



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 9/00 (2006.01); A61K 38/14 (2006.01); A61K 47/69 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015146739, 21.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.03.2014

Дата регистрации:
20.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.03.2013 JP 2013-075493

(43) Дата публикации заявки: 05.05.2017 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 20.08.2018 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.10.2015

(86) Заявка РСТ:
JP 2014/057927 (21.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/162906 (09.10.2014)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

САЙДЗО Хаято (JP),
ОТИАЙ Хирофуми (JP),
ТАДЗУРУ Кэйсукэ (JP),
СИМОДА Тайдзи (JP)

(73) Патентообладатель(и):
ГЛИТЕК, ИНК. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008113030 A2, 18.09.2008.
CARLOS J. BOSQUES et al., "Effects of
Glycosylation on Peptide Conformation: A
Synergistic Experimental and Computational
Study", JOURNAL OF THE AMERICAN
CHEMICAL SOCIETY, US, 2004, vol. 126, no.
27, p. 8421 - 8425. RU 2011118341 A, 20.11.2012.

(54) КОМПЛЕКСЫ ТИПА САХАРИДНАЯ ЦЕПОЧКА-ПОЛИПЕПТИД

(57) Реферат:

Изобретение относится к комплексам типа сахаридная цепочка-полипептид, которые могут образовывать прозрачный и однородный гидрогель в широком диапазоне pH. Комплексы сахаридная цепочка-полипептид характеризуются тем, что данный полипептид представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из 8-34

аминокислотных остатков, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки, и с данным полипептидом связана одна или несколько сахаридных цепочек, и общее число сахаридных остатков, присутствующих в одной или нескольких сахаридных цепочках, связанных с указанным полипептидом, составляет 5 или больше. 6 н. и 9 з.п. ф-лы, 7 ил., 6 табл., 10 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 9/00 (2006.01)*A61K 38/14* (2006.01)*A61K 47/69* (2017.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 9/00 (2006.01); *A61K 38/14* (2006.01); *A61K 47/69* (2006.01)(21)(22) Application: **2015146739**, **21.03.2014**(24) Effective date for property rights:
21.03.2014Registration date:
20.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
30.03.2013 JP 2013-075493(43) Application published: **05.05.2017** Bull. № 13(45) Date of publication: **20.08.2018** Bull. № 23(85) Commencement of national phase: **30.10.2015**(86) PCT application:
JP 2014/057927 (21.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/162906 (09.10.2014)Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**SAJDZO Khayato (JP),
OTIAJ Khirofumi (JP),
TADZURU Kejsuke (JP),
SIMODA Tajdzi (JP)**

(73) Proprietor(s):

GLITEK, INK. (JP)(54) **SACCHARIDE CHAIN-POLYPEPTIDE COMPLEXES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: saccharide chain-polypeptide complexes are characterized in that the polypeptide is a polypeptide comprising an amino acid sequence which is composed of 8 to 34 amino acid residues, in which polar and non-polar amino acid residues are arranged alternately, and one or more saccharide chains are bound

to the polypeptide and the total number of saccharide residues present in the one or more saccharide chains bound to said polypeptide is 5 or more.

EFFECT: invention relates to saccharide chain-polypeptide complexes that can form a transparent and homogeneous hydrogel over a wide pH range.

15 cl, 7 dwg, 6 tbl, 10 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид, у которых сахаридная цепочка связана с полипептидом.

Уровень техники

5 Биогели типа гидрогеля и фибринового клея применяются в качестве опытного матрикса для трехмерных культур, хирургического матрикса типа пре/постоперационных гемостатиков или пластырей для заживления ран, систем доставки лекарственных средств (DDS) и пр.

Однако, поскольку во многих из них используются материалы биологического происхождения, то при их применении возникают такие риски, как заражение микроорганизмами типа вирусов, иммуногенность и перенос болезней. Например, хотя фибриновый клей имеет высокую применимость в качестве кровоостанавливающего средства при операциях, однако, поскольку исходный материал получают из человеческой крови, то при его практическом применении в хирургии было много случаев заражения пациентов вирусом гепатита, которым был загрязнен фибриновый клей, что вызывает большие социальные проблемы. Существует также и проблема того, что не всегда можно обеспечить однородное качество геля у биогелей биологического происхождения.

В отличие от биогелей биологического происхождения, у биогелей, полученных путем химического синтеза, как известно, нет риска инфекции и они способны обеспечить гели однородного качества (Патентный документ 1). Однако известные к настоящему времени биогели требуют таких процедур, как замена буфера или добавление и смешивание нескольких веществ при получении геля, что осложняет работу. Кроме того, не только существуют ограничения на совместное использование реагентов или растворителей вследствие низкой растворимости в зависимости от диапазона pH, но существуют и такие проблемы, как ограниченность участков для применения (пораженных участков) и закупоривание шприцев или трубочек при использовании. Кроме того, низкая растворимость (т.е. непрозрачность), в особенности в нейтральном диапазоне, близком к биологическим значениям pH, усложняет применение в ситуациях, требующих видимости, как-то в области хирургии.

Список цитированной литературы

[Патентный документ 1] U.S. Patent No. 5670483.

Раскрытие изобретения

Цели и задачи изобретения

35 Предметом настоящего изобретения является получение таких комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид (sugar chain-polypeptide complex), которые могут образовывать прозрачный и однородный гидрогель в широком диапазоне pH.

Средства решения задач

В результате обширных исследований, проведенных авторами настоящего изобретения для решения данной проблемы, неожиданно оказалось, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид, полученные при связывании сахаридной цепочки с полипептидом, содержащим такую аминокислотную последовательность, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки, проявляют высокую растворимость в воде и образуют прозрачный и однородный гидрогель в широком диапазоне pH, в частности, в нейтральном диапазоне, что и привело к совершению настоящего изобретения.

Иными словами, настоящим изобретением предусмотрены комплексы сахаридная цепочка-полипептид, отличающиеся тем, что данный полипептид представляет собой

полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из 8-34 аминокислотных остатков, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки, и с данным полипептидом связана одна или несколько сахаридных цепочек.

5 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что данные комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут образовывать гидрогель, включающий структуру β -листа, при самосборке в водном растворе при близких к нейтральным значениях pH.

10 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что каждый из указанных полярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аспартата, остатка глутамата, остатка аргинина, остатка лизина, остатка гистидина, остатка тирозина, остатка серина, остатка треонина, остатка аспарагина, остатка глутамина и остатка цистеина.

15 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что каждый из указанных неполярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аланина, остатка валина, остатка лейцина, остатка изолейцина, остатка метионина, остатка фенилаланина, остатка триптофана, остатка пролина и остатка глицина.

20 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что каждый из указанных полярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аспартата, остатка глутамата, остатка аргинина и остатка треонина, а каждый из указанных неполярных аминокислотных остатков представляет собой остаток аланина.

25 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что данная аминокислотная последовательность представляет собой повторяющуюся последовательность "RADA" или повторяющуюся последовательность "RATARA EA".

30 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что данная аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 1), RADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2) и RATARA E ARATARA EA (SEQ ID NO. 3).

Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что общее число сахаридных остатков, присутствующих в одной или нескольких сахаридных цепочках, связанных с данным полипептидом, составляет 5 или больше.

35 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 1, 2 или 3.

40 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что сахаридные цепочки связаны с каждой аминокислотой вплоть до положения x, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, и каждой аминокислотой вплоть до положения y, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце (где x и y - целые числа, $x \geq 0$, $y \geq 0$, а $x+y$ есть общее количество сахаридных цепочек, связанных с полипептидом).

45 Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 1, 2 или 3, причем, если количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 1, то данная одна сахаридная цепочка связана с аминокислотным остатком, расположенным на N-конце данного полипептида, или с аминокислотным остатком, расположенным на C-конце,

если количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 2, то данные две сахаридные цепочки связаны с аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-3 ниже:

(1) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида,

(2) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, и

(3) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, и аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, а

если количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 3, то данные три сахаридные цепочки связаны с любыми аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-4 ниже:

(1) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида,

(2) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида,

(3) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, а также от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, и

(4) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, а также аминокислотных остатков, расположенных в положениях 1 и 2, считая от C-конца данного полипептида.

Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что данная сахаридная цепочка представляет собой сахаридную цепочку с разветвлением.

Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что данная сахаридная цепочка представляет собой сахаридную цепочку, выбранную из группы, состоящей из дисахаридной цепочки, асидосахаридной цепочки, diGlcNAc-сахаридной цепочки, диманнозосахаридной цепочки, GlcNAc-сахаридной цепочки, мальтотриозной сахаридной цепочки, мальтозной сахаридной цепочки,

мальтотетразной сахаридной цепочки, мальтогептаозной сахаридной цепочки, β -циклодекстрина и γ -циклодекстрина.

Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что оно представляет собой композицию для получения гидрогеля, содержащую комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению. Кроме того, такая композиция для получения гидрогеля может представлять собой гемостатическую фармацевтическую композицию, композицию носителя для контролируемого высвобождения или композицию матрикса для культивирования.

Далее, одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что оно представляет собой композицию, содержащую комплекс сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, причем данная композиция находится в состоянии гидрогеля. Кроме того, такая композиция для получения гидрогеля может представлять собой гемостатическую фармацевтическую композицию, композицию носителя для контролируемого высвобождения или композицию матрикса для культивирования.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что любые комбинации одной или нескольких характеристик настоящего изобретения, описанных выше, также входят в рамки настоящего изобретения.

Эффекты изобретения

Поскольку комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему

изобретению обладают высокой растворимостью в воде в широком диапазоне pH, включая и нейтральный диапазон, и образуют однородный и прозрачный гидрогель, то они менее подвержены ограничениям по реагентам или растворителям, которые применяются в комбинации, и могут использоваться для различных применений. Кроме того, поскольку они могут применяться в широком диапазоне pH, то они менее подвержены ограниченности участков для применения (пораженных участков).

Далее, поскольку комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению обладают высокой растворимостью в воде в широком диапазоне pH, включающем и нейтральный диапазон, и образуют однородный и прозрачный гидрогель, то при нейтральном pH могут обратимо присутствовать состояния золя и геля. Иными словами, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут сначала образовать состояние геля, а затем перейти в состоянии золя при механическом перемешивании и опять перейти в состояние геля. Соответственно, они могут расширяться в состоянии геля (т.е. в готовом к применению состоянии) и не требуют сложных операций, как с другими пептидными гелями, типа замены (или добавления) буфера для достижения нейтрального pH после образования геля при подходящем для гелеобразования pH (например, при кислом pH). Иными словами, комплексы сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению сильно превосходят по работоспособности другие пептидные гели. Кроме того, поскольку диапазон pH, при котором могут применяться комплексы сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, шире, то будут реже возникать такие проблемы, как закупоривание шприцев или трубок при использовании.

Далее, поскольку комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению модифицированы такими сахаридными цепями, которые существуют *in vivo* у животных, то уменьшается антигенность по сравнению с пептидами без каких-либо модификаций. Кроме того, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению почти не дают риска возникновения токсичности типа той, что наблюдается у соединений, модифицированных, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Соответственно, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению обладают высокой безопасностью для биологического применения.

Далее, из приведенных здесь примеров также видно, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образуют более прозрачный и однородный гидрогель по сравнению с полипептидами, связанными с ПЭГ.

Далее, поскольку комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образуют однородный и прозрачный гидрогель при физиологических условиях (нейтральный диапазон pH) и обладают низкой антигенностью, то они предпочтительны в качестве гидрогеля для применения на животных *in vivo*.

В частности, поскольку для гидрогелей, содержащих комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, характерна сохранность состояния прозрачного и однородного геля даже в условиях, включающих высокую концентрацию плазмы крови при нейтральном pH, то они имеют высокую применимость, например, в качестве кровоостанавливающих средств.

Далее, поскольку гидрогели, содержащие комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, дают высокое контролируемое высвобождение при инкапсуляции и кислых, и основных белков при нейтральном pH, то они имеют высокую применимость в качестве носителя для контролируемого высвобождения различных веществ.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены фотографии, показывающие результаты испытания на нагрузку стальным шариком для (RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при различных значениях pH.

На фиг. 2 представлены фотографии, показывающие результаты испытания на нагрузку стальным шариком для (RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при содержании плазмы крови в различных концентрациях.

На фиг. 3 представлены графики, показывающие результаты измерения эффекта контролируемого высвобождения для (RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при инкапсулировании кислого белка.

На фиг. 4 представлены графики, показывающие результаты измерения эффекта контролируемого высвобождения для (RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при инкапсулировании основного белка.

На фиг. 5 представлены графики, показывающие результаты измерения кругового дихроизма (CD) для (RADA)₄ при pH 2 или pH 7.

На фиг. 6 представлены графики, показывающие результаты измерения кругового дихроизма (CD) для C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при pH 2 или pH 7.

На фиг. 7 представлены графики, показывающие результаты измерения кинетической вязкости для (RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при pH 7.

Осуществление изобретения

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению могут иметь биологическое происхождение или могут быть получены путем химического синтеза, но предпочтительно их получают путем химического синтеза по соображениям устойчивости и безопасности или качества и однородности сахаридных цепей.

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению могут образовываться, например, путем самосборки в водном растворе посредством таких взаимодействий, как электростатические взаимодействия между пептидными молекулами, водородные связи и гидрофобные взаимодействия. "Самосборка" комплексов сахаридная цепочка-полипептид в водном растворе в настоящем изобретении означает то, что полипептиды спонтанно собираются друг с другом посредством какого-либо рода взаимодействий (например, электростатических взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил или гидрофобного взаимодействия) в водном растворе, и это не должно восприниматься в ограничительном смысле.

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению могут подвергаться самосборке с образованием структуры β-листа в водном растворе. Далее, при многократном наслаивании данных β-листных структур может образоваться гидрогель. Методы для подтверждения того, что комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид образует структуру β-листа в водном растворе, не имеют особых ограничений, так что это можно проверить, например, путем измерения кругового дихроизма (CD) водного раствора, содержащего комплекс сахаридная цепочка-полипептид. Поскольку вообще для молекул, имеющих структуру β-листа, характерно положительное поглощение при длине волны около 197 нм и отрицательное поглощение при длине волны около 216 нм, то образование структур типа β-листа может быть подтверждено путем проверки пиков вокруг этих длин волн путем измерения кругового дихроизма.

Поскольку комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность, в которой чередуются

полярные и неполярные аминокислотные остатки, то при формировании структуры β -листа в водном растворе на одной стороне β -листовой структуры могут располагаться только полярные аминокислотные остатки, а на другой стороне могут располагаться только неполярные аминокислотные остатки. Соответственно, такие β -листовые структуры могут собираться таким образом, чтобы гидрофобные стороны (стороны только с неполярными аминокислотными остатками) складывались с образованием двухслойной структуры. Затем эта сложенная β -листовая структура будет наращиваться по мере прогрессирования молекулярной самосборки с образованием трехмерной конформации (например, гидрогеля). Полипептид, имеющий такую природу, может быть описан здесь как SAP (самособирающийся пептид).

"Значение pH близко к нейтральному" в настоящем изобретении означает то, что значение pH составляет около 7,0, более конкретно pH находится в диапазоне 5,0-9,0, а предпочтительно pH находится в диапазоне 6,0-8,0.

Одно воплощение настоящего изобретения характеризуется тем, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут подвергаться самосборке в водном растворе при близком к нейтральному pH с образованием гидрогеля, содержащего структуры типа β -листа. При этом не исключаются и такие, которые могут подвергаться самосборке даже в водном растворе с другим значением pH, а не близким к нейтральному, с образованием гидрогеля, содержащего структуры β -листа, если только они обладают данной характеристикой.

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки. Длина такой аминокислотной последовательности не имеет ограничений, а предпочтительно такая аминокислотная последовательность может состоять из 8-34 аминокислотных остатков, более предпочтительно из 12-25 аминокислотных остатков и еще более предпочтительно из 16-21 аминокислотного остатка.

