФ с использованием центрифужных фильтрационных устройств Vivaspin для удаления избытка периодата, гасителя и их побочных продуктов или, в качестве альтернативы, переносят на колонку для ИОХ объемом 20 мл (Merck EMD TMAE (M)), которая уравнивается Буферным раствором А (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, рН 7,0). Колонку уравнивают 5 ОК Буферного раствора А. Окисленный белок Пролиа элюируют Буферным раствором В (20 мМ Гэпэс, 5 мМ CaCl₂, 1 М NaCl, рН 7,0). Собирают фракции, содержащие белок Пролиа. Определяют содержание белка (Кумасси, метод Брэдфорда), корректируют его до 1 мг/мл с помощью реакционного буферного раствора и корректируют рН до 6,0 добавлением по каплям 0,5 М HCl.

Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминокси-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Избыток аминокси реагента удаляют с помощью ХГВ. Проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, рН 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную 80 мл фенилсефарозы FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравнированную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, рН 6,9. Далее конъюгат элюируют 50 мМ буферным раствором Гэпэс с рН 7,5, содержащим 5 мМ CaCl₂. Наконец, содержащие ПСК-белок Пролиа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). После этого препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (Кумасси, метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

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

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

Свободный белок Пролиа удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, рН 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравнированную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, рН 6,5). Сво-

бодный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, pH 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, pH 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, pH 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см², порог отсекания 10 кДа, Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с pH 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-белок Пролиа определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

Способ 2:

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

Окисленный белок Пролиа дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии. Содержащие окисленный белок Пролиа фракции элюата собирают и используют в реакции конъюгации.

К элюату, содержащему очищенный окисленный белок Пролиа, добавляют реагент аминоксиполисиаловую кислоту (ПСК-ONH₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Реакционную смесь инкубируют в течение 120±10 мин при pH 6,0 в темноте при температуре (Т) Т=+22±2°С при осторожном встряхивании (концентрация белка: 1 мг/мл).

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

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

Способ 3:

Белок Пролиа переносят в реакционный буферный раствор (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) и разбавляют его до получения концентрации белка 1 мг/мл. Добавляют 50-кратный молярный избыток реагента аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) с последующим добавлением м-толуидина в качестве нуклеофильного катализатора (конечная концентрация: 10 мМ) и NaIO₄ (конечная концентрация: 400 мкМ). Реакцию связывания проводят в течение 2 ч в темноте при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Далее реакцию останавливают цистеином (концентрация цистеина: 10 мМ) в течение 60 мин при КТ. Потом проводимость реакционной смеси корректируют добавлением буферного раствора, содержащего ацетат аммония (50 мМ Гэпэс, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 8 М ацетата аммония, pH 6,9) и смесь наносят на колонку, заполненную фенилсефарозой FF (GE Healthcare, Fairfield, CT), предварительно уравновешенную раствором 50 мМ Гэпэс, 2,5 М ацетата аммония, 350 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, 0,01% Твина 80, pH 6,9. Далее конъюгат элюируют раствором 50 мМ Гэпэс, 5 мМ хлорида кальция, pH 7,5. Наконец, содержащие ПСК-белок Пролиа фракции собирают и подвергают УФ/ДФ с использованием мембраны, сделанной из регенерированной целлюлозы (Millipore). Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области.

В альтернативном варианте реализации изобретения способ 3 выполняется следующим образом. 10 мг белка Пролиа растворяют в 8 мл гистидинового буферного раствора, pH 6,0 (20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl). Потом добавляют 200 мкл водного раствора перйодата натрия (5 мМ) и 2 мл водного раствора м-толуидина (50 мМ). Далее добавляют реагент аминоксип-ПСК с ММ 20 кДа (описан выше) до

получения 5-кратного молярного избытка реагента. Смесь инкубируют в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при осторожном перемешивании и останавливают реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре добавлением 100 мкл 1 М водного раствора цистеина.