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки. При этом термин "аминокислота" применяется в самом широком смысле и включает не только входящие в состав белков аминокислоты, но и не входящие в состав белков аминокислоты типа вариантов и производных аминокислот. Специалистам должно быть известно, в свете этого широкого определения, что примеры аминокислот включают входящие в состав белков L-аминокислоты; D-аминокислоты; химически модифицированные аминокислоты типа вариантов и производных аминокислот; не входящие в состав белков аминокислоты, как-то норлейцин, β -аланин и орнитин, а также химически синтезированные соединения, обладающие хорошо известными, характерными для аминокислот свойствами. Примеры не входящих в состав белков аминокислот включают α -метиламинокислоты (типа α -метилаланина), D-аминокислоты, гистидиноподобные аминокислоты (как-то 2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин, α -фторметилгистидин и α -метилгистидин), аминокислоты с липшим метиленом в боковой цепи ("гомо"-аминокислоты) и такие аминокислоты, у которых карбоксильная функциональная группа в боковой цепи аминокислоты замещена сульфонатной группой (типа цистеиновой кислоты). В предпочтительном аспекте настоящего изобретения используются такие аминокислоты, которые входят в состав белков.

Полярные аминокислотные остатки в настоящем изобретении не имеют особых ограничений, если только это аминокислотные остатки, у которых боковые цепи могут

обладать полярностью, а примеры таковых включают кислые аминокислотные остатки и основные аминокислотные остатки. При этом примеры кислых аминокислотных остатков включают остатки аспарагиновой кислоты (Asp/D) и глутаминовой кислоты (Glu/E), а примеры основных аминокислот включают аргинин (Arg/R), лизин (Lys/K) и гистидин (His/H).

Отметим, что такие обозначения, к примеру, как "аспарагиновая кислота (Asp/D)" в настоящем изобретении означают то, что для сокращенного обозначения аспарагиновой кислоты может использоваться и трехбуквенное обозначение "Asp", и однобуквенное обозначение "D".

Кроме того, в настоящем описании из числа остатков нейтральных аминокислот к полярным аминокислотным остаткам относятся аминокислотные остатки, содержащие гидроксильную группу, кислую амидную группу, тиоловую группу и т.п., поскольку они обладают полярностью. Например, в настоящем описании тирозин (Tyr/Y), серин (Ser/S), треонин (Thr/T), аспарагин (Asn/N), глутамин (Gln/Q) и цистеин (Cys/C) относятся к полярным аминокислотным остаткам.

Неполярные аминокислотные остатки в настоящем изобретении не имеют особых ограничений, если только это аминокислотные остатки, у которых боковые цепи не обладают полярностью, а примеры таковых включают аланин (Ala/A), валин (Val/V), лейцин (Leu/L), изолейцин (Ile/I), метионин (Met/M), фенилаланин (Phe/F), триптофан (Trp/W), глицин (Gly/G) и пролин (Pro/P).

У комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению "аминокислотная последовательность, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки" предпочтительно такова, что она представляет собой повторяющуюся последовательность "RADA" (2-8 повторов, предпочтительно 3-6 повторов) или повторяющуюся последовательность "RATARA EA" (1-4 повтора, предпочтительно 2-3 повтора), а более предпочтительно она представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 1), RADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2) и RATARA E ARATARA EA (SEQ ID NO. 3).

"Сахаридная цепочка" в настоящем изобретении означает соединение, состоящее из цепочки из одного или нескольких звеньев сахаридов (моносахаридов и/или их производных). Если это цепочка из двух звеньев сахаридов, то каждое звено сахараида соединяется друг с другом гликозидной связью путем дегидратационной конденсации. Примеры таких сахаридных цепочек включают, без ограничения, широкий спектр моносахаридов и полисахаридов, встречающихся *in vivo* (глюкоза, галактоза, манноза, фукоза, ксилоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, сиаловая кислота и их комплексы и производные), а также сахаридные цепочки, которые являются продуктами деградации или разрушения сложных биомолекул типа продуктов деградации полисахаридов, гликопротеинов, протеогликанов, гликозаминогликанов и гликолипидов. Сахаридные цепочки могут быть линейными или разветвленными.

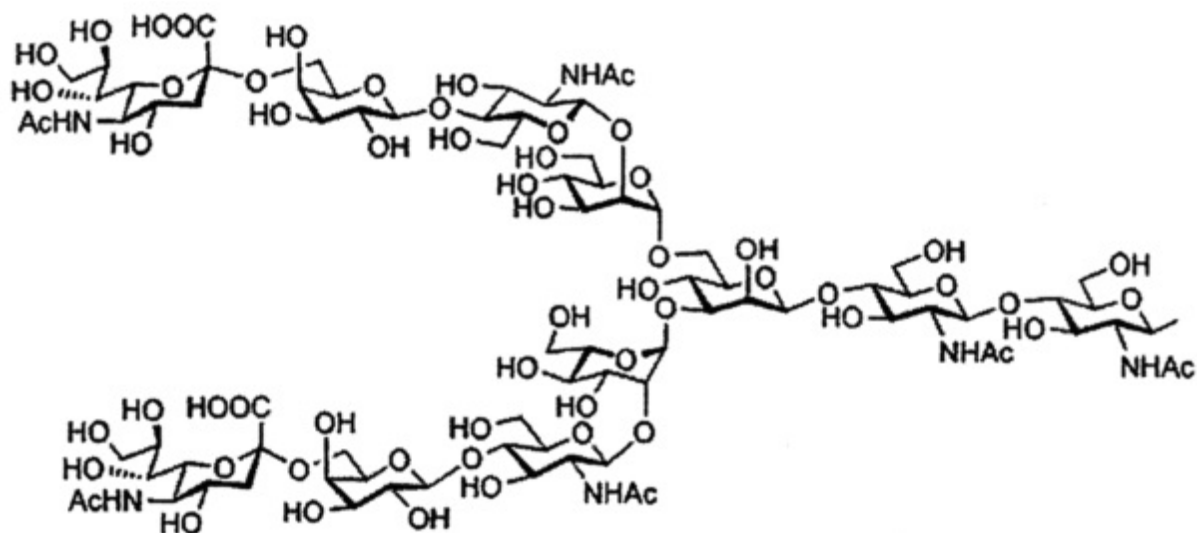
"Сахаридные цепочки" в настоящем изобретении также включают и производные сахаридные цепочки. Примеры производных сахаридных цепочек включают, без ограничения, такие сахаридные цепочки, в которых сахарид, конфигурирующий сахаридную цепочку, представлен, к примеру, сахаридом, содержащим карбоксильную группу (например, альдоновой кислотой, у которой положение C-1 подверглось окислению до карбоновой кислоты типа D-глюконовой кислоты, которая является окисленной D-глюкозой, или уруновой кислотой, у которой концевой атом C превратился в карбоновую кислоту типа D-глюкуроновой кислоты, которая является

окисленной D-глюкозой), сахаридом, содержащим аминогруппу или производное аминогруппы типа D-глюкозамина и D-галактозамина, сахаридом, содержащим и амино-, и карбоксильную группу типа N-гликозилнейраминовой кислоты и N-ацетилмурамовой кислоты), дезоксилированным сахаром типа 2-дезоксид-рибозы, сульфатированным сахаром, содержащим сульфатную группу, или фосфорилированным сахаром, содержащим фосфатную группу.

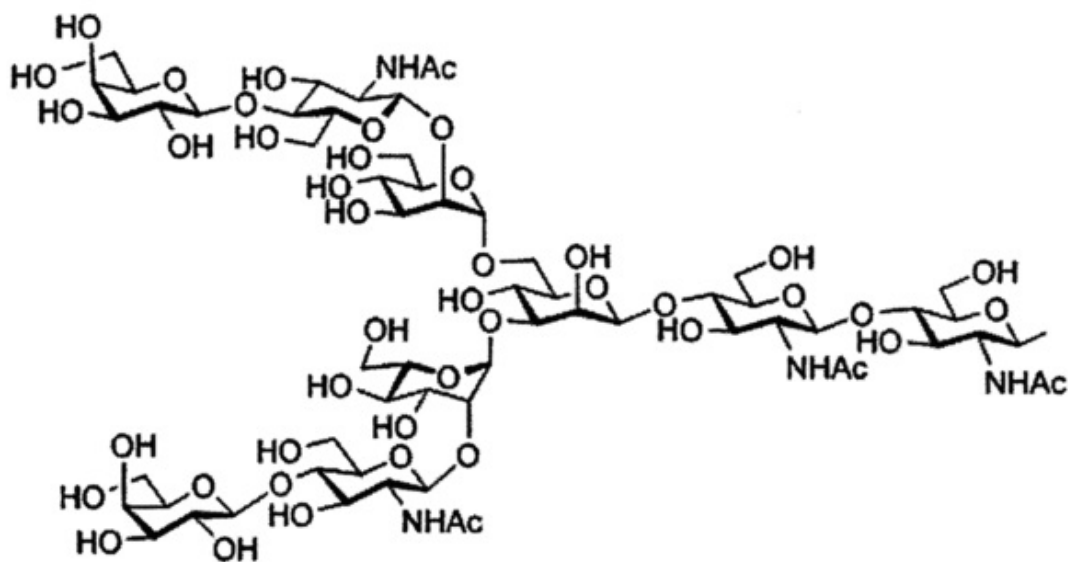
У комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению сахаридная цепочка, которая соединяется с полипептидом, не имеет особых ограничений, но предпочтительно это сахаридная цепочка, которая существует *in vivo* в виде гликоконъюгата типа гликопептида или гликопротеина, протеогликана или гликолипида, по соображениям биосовместимости. Такие сахаридные цепочки включают N-связанные сахаридные цепи, O-связанные сахаридные цепи и т.п., то есть сахаридные цепочки, которые связаны *in vivo* с пептидами или белками в виде гликопептидов или гликопротеинов.

У комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению для сахаридной цепочки, которая соединяется с полипептидом, может использоваться, к примеру, дисахаридная цепочка, асидсахаридная цепочка, diGlcNAc-сахаридная цепочка, диманнозсахаридная (diMan) цепочка, GlcNAc-сахаридная цепочка, мальтотриозная сахаридная цепочка, мальтозная сахаридная цепочка, мальтотетраозная сахаридная цепочка, мальтогептаозная сахаридная цепочка, сахаридная цепочка β -циклодекстрина и сахаридная цепочка γ -циклодекстрина.

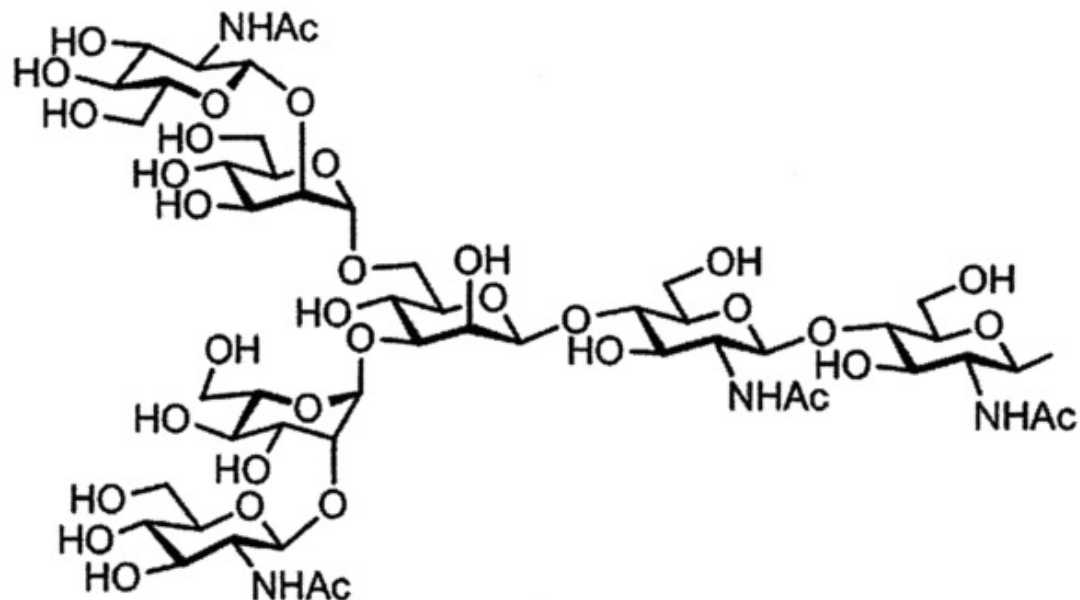
В частности, сахаридная цепочка, используемая в настоящем изобретении, может представлять собой дисахаридную цепочку, представленную следующей формулой (1), асидсахаридную цепочку, представленную следующей формулой (2), diGlcNAc-сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (3), диманнозсахаридную цепочку, представленную следующей формулой (4), GlcNAc-сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (5), мальтотриозную сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (6), мальтозную сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (7), мальтотетраозную сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (8), мальтогептаозную сахаридную цепочку, представленную следующей формулой (9), сахаридную цепочку β -циклодекстрина, представленную следующей формулой (10), или сахаридную цепочку γ -циклодекстрина, представленную следующей формулой (10-2).



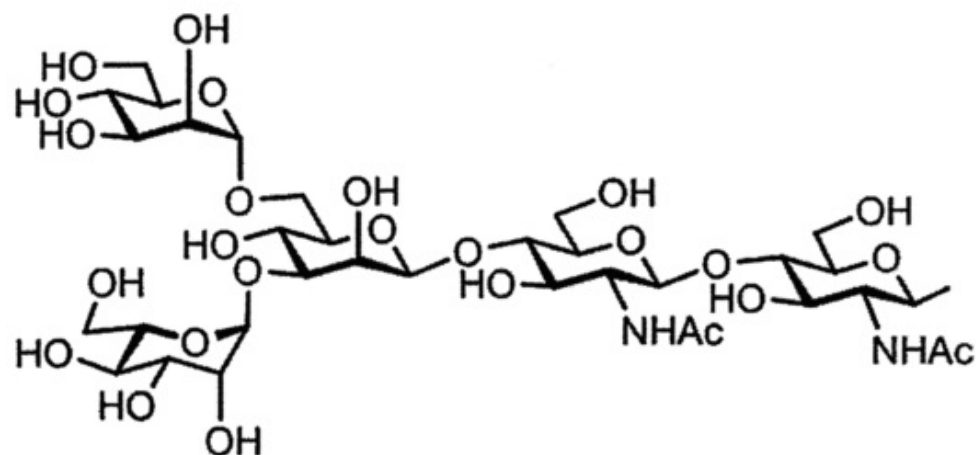
Формула (1). Дисахаридная цепочка



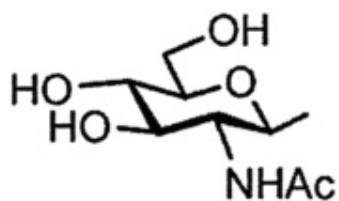
Формула (2). Асиалосахаридная цепочка



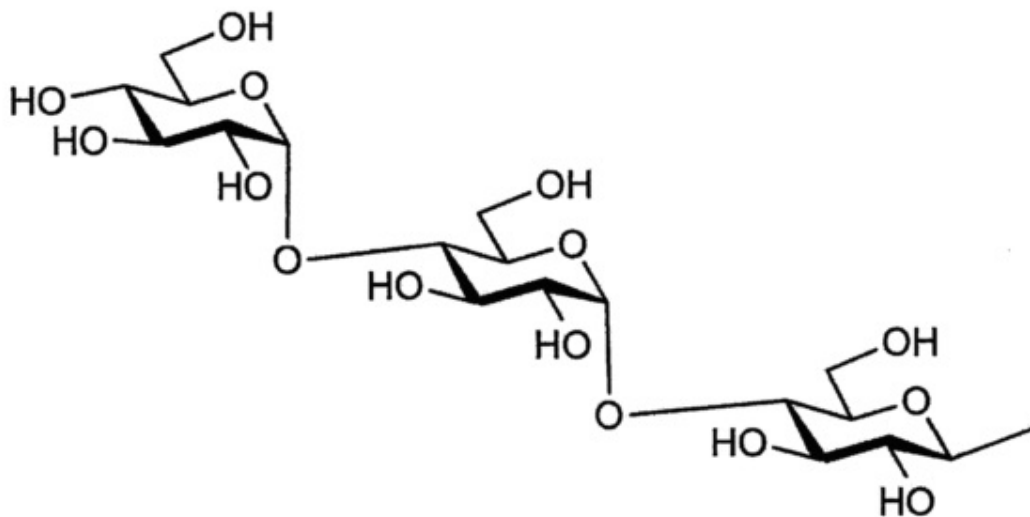
Формула (3). DiGlcNAc-сахаридная цепочка