Свободный белок Пролиа удаляют с помощью катионообменной хроматографии (КОХ). Реакционную смесь разбавляют 20 мл Буферного раствора А (50 мМ Гэпэс, рН 6,5) и наносят на колонку HiPrep SPFF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором А. Потом колонку элюируют Буферным раствором В (50 мМ Гэпэс, 1 М NaCl, рН 6,5). Свободный белок Пролиа элюируют промыванием колонки 25% Буферным раствором В, а конъюгат - 50% Буферным раствором В. Проводимость содержащих конъюгат фракций впоследствии повышают до ~190 мСм/см Буферным раствором С (50 мМ Гэпэс, 5 М NaCl, рН 6,9) и наносят на колонку HiPrep Butyl FF 16/10 объемом 20 мл (GE Healthcare, Fairfield, CT) предварительно уравновешенную Буферным раствором D (50 мМ Гэпэс, 3 М NaCl, рН 6,9). Свободный реагент ПСК вымывают Буферным раствором D в количестве 5 ОК. Далее конъюгат элюируют 100% Буферным раствором E (50 мМ Гэпэс, рН 6,9). Содержащие конъюгат фракции концентрируют с помощью УФ/ДФ, используя мембрану на 10 кДа, сделанную из регенерированной целлюлозы (88 см², порог отсекаания 10 кДа/Millipore). Конечную стадию диафильтрации проводят против гистидинового буферного раствора с рН 6,9, содержащего 150 мМ NaCl. Препарат исследуют аналитическими методами путем измерения общего белка (метод Брэдфорда) и биологической активности в соответствии с методами, известными в этой области. Для конъюгата ПСК-белок Пролиа определили удельную активность >50% по сравнению с активностью нативного белка Пролиа. Конъюгат дополнительно исследовали аналитическими методами с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, используя систему ВЭЖХ Agilent 1200, оборудованную колонкой Shodex KW 803 в описанных ранее условиях (Kolarich et al, Transfusion 2006;46:1959-77). Показано, что полученный препарат не содержит свободного белка Пролиа.

Способ 4:

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

Далее к этому раствору белка Пролиа добавляют реагент аминокси-полисиаловую кислоту (ПСК-ОНН₂) в 50-кратном молярном избытке при осторожном перемешивании в течение максимального периода времени (t) 15 мин. Потом в течение 15 мин добавляют водный раствор м-толуидина (50 мМ) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляют 40 мМ водный раствор периодата натрия до получения концентрации 400 мкМ.

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

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

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

Перечень последовательностей

<110> BAXTER INTERNATIONAL INC.
BAXTER HEALTHCARE SA

<120> НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ОКСИМНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

<130> 31315/46928

<150> 13/488 043

<151> 2012-06-04

<150> 61/647 814

<151> 2012-05-16

<160> 1

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 422

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val
1 5 10 15

Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu
20 25 30

Glu Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp
35 40 45

Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn
50 55 60

Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
65 70 75 80

Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
85 90 95

Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys
100 105 110

Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys
115 120 125

Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser
130 135 140

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp
145 150 155 160

Tyr Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
180 185 190

Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val
195 200 205

047322

Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr
 210 215 220

Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
 225 230 235 240

Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val
 245 250 255

Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys
 260 265 270

Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu
 275 280 285

Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn
 290 295 300

Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val
 305 310 315 320

Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro
 325 330 335

Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr
 340 345 350

Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys
 355 360 365

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser
 370 375 380

Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly
 385 390 395 400

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys
 405 410 415

Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 420

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированный водорастворимый полимер, конъюгированный с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения рН раствора, содержащего терапевтический белок, до значения рН 6,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

б) вторую стадию, включающую добавление избыточной концентрации активированного водорастворимого полимера к раствору, полученному на первой стадии, в течение максимального периода времени 15 мин, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих температуру 22°C, отсутствие света и перемешивание;

в) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих температуру 22°C, отсутствие света и перемешивание;

г) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента перйодата натрия (NaIO_4) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ;

д) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и NaIO_4 в условиях, которые позволяют конъюгировать активированный водорастворимый полимер с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени 2 ч, температуру 22°C; в отсутствие света и при перемешивании, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминоксигруппой на водорастворимом полимере и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

е) шестую стадию, где конъюгирование водорастворимого полимера с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 мин; температуру от 22°C; отсутствие света и перемешивание;

где указанный водорастворимый полимер представляет собой полисиаловую кислоту (ПСК),

где указанный активированный водорастворимый полимер содержит активную аминоксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, причем указанные условия включают период времени от 1 мин до 24 ч; температуру от 2 до 8°C; в присутствии или отсутствии света, наличии или отсутствии перемешивания; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

2) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения, при температуре от 2 до 8°C.

2. Способ получения модифицированного терапевтического белка, включающего активированный водорастворимый полимер, конъюгированный с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанный способ включает:

а) первую стадию, включающую доведение значения рН раствора, содержащего терапевтический белок, до значения рН 6,0, при этом концентрация терапевтического белка составляет 1,0 мг/мл;

б) вторую стадию, включающую добавление избыточной концентрации активированного водорастворимого полимера к раствору с первой стадии в течение максимального периода времени 15 мин, при этом избыточная концентрация составляет 50-молярный избыток, в условиях, включающих температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание;

в) третью стадию, включающую добавление м-толуидина к раствору со второй стадии, при этом м-толуидин добавляют с обеспечением конечной концентрации 10 мМ в условиях, включающих температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание;

г) четвертую стадию, включающую окисление одной или нескольких углеводных составляющих терапевтического белка добавлением окисляющего агента перйодата натрия (NaIO_4) к раствору с третьей стадии с обеспечением конечной концентрации 400 мкМ;

д) пятую стадию, где терапевтический белок инкубируют с активированным водорастворимым полимером, м-толуидином и NaIO_4 в условиях, которые позволяют конъюгировать активированный водорастворимый полимер с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка, причем указанные условия включают период времени 2 ч, температуру 22°C; отсутствие света и перемешивание, где одна или несколько углеводных составляющих терапевтического белка

окисляются окисляющим агентом; и где оксимная связь образуется между окисленной углеводной составляющей и активной аминоксигруппой на водорастворимом полимере, и указанное образование оксимной связи катализируется м-толуидином; и

г) шестую стадию, где конъюгирование водорастворимого полимера с одной или несколькими окисленными углеводными составляющими терапевтического белка на пятой стадии останавливается добавлением L-цистеина; причем L-цистеин добавляют в количестве, обеспечивающем получение конечной концентрации останавливающего агента 10 мМ, в условиях, включающих период времени 60 мин; температуру от 22°C; отсутствие света и перемешивание;

где указанный активированный водорастворимый полимер представляет собой полисиаловую кислоту (ПСК);

где указанный активированный водорастворимый полимер содержит активную аминоксигруппу и его получают способом, включающим:

1) инкубирование раствора, содержащего неокисленный водорастворимый полимер, с активированным аминокси-линкером, содержащим активную аминоксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между неокисленным водорастворимым полимером и активированным аминокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при температуре 22°C в течение 2 ч; отсутствие света и перемешивание; благодаря чему образуется водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу; и

2) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминоксигруппу, методом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации, диализа и осаждения.