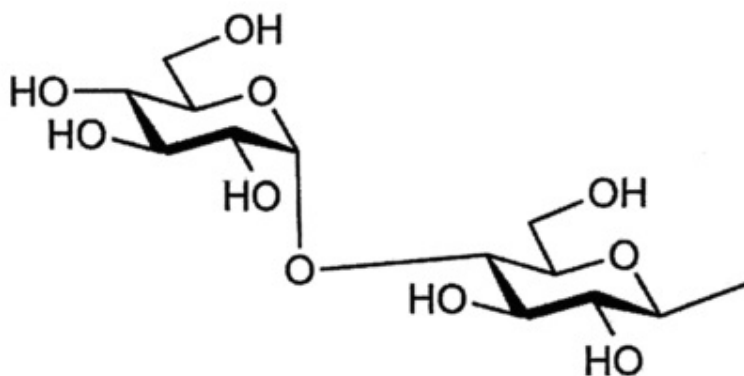
Формула (4). Диманнозосахаридная цепочка



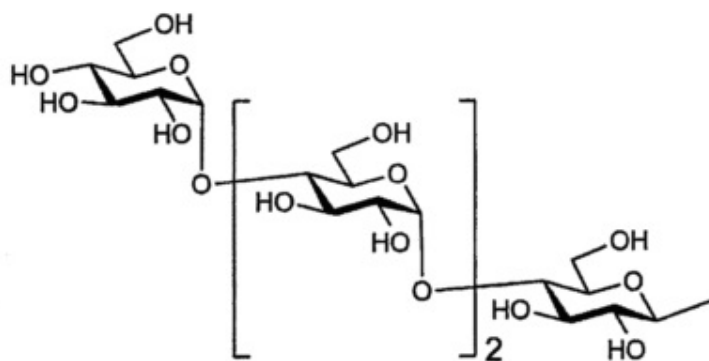
Формула (5). GlcNAc-сахаридная цепочка



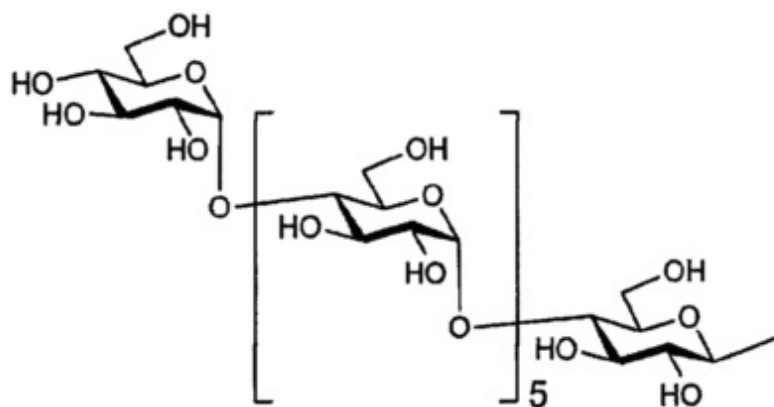
Формула (6). Мальтотриозная сахаридная цепочка



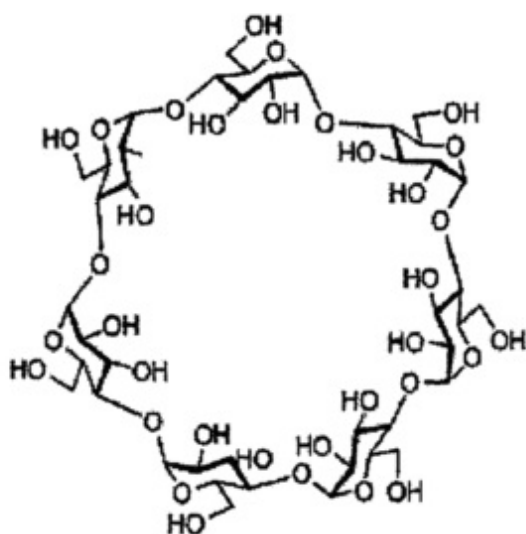
Формула (7). Мальтозная сахаридная цепочка



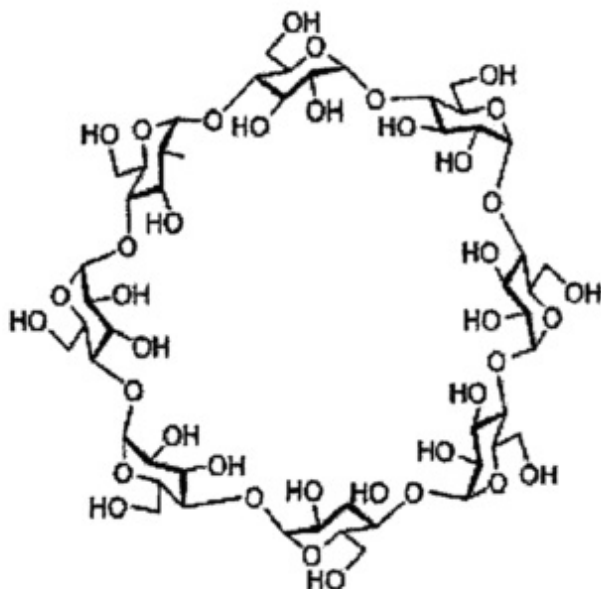
Формула (8). Мальтотетраозная сахаридная цепочка



Формула (9). Мальтогептаозная сахаридная цепочка



Формула (10). Сахаридная цепочка β -циклодекстрина



Формула (10-2). Сахаридная цепочка γ -циклодекстрина

В настоящем изобретении можно использовать и такие сахаридные цепочки, у

которых отсутствует один или несколько сахаров из невосстанавливающегося конца вышеприведенной дисахаридной цепочки, асидосахаридной цепочки, diGlcNAc-сахаридной цепочки, диманнозосахаридной цепочки или мальтогептаозной сахаридной цепочки.

5 В настоящем изобретении остаток аминокислоты, с которым связана сахаридная цепочка, не имеет особых ограничений. Например, сахаридная цепочка может быть связана с цистеином (Cys/C) или аспарагином (Asn/N), предпочтительно с цистеином (Cys/C).

10 В настоящем изобретении способ связывания сахаридной цепочки с аминокислотой не имеет особых ограничений. Например, сахаридная цепочка может непосредственно связываться с остатком аминокислоты или же она может связываться с остатком аминокислоты через линкер.

Кроме того, в настоящем изобретении остаток аминокислоты, с которым связана сахаридная цепочка, может непосредственно связываться с "аминокислотной последовательностью, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки" или же он может связываться, например, через линкер.

Примеры таких линкеров включают алкильные цепи или цепи PEG, содержащие амино- и карбоксигруппы на обоих концах так, что они могут образовывать пептидные связи с аминокислотами. Примеры таких линкеров включают $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$ (где n 20 означает целое число без ограничений, если только оно не ингибирует нужную функцию линкера, а предпочтительно оно составляет 1-15) или $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-}$ (где m означает целое число без ограничений, если только оно не ингибирует нужную функцию линкера, а предпочтительно оно составляет 1-7), в частности $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-CO-}$ (C12-линкер) или $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO-}$ (PEG-линкер) и др.

35 Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению могут быть получены путем добавления стадии гликозилирования в метод синтеза полипептидов, хорошо известный специалистам. Хотя для гликозилирования можно применять методы с использованием ферментов, представленных трансглутаминазой, но при этом возникают такие проблемы, как необходимость добавления большого количества сахаридной цепочки, сложности с очисткой после заключительной стадии и ограниченность положений гликозилирования и тех сахаридных цепочек, которые можно добавлять. Поэтому, хотя он может применяться при небольших масштабах синтеза, как-то для анализа, однако его нельзя назвать практическим способом для 40 производства в больших масштабах.

В качестве конкретных примеров легкого способа получения комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению ниже будет представлен способ получения комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид с помощью Asn, содержащего связанную с ним сахаридную цепочку (гликозилированного Asn), с 40 применением таких хорошо известных методов синтеза пептидов, как твердофазный и жидкофазный синтез (способ А), и способ получения комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид путем получения полипептида, в котором произвольный аминокислотный остаток представлен Cys, в соответствии с хорошо известным методом пептидного синтеза, с последующим гликозилированием этого Cys путем химического 45 синтеза (способ В). Специалисты в данной области смогут получать комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид различными методами, исходя из этих способов получения.

Эти способы А и В также могут выполняться в виде комбинации из двух или

нескольких. В случае синтеза в небольших масштабах типа для анализа и т.п., вышеуказанный способ также может применяться в сочетании с реакцией элонгации сахаридной цепочки при помощи трансферазы. Способ А описан в WO No. 2004/005330 (US 2005222382 A1), а способ В описан в WO No. 2005/010053 (US 2007060543 A1),
 5 содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте. Кроме того, получение сахаридных цепочек, имеющих однородную структуру, используемых в способах А и В, описано, например, в WO No. 03/008431 (US 2004181054 A1), WO No. 2004/058984 (US 2006228784 A1), WO No. 2004/058824 (US 2006009421 A1), WO No. 2004/070046 (US 2006205039 A1) и WO No. 2007/011055, содержание которых включено сюда
 10 путем ссылки во всей полноте.

Способ получения комплексов сахаридная цепочка-полипептид (способ А)

Как изложено ниже, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут быть получены, например, методом твердофазного синтеза с использованием Asn, содержащего связанную с ним сахаридную цепочку.

15 (1) Карбоксильная группа аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, связывается со смолой. При этом, поскольку азот аминогруппы этой аминокислоты блокирован липофильной защитной группой, то предотвращается автоконденсация аминокислот друг с другом, а аминокислота реагирует со смолой с образованием связи.

20 (2) Липофильная защитная группа полученного реактанта отделяется с образованием свободной аминогруппы.

(3) Эта свободная аминогруппа подвергается реакции амидирования с карбоксильной группой другой аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой.

25 (4) Данная липофильная защитная группа отделяется с образованием свободной аминогруппы.

(5) Вышеприведенные стадии (3) и (4) повторяются один или несколько раз, образуя пептид из любого количества соединенных вместе аминокислот, который связан со смолой на одном конце и содержит свободную аминогруппу на другом конце.

30 (6) Если свободная аминогруппа пептида, синтезированного на стадии (5), должна быть защищена ацетильной группой, то она предпочтительно ацетируется с помощью уксусного ангидрида, уксусной кислоты и т.п.

(7) Наконец, смола отщепляется с помощью кислоты и получается пептид, имеющий искомую аминокислотную последовательность.

35 При этом, если вместо аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, использовать гликозилированный Asn, у которого азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, и провести реакцию карбоксильной группы данной молекулы аспарагина с гидроксильной группой смолы на стадии (1), то можно получить пептид, содержащий гликозилированный Asn на С-
 40 конце.

Более того, если после стадии (2) или после повторения стадий (3) и (4) любое количество раз, то есть один или несколько раз, вместо аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, на стадии (3) использовать гликозилированный Asn, у которого азот аминогруппы блокирован липофильной
 45 защитной группой, то можно связать сахаридную цепочку в любом положении полипептида.

Таким образом, если на любой из стадий (1) и (3) вместо аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, два или несколько

раз использовать гликозилированный Asn, у которого азот аминокетильной группы блокирован липофильной защитной группой, то можно связать сахаридные цепочки в любых двух или нескольких положениях полипептида.

Если после связывания гликозилированного Asn отделить липофильную защитную группу с образованием свободной аминокетильной группы и сразу же после этого провести стадию (7), то можно получить полипептид, содержащий гликозилированный Asn на N-конце.

Смолой, обеспечивающей C-конец в виде амидной группы, может быть смола, которая обычно используется при твердофазном синтезе. Например, предпочтительно используется смола Rink-Amide, которая функционализована аминокетильной группой (фирмы Merck & Co., Inc.), смола Rink-Amide-PEGA (фирмы Merck & Co., Inc.) или смола NH-SAL (фирмы Watanabe Chemical Industries, Ltd.). Кроме того, смола Fmoc-NH-SAL-линкер (фирмы Watanabe Chemical Industries, Ltd.) и т.п. может связываться со смолой Arnino-PEGA, которая функционализована аминокетильной группой (фирмы Merck & Co., Inc.) и др. C-концевую аминокетильную кислоту пептида можно амидировать путем отщепления пептида от этой смолы с помощью кислоты.

Кроме того, примерами смол, превращающих C-конец в карбоновую кислоту, которые можно использовать, являются 2-хлортритилхлоридная смола, функционализованная хлором (фирмы Merck & Co., Inc.), смола Amino-PEGA, функционализованная аминокетильной группой (фирмы Merck & Co., Inc.), спиртовая смола NovaSyn TGT, содержащая гидроксильные группы (фирмы Merck & Co., Inc.), смола Wang (фирмы Merck & Co., Inc.), смола HMPA-PEGA (фирмы Merck & Co., Inc.) и др. Кроме того, между смолой Amino-PEGA и аминокетильной кислотой может находиться линкер, а примеры таких линкеров включают 4-гидроксиметилфеноксиуксусную кислоту (HMPA), 4-(4-гидроксиметил-3-метоксифенокси)-бутилуксусную кислоту (HMPB) и др. Также можно использовать смолу H-Cys(Trt)-Trityl Nova PEG, у которой C-концевая аминокетильная кислота заранее связана со смолой (фирмы Merck & Co., Inc.).

В отношении связывания между собой смолой и аминокетильной кислотой, у которой азот аминокетильной группы блокирован липофильной защитной группой, например, для того, чтобы использовать смолу, содержащую гидроксильные группы, или смолу, функционализованную хлором, карбоксигруппу аминокетильной кислоты подвергают сложноэфирной связи со смолой. Кроме того, при использовании смолы, функционализованной аминокетильной группой, карбоксигруппу аминокетильной кислоты связывают со смолой посредством амидной связи.

Следует отметить, что 2-хлортритилхлоридная смола предпочтительна тем, что она может предотвратить рацемизацию концевой Cys при удлинении пептидной цепи при твердофазном синтезе.

Способ получения комплексов сахаридная цепочка-полипептид (способ A-2)

Как изложено ниже, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут быть получены, например, методом жидкофазного синтеза с использованием Asn, содержащего связанную с ним сахаридную цепочку.

(1) Карбоксильная группа аминокетильной кислоты, у которой азот аминокетильной группы блокирован липофильной защитной группой, связывается с аминокетильной кислотой, у которой аминокетильная группа свободна, а карбоксильная группа блокирована или амидирована.

(2) Липофильная защитная группа полученного реактанта отделяется с образованием свободной аминокетильной группы.

(3) Эта свободная аминокетильная группа подвергается реакции амидирования с карбоксильной группой другой аминокетильной кислоты, у которой азот аминокетильной группы блокирован липофильной защитной группой, в растворе. При этом, поскольку азот аминокетильной группы этой

аминокислоты на N-концевой стороне блокирован липофильной защитной группой, а карбоксильная группа на C-концевой стороне блокирована или амидирована, то предотвращается автоконденсация аминокислот друг с другом, а свободная аминогруппа реагирует с карбоксильной группой с образованием связи.

5 (4) Данная липофильная защитная группа отделяется с образованием свободной аминогруппы.

(5) Вышеприведенные стадии (3) и (4) повторяются один или несколько раз, образуя пептид из любого количества соединенных вместе аминокислот, у которого C-концевая карбоксильная группа блокирована или амидирована, а N-конце содержится свободная аминогруппа.

10 (6) Если свободная аминогруппа пептида, синтезированного на стадии (5), должна быть защищена ацетильной группой, то она предпочтительно ацетируется с помощью уксусного ангидрида, уксусной кислоты и т.п.

(7) Наконец, отщепляется липофильная защитная группа боковой цепи с помощью 15 кислоты и получается пептид, имеющий искомую аминокислотную последовательность.

Способ получения комплексов сахаридная цепочка-полипептид ("способ А-3")

Как изложено ниже, комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид могут быть получены, например, методом синтеза фрагментов с использованием Asn, содержащего связанную с ним сахаридную цепочку.

20 (1) На смоле синтезируется полипептид или комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, у которого азот аминогруппы блокирован ацетильной группой или липофильной защитной группой, по стадиям (1)-(6) вышеприведенного способа получения комплексов сахаридная цепочка-полипептид (способа А).

(2) Полипептид или комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид отщепляется от 25 смолы в условиях, при которых не происходит деблокирования защитной группы боковой цепи, образуя полипептид или комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, содержащий свободный карбоксил на C-конце и аминогруппу на N-конце, у которой азот блокирован ацетильной группой или липофильной защитной группой.

(3) Полученный полипептид или комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, у 30 которого азот аминогруппы блокирован ацетильной группой или липофильной защитной группой, соединяется со смолой или полипептидом методом твердофазного или жидкофазного синтеза.