3. Способ по п.1 или 2, где терапевтический белок выбирают из группы, состоящей из: Фактора IX (FIX), Фактора VIII (FVIII), Фактора VIIa (FVIIa), Фактора фон Виллебранда (VWF), Фактора FV (FV), Фактора X (FX), Фактора XI (FXI), Фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, ФСК, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЭПО, интерферона-альфа (ИФН-альфа), консенсусного интерферона, ИФН-бета, ИФН-гамма, ИФН-омега, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-21, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-31, ИЛ-32 альфа, ИЛ-33, тромбопоэтина (ТПО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора IA костного морфогенетического белка, рецептора IB костного морфогенетического белка, рецептора II костного морфогенетического белка, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, белка крипто, криптоического белка, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 1 нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2 α нейтрофилов, индуцируемого цитокинами хемотаксического фактора 2 β нейтрофилов, эндотелиального клеточного фактора роста β , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, аттрактанта нейтрофилов эпителиального происхождения, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора α 1 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, рецептора α 2 нейротрофического фактора глиальной клеточной линии, связанного с ростом белка, связанного с ростом белка α , связанного с ростом белка β , связанного с ростом белка γ , связывающего гепарин эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, фактора роста, полученного из гепатомы, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, ингибирующего лейкемию фактора, рецептора α ингибирующего лейкемию фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропоэтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста

эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, цепи А тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста АА, тромбоцитарного фактора роста АВ, цепи В тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста ВВ, рецептора α тромбоцитарного фактора роста, рецептора β тромбоцитарного фактора роста, стимулирующего фактора роста предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (ФСК), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста α , трансформирующего фактора роста β , трансформирующего фактора роста β 1, трансформирующего фактора роста β 1.2, трансформирующего фактора роста β 2, трансформирующего фактора роста β 3, трансформирующего фактора роста β 5, латентного трансформирующего фактора роста β 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста β , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста β , тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазмогена урокиназного типа, активирующего белка фосфолипазы (PUP), инсулина, лектина рицина, пролактина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреостимулирующего гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, α -галактозидазы, β -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрин, тромбина, лептина, Хумиры (адалимумаба), Пролиа (деносумаба), Энбрела (этанерсепта) и белка из таблицы или их биологически активного фрагмента.

4. Способ по п.1, где раствор, содержащий окисленный водорастворимый полимер и активированный аминокси-линкер, инкубируют при 4°C в течение 1 ч в отсутствие света при перемешивании.

5. Способ по п.4, в котором активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, очищают с помощью анионообменной хроматографии при температуре 4°C.

6. Способ по п.5, в котором водорастворимый полимер окисляют путем инкубирования с NaIO_4 до образования окисленного водорастворимого полимера.

7. Способ по п.2, в котором активированный водорастворимый полимер получают способом, включающим дополнительную стадию добавления дополнительного количества активированного аминоксидлинкера, содержащего активную аминоксигруппу, непосредственно перед повышением температуры.

8. Способ по п.2 или 7, в котором активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диалфильтрации (УФ/ДФ) и хроматографии при температуре 22°C.

9. Способ по п.8, в котором активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминоксигруппу, дополнительно очищают способом, выбранным из группы, состоящей из диализа, ультрафильтрации/диалфильтрации (УФ/ДФ) или хроматографии при 4°C.

10. Способ по п.3, в котором водорастворимый полимер состоит из 10-300 единиц сиаловой кислоты.

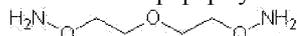
11. Способ по п.3, где терапевтический белок представляет собой FIX или его биологически активный фрагмент.

12. Способ по п.3, в котором терапевтический белок представляет собой FVIIa или его биологически активный фрагмент.

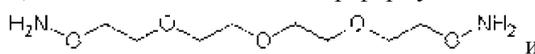
13. Способ по п.3, где терапевтическим белком является FVIII или его биологически активный фрагмент.

14. Способ по п.1, где активированный аминокси-линкер выбирают из группы, состоящей из:

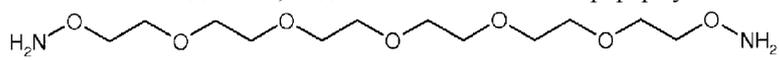
а) 3-окса-пентан-1,5-диоксиаминовый линкер формулы:



б) 3,6,9-триокса-ундекан-1,11-диоксиаминовый линкер формулы:



в) 3,6,9,12,15-пентаокса-гептадекан-1,17-диоксиаминовый линкер формулы:



где водорастворимый полимер представляет собой ПСК, и ПСК окисляют путем инкубирования с окислителем с образованием концевой альдегидной группы на невосстанавливаемом конце ПСК.