(4) Данная липофильная защитная группа отделяется с образованием свободной аминогруппы.

35 (5) Вышеприведенные стадии (3) и (4) повторяются один или несколько раз, образуя пептид из любого количества соединенных вместе аминокислот.

(6) Наконец, смола отщепляется с помощью кислоты и получается пептид, имеющий искомую аминокислотную последовательность.

Примеры липофильных защитных групп включают защитные группы на основе 40 карбонатов или амидов и т.п., как-то 9-флуоренилметоксикарбонильная группа (Fmoc), трет-бутилоксикарбонильная группа (Boc), бензильная группа, аллильная группа, аллилоксикарбонильная группа и ацетильная группа. Для того чтобы ввести липофильную защитную группу в аминокислоту, к примеру, ввести группу Fmoc, введение может осуществляться добавлением 9-фторенилметил-N- 45 сукцинимидилкарбоната и бикарбоната натрия и проведения реакции. Реакция может проводиться при 0-50°C, предпочтительно при комнатной температуре в течение 1-5 ч.

В качестве аминокислоты, блокированной липофильной защитной группой, можно

использовать и коммерчески доступные, примеры которых включают Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Tyr-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys-OH, Fmoc-Arg-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Cys-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH и Fmoc-Pro-OH.

Кроме того, примеры блокированных липофильной защитной группой аминокислот, содержащих защитную группу, введенную в боковую цепь, включают Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(StBu)-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH и Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

Кроме того, если нужно добавить линкер в аминокислотную последовательность конъюгата сахаридная цепочка-полипептид, то можно вставить линкер в предпочтительном положении, используя в процессе твердофазного синтеза линкер, блокированный липофильной защитной группой, вместо вышеуказанной аминокислоты, блокированной липофильной защитной группой.

При использовании 2-хлортритилхлоридной смолы этерификация может проводиться с использованием такого основания, как диизопропилэтиламин (DIPEA), триэтиламин, пиридин или 2,4,6-коллиндин. Кроме того, при использовании смолы, содержащей гидроксильные группы, в качестве катализатора этерификации можно использовать, к примеру, хорошо известные дегидратационные конденсирующие реагенты, такие как 1-мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазол (MSNT), дициклогексилкарбодиимид (DCC) и диизопропилкарбодиимид (DIC). Соотношение между аминокислотой и дегидратационным конденсирующим реагентом обычно составляет 1 экв. первого к 1-10 экв., предпочтительно к 2-5 экв. последнего.

Реакция этерификации предпочтительно проводится, например, путем внесения смолы в твердофазную колонку, промывания этой смолы растворителем, а затем добавления раствора аминокислоты. Примеры растворителей для промывки включают диметилформамид (DMF), 2-пропанол, дихлорметан и др. Примеры растворителей для растворения аминокислот включают диметилсульфоксид (DMSO), DMF, дихлорметан и др. Реакция этерификации может проводиться при 0-50°C, предпочтительно при комнатной температуре, в течение от 10 мин до 30 ч, предпочтительно от 15 мин до 24 ч.

Предпочтительно также в это время блокировать непрореагировавшие группы на твердой фазе путем ацетилирования с помощью уксусного ангидрида и т.п.

Отделение липофильной защитной группы может осуществляться, к примеру, путем обработки основанием. Примеры оснований включают пиперидин, морфолин и т.п. Предпочтительно это делается в присутствии растворителя. Примеры растворителей включают DMSO, DMF, метанол и т.п.

Реакция амидирования между свободной аминогруппой и карбоксильной группой любой аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой, предпочтительно проводится в присутствии активатора и растворителя.

Примеры активаторов включают дициклогексилкарбодиимид (DCC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (WSC/HCl), дифенилфосфорилазид (DPPA), карбонилдиимидазол (CDI) диэтилцианофосфонат (DEPC), бензотриазол-1-илокси-трис-пирролидинфосфоний (DIPCI), бензотриазол-1-илокси-трис-пирролидинфосфоний гексафторфосфат (PyBOP), 1-гидроксibenзотриазол (HOBt), гидроксисукцинимид (HOSu), диметиламинопиридин (DMAP), 1-гидрокси-7-

азабензотриазол (НОAt), гидроксифталиимид (НОPhт), пентафторфенол (Pfp-OH), 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (НВТУ), 1-[бис (диметиламино)метиле]н]-5-хлор-1H-бензотриазол-3-оксид гексафторфосфат (НСТУ), О-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфонат (НАТУ), О-бензотриазол-1-ил-1,1,3,3-тетраметилуроний (ТВТУ), 3,4-дигидро-3-гидроди-4-окса-1,2,3-бензотриазин (Dhbt), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолиний хлорид n-гидрат (DMT-MM) и др.

Предпочтительно количество активатора составляет 1-20 эквивалентов, более предпочтительно 1-10 экв. и еще более предпочтительно 1-5 экв. относительно той аминокислоты, у которой азот аминогруппы блокирован липофильной защитной группой.

Примеры растворителей включают DMSO, DMF, дихлорметан и др. Реакция может проводиться при 0-50°C, предпочтительно при комнатной температуре, в течение от 10 мин до 30 ч, предпочтительно от 15 мин до 24 ч. Отделение липофильной защитной группы может осуществляться так же, как описано выше.

При посадке C-концевой аминокислоты на смолу Rink-Amide, функционализированную аминогруппой (фирмы Merck & Co., Inc.), смолу Rink-Amide-PEGA (фирмы Merck & Co., Inc.), смолу NH-SAL (фирмы Watanabe Chemical Industries, Ltd.) или на смолу Amino-PEGA, связанную со смолой NH-SAL-линкер (фирмы Merck & Co., Inc.), оно может проводиться с применением вышеописанной реакции амидирования.

Для отщепления пептидной цепи от смолы предпочтительна обработка кислотой. Примеры кислоты включают трифторуксусную кислоту (TFA), фтористоводородную кислоту (HF) и т.п.

При этом получается комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, содержащий гликозилированный Asn в искомом положении.

В одном воплощении настоящего изобретения, когда невосстанавливающий конец сахаридной цепи у гликозилированного Asn, используемого для твердофазного синтеза, содержит сиаловую кислоту, то предпочтительно карбоксильная группа данной сиаловой кислоты блокируется защитной группой, чтобы предотвратить отщепление сиаловой кислоты при обработке кислотой. Примеры защитной группы включают бензильную группу, аллилную группу, дифенилметильную группу, фенацильную группу и т.п. Введение защитной группы и удаление защитной группы может осуществляться хорошо известными методами.

Способ получения комплексов сахаридная цепочка-полипептид (способ В)

Комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид также могут быть получены способом, в котором сначала синтезируется полипептид, а затем синтезированный полипептид подвергается гликозилированию. В частности, производится полипептид, содержащий Cys в том положении, которое подлежит гликозилированию, методом твердофазного или жидкофазного синтеза, методом синтеза в клетках, методом разделения и экстрагирования тех, что встречаются в природе, и т.п. Когда полипептид синтезируется методом твердофазного или жидкофазного синтеза, то аминокислоты могут соединяться по одному остатку за раз или же может присоединяться целый полипептид. При этом тот Cys, который не подлежит гликозилированию, как-то Cys в положении, предназначенном для образования дисульфидной связи, блокируется, например, ацетамидометильной (Acsm) группой. Кроме того, при введении в комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид такого Cys, который не подлежит гликозилированию и не используется для образования дисульфидной связи, он может

вводиться путем блокирования Cys защитной группой на стадии гликозилирования и на стадии образования дисульфидной связи, с последующим деблокированием. Примеры таких защитных групп включают трет-бутил (tBU) или 4-метоксибензил и др.

Кроме того, при добавлении различных сахаридных цепочек на Cys в одном полипептиде можно вводить различные сахаридные цепочки, сначала оставляя Cys для введения одной сахаридной цепочки незаблокированным, а затем блокируя Cys для введения другой сахаридной цепочки с помощью StBu и т.п. В частности, при синтезе полипептида методом твердофазного синтеза оставляется незаблокированным Cys для введения первой сахаридной цепочки, а Cys для введения второй сахаридной цепочки блокируется защитной группой с помощью Fmoc-Cys(StBu)-ОН и т.д. Затем в незаблокированный Cys вводится сахаридная цепочка, тогда как все еще остается защитная группа типа StBu. Затем вводится другая сахаридная цепочка в Cys, деблокированный путем удаления группы StBu и т.д. Для введения первой сахаридной цепочки и для введения второй сахаридной цепочки может служить один Cys или разные Cys.