15. Способ по п.14, в котором аминокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диоксиамин.

16. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий стадию очистки модифицированного терапевтического белка.

17. Способ по п.16, в котором модифицированный терапевтический белок очищают способом, выбранным из группы, состоящей из хроматографии, фильтрации и осаждения.

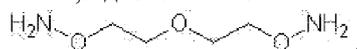
18. Способ по п.16, в котором модифицированный терапевтический белок очищают с помощью хроматографии; где используется антихаотропная соль на стадии загрузки хроматографического носителя и на стадии отмывания хроматографического носителя; способ содержит одну или несколько стадий

отмывания, на которых направление потока выбрано в восходящем направлении и при этом скорость потока равна от 0,2 до 6,7 см/мин; и одну и более стадий элюирования, на которых направление потока выбрано в нисходящем направлении и при этом скорость потока равна от 0,2 до 6,7 см/мин; дополнительно включающий концентрирование модифицированного терапевтического белка ультрафильтрацией/диафильтрацией (УФ/ДФ).

19. Способ по п.1, в котором активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего окисленный водорастворимый полимер, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между окисленным водорастворимым полимером и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают период времени 1 ч; температуру 4°C; отсутствие света и перемешивание; тем самым образуя водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу; и

б) очистку активированного водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, с помощью анионообменной хроматографии, при температуре 4°C; где активированный аминоокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диооксиаминовый линкер формулы:

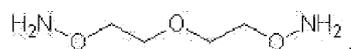


тем самым образуя оксимную связь между водорастворимым полимером и аминоокси-линкером.

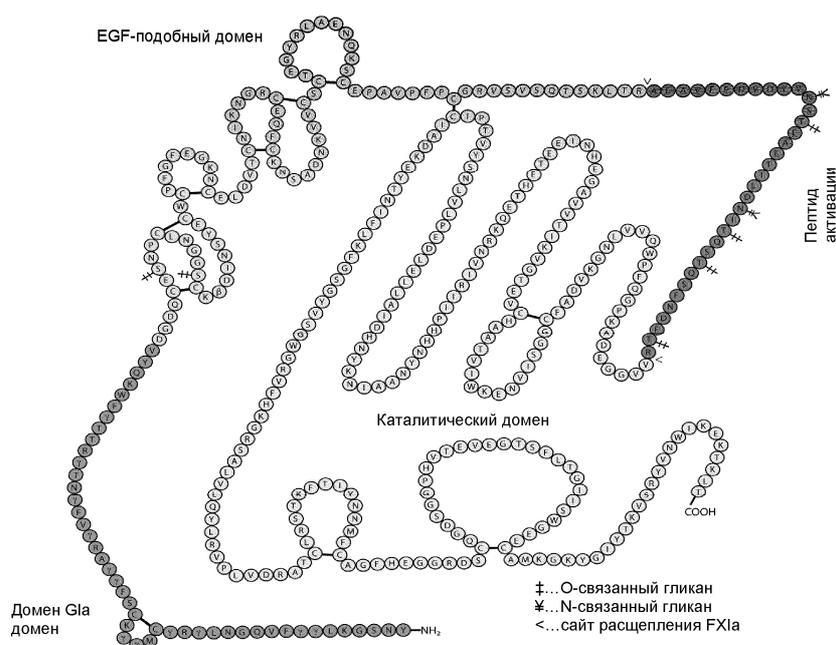
20. Способ по п.2, в котором активированный водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу, получают способом, включающим:

а) инкубирование раствора, содержащего неокисленный водорастворимый полимер, с активированным аминоокси-линкером, содержащим активную аминооксигруппу, в условиях, которые обеспечивают образование стабильной оксимной связи между неокисленным водорастворимым полимером и активированным аминоокси-линкером, причем указанные условия включают инкубирование при 22°C в течение 2 ч при отсутствии света, при перемешивании; где способ дополнительно включает стадию, на которой повышают температуру раствора до температуры от 32 до 37°C и инкубируют в течение дополнительных 12-24 ч; тем самым образуя водорастворимый полимер, содержащий активную аминооксигруппу; и

б) очистку водорастворимого полимера, содержащего активную аминооксигруппу, диализом при температуре 22°C; где активированный аминоокси-линкер представляет собой 3-окса-пентан-1,5-диооксиаминовый линкер формулы:

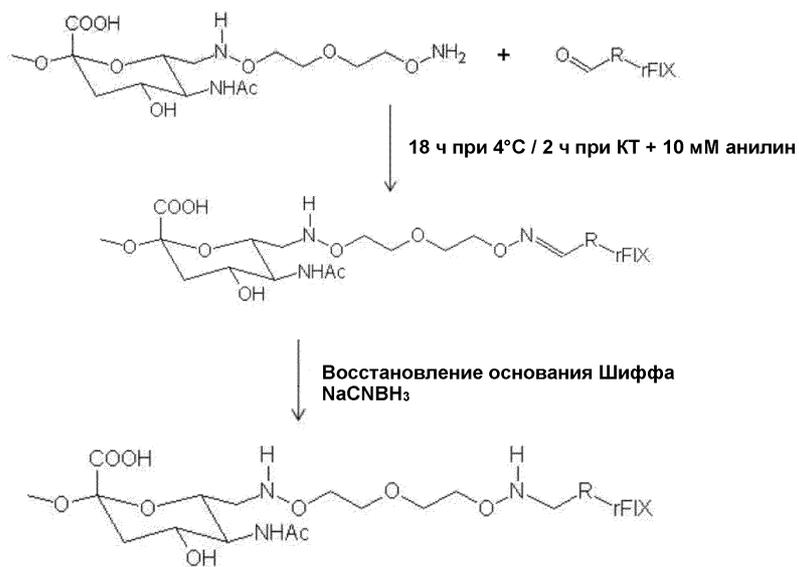


тем самым образуя оксимную связь между неокисленным водорастворимым полимером и аминоокси-линкером.

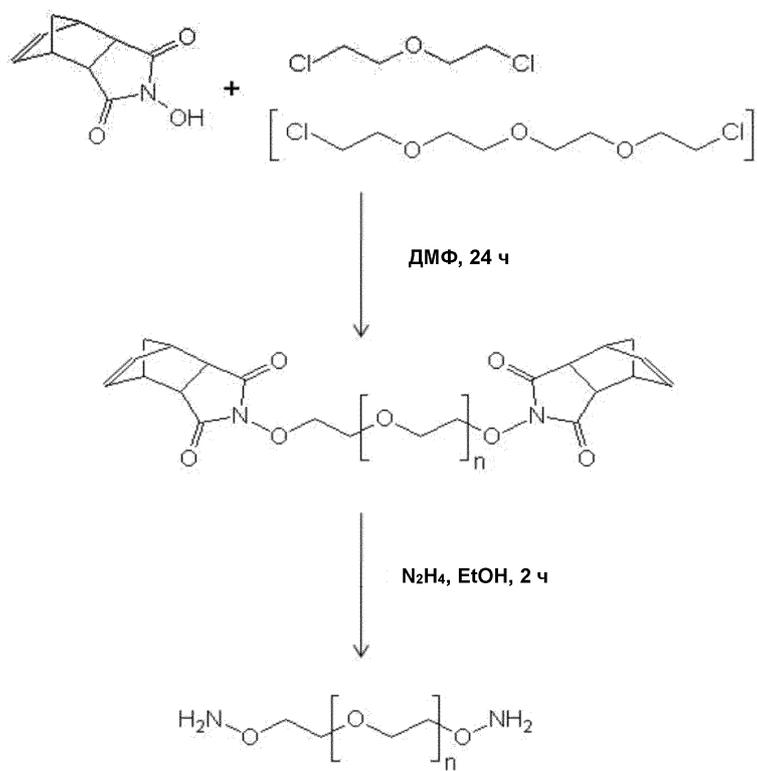


Фиг. 1

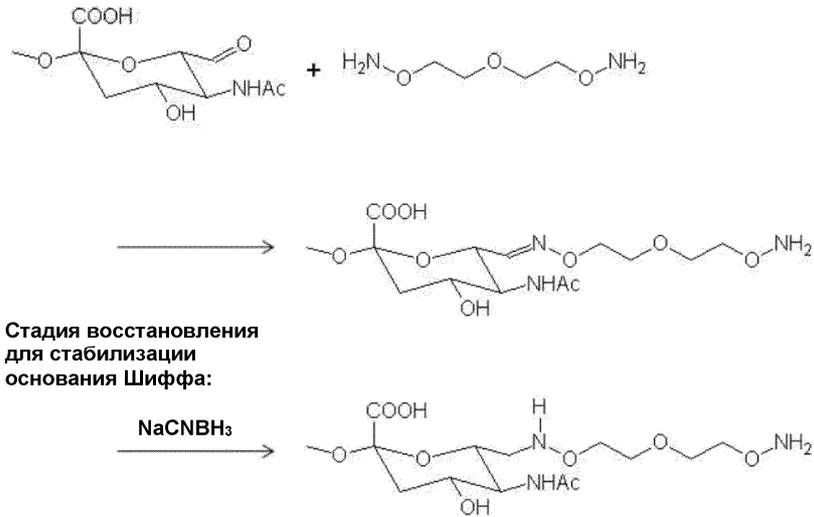
047322



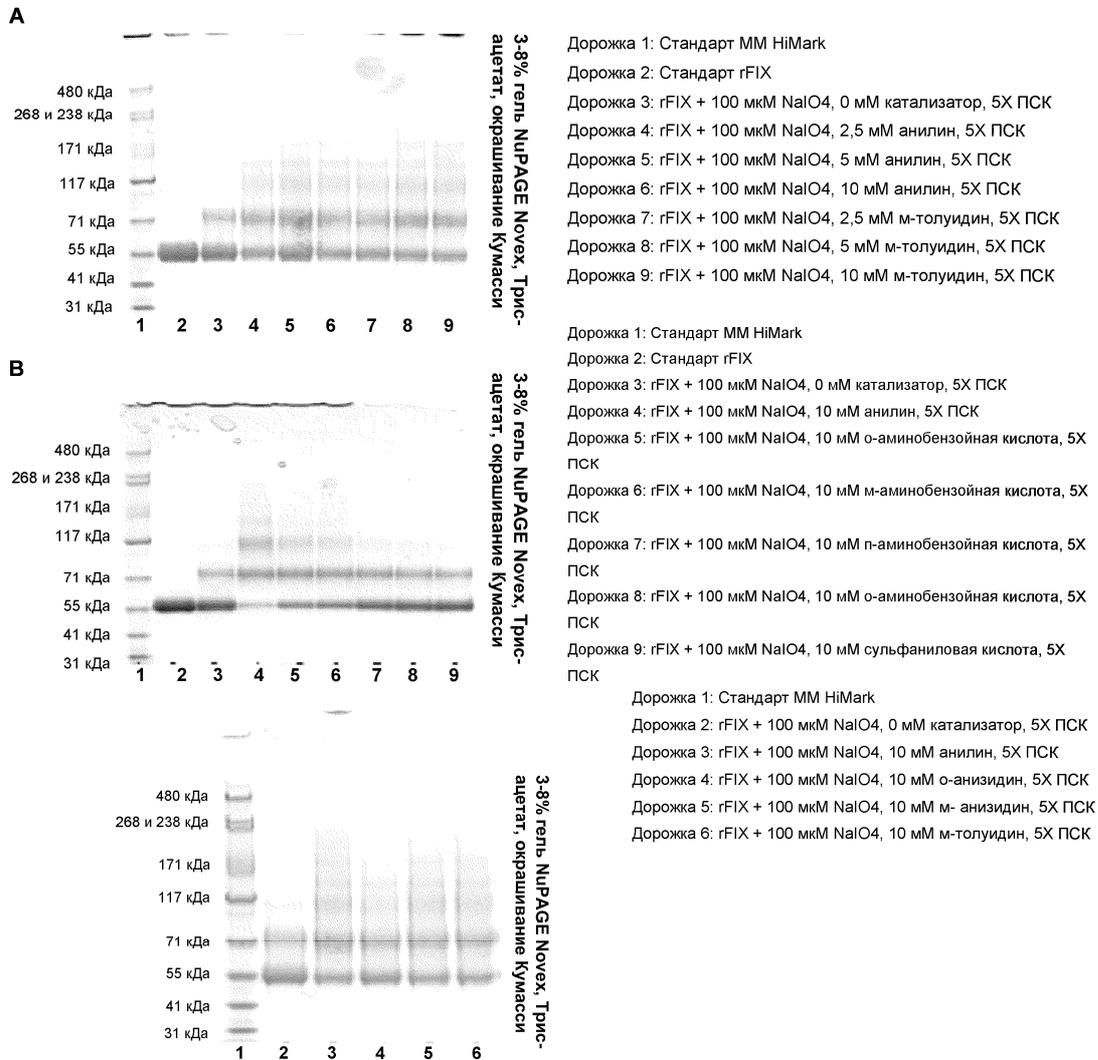
Фиг. 2



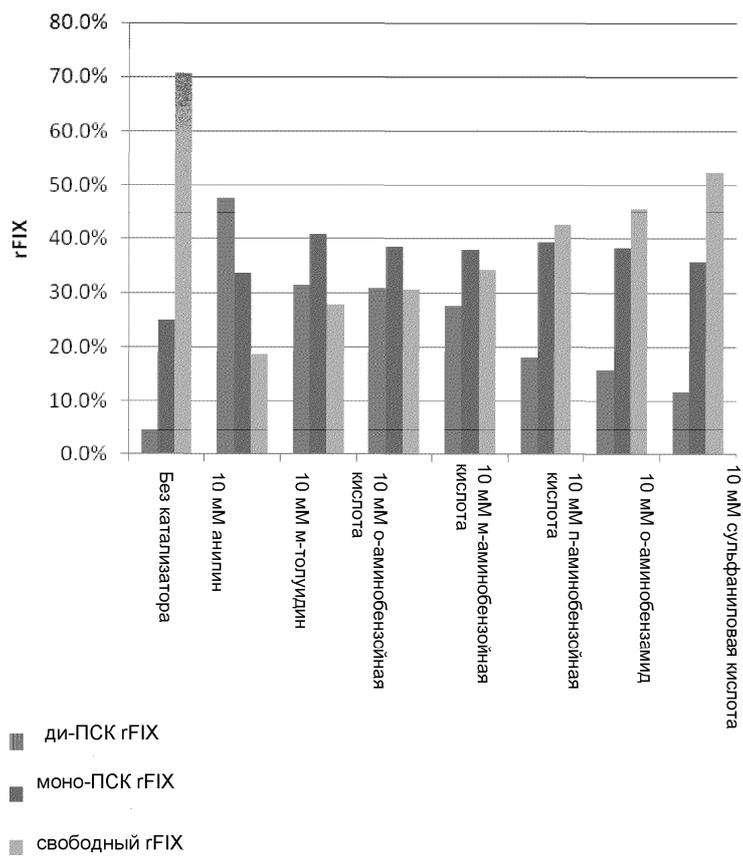
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