Удаление защитной группы StBu может осуществляться путем проведения реакции с таким восстановителем, как трис-(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР), дитиотреитол (DTT) или трифенилфосфин. Данная реакция обычно проводится при 0-80°C, предпочтительно при 5-60°C и еще более предпочтительно при 10-35°C. Предпочтительно время реакции обычно составляет от 30 мин до 5 ч. По завершении реакции она может быть подвергнута очистке каким-нибудь хорошо известным методом (типа высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC)), если нужно.

При введении разных сахаридных цепочек предпочтительно начинать введение с той сахаридной цепочки, которая более стабильна в условиях восстановления на стадии деблокирования Cys или в кислых условиях на стадии очистки типа HPLC. В частности, при введении сахаридной цепочки, содержащей сиаловую кислоту, предпочтительно сначала вводится сахаридная цепочка, не содержащая сиаловой кислоты, или сахаридная цепочка, содержащая меньше остатков сиаловой кислоты.

Кроме того, если нужно добавить линкер в аминокислотную последовательность комплекса сахаридная цепочка-полипептид, то линкер можно вставить в предпочтительном положении синтезируемого полипептида, например, используя в процессе твердофазного синтеза линкер, блокированный защитной липофильной группой, вместо аминокислоты, блокированной защитной липофильной группой.

Далее, при реакции галоацетилированного производного сахаридной цепочки с полученным выше пептидом, содержащим незаблокированный Cys, сахаридная цепочка вступает в реакцию с тиоловой группой незаблокированного Cys и связывается с пептидом. Данная реакция может проводиться в фосфатном буфере, трис-HCl буфере, цитратном буфере или их смеси, обычно при 0-80°C, предпочтительно при 10-60°C и еще более предпочтительно при 15-35°C. Предпочтительно время реакции обычно составляет от 10 мин до 24 ч, более предпочтительно от 30 мин до 5 ч. По завершении реакции она может быть подвергнута очистке каким-нибудь хорошо известным методом (типа HPLC), если нужно.

Примером галоацетилированного производного сахаридной цепочки является соединение, содержащее гидроксильную группу, связанную с углеродом в положении 1 у связанной с аспарагином сахаридной цепочки, замещенной $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_a\text{-(CO)-CH}_2\text{X}$ (где X означает атом галогена, a - целое число без ограничения, если только не ингибирует представляющую интерес функцию линкера, предпочтительно целое число от 0 до 4).

В частности, галоацетилированное сложное производное сахаридной цепочки и содержащий Cys полипептид подвергаются реакции в фосфатном буфере при комнатной температуре. По завершении реакции можно получить комплекс сахаридная цепочка-полипептид, содержащий Cys со связанной с ним сахаридной цепочкой, путем очистки методом HPLC.

Реакция также может проводиться в смешанном растворе таких органических растворителей, как DMSO, DMF, метанол и ацетонитрил с вышеприведенным буфером. При этом органический растворитель может добавляться в вышеуказанный буфер в соотношении от 0 до 99% (об/об). Это предпочтительно для пептидов, содержащих незаблокированный Cys с низкой растворимостью в буфере, так как добавление такого органического растворителя может улучшить растворимость в реакционном растворе.

Реакция также может проводиться в таком органическом растворителе, как DMSO, DMF, метанол и ацетонитрил или в их смеси. Предпочтительно это делается в присутствии основания. Примеры основания включают DIPEA, триэтиламин, пиридин, 2,4,6-коллиндин и т.п. Реакция также может проводиться в смешанном растворе гуанидина гидрохлорида или мочевины при добавлении их в буферный раствор. Гуанидин гидрохлорид или мочевина могут быть добавлены в вышеуказанный буфер так, чтобы конечная концентрация составляла от 1 М до 8 М. Это предпочтительно, поскольку добавление гуанидина гидрохлорида или мочевины также может улучшить растворимость пептида с низкой растворимостью в отношении буфера.

Более того, реакция также может проводиться с добавлением в буфер трис-(2-карбоксиэтил) фосфина гидрохлорида (ТСЕР) или дитиотреитола (ДТТ) для того, чтобы предотвратить образование димеров полипептидов, содержащих незаблокированный Cys, через дисульфидную связь. ТСЕР или ДТТ добавляются в буфер так, чтобы конечная концентрация составляла от 10 мкМ до 10 мМ.

Далее, после того, как сахаридная цепочка свяжется с искомым Cys, удаляется защитная группа у Cys, заблокированного Асм и т.п. Если защитная группа представлена группой Асм, то удаление защитной группы может осуществляться проведением реакции с йодом, ацетатом ртути (II), нитратом серебра (I) или ацетатом серебра (I) и т.п. в воде, метаноле, уксусной кислоте или в их смеси.

Данная реакция обычно проводится при 0-80°C, предпочтительно при 5-60°C и еще более предпочтительно при 10-35°C. Предпочтительно время реакции обычно составляет от 5 мин до 24 ч. По завершении реакции она может быть подвергнута очистке каким-нибудь хорошо известным методом (типа HPLC), если нужно, после обработки ДТТ или соляной кислотой и т.п.

Таким способом можно получить комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, содержащий Cys со связанной с ним сахаридной цепочкой в искомом положении. Кроме того, как описано ниже, такой очищенный комплекс сахаридная цепочка-полипептид может образовывать дисульфидную связь между деблокированными Cys.

Кроме того, при получении комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид, содержащих в пептидной последовательности несколько сахаридных цепочек с сиаловой кислотой типа дисиало- или моносиалосахаридных цепочек, можно использовать содержащие сиаловую кислоту сахаридные цепочки, у которых карбоксильная группа сиаловой кислоты на подлежащей введению сахаридной цепочке блокирована бензильной (Вн) группой, аллильной группой, дифенилметильной группой, фенацильной группой и т.п.

При введении сахаридной цепочки, у которой блокирована карбоксильная группа сиаловой кислоты, может проводиться стадия удаления защитной группы у сиаловой

кислоты после стадии образования дисульфидной связи у комплекса сахаридная цепочка-полипептид, описанной ниже.

Таким образом, блокирование карбоксильной группы у сиаловой кислоты с помощью бензильной группы и т.п. будет облегчать стадию выделения/очистки методом HPLC и т.п. при получении. Блокирование карбоксильной группы у сиаловой кислоты также позволит предотвратить отделение кислотолabileй сиаловой кислоты.

Реакция блокирования карбоксильной группы сиаловой кислоты на сахаридной цепочке может проводиться методом, хорошо известным специалистам. Кроме того, у комплекса сахаридная цепочка-полипептид, образовавшего дисульфидную связь, можно удалить защитную группу у карбоксильной группы сиаловой кислоты путем гидролиза в щелочных условиях. Данная реакция обычно проводится при 0-50°C, предпочтительно при 0-40°C и еще более предпочтительно при 0-30°C. Предпочтительно время реакции обычно составляет от 5 мин до 5 ч. По завершении реакции она может быть подвергнута очистке каким-нибудь хорошо известным методом (типа HPLC), если нужно, после нейтрализации слабой кислотой типа фосфорной кислоты или уксусной кислоты.

Кроме того, у комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид, полученных вышеописанными способами А и В, можно создавать дисульфидные связи между Cys методами, хорошо известными специалистам, с использованием воздуха и/или кислорода, йода, DMSO, смеси окисленного и восстановленного глутатиона, феррицианида калия, реагента Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)), трифторацетата таллия (III), алкилтрихлорсилан-сульфоксида и др.

При образовании дисульфидной связи между Cys-Cys, тот Cys у комплекса типа сахаридная цепочка-полипептид, который не должен образовать дисульфидную связь, блокируется защитной группой. В качестве такой защитной группы можно использовать защитные группы, которые стабильны в окислительных условиях, как-то Acem, tBu, 4-метоксибензил и 4-метилбензил.

В способе В образование дисульфидной связи также может проводиться перед введением сахаридной цепочки. Однако, если защитная группа вводится в тот Cys, который должен образовать дисульфидную связь, то стадия деблокирования должна предшествовать стадии образования дисульфидной связи.

Кроме того, в способе В аминокислота, подлежащая реакции с галоацетилированным сложным производным сахаридной цепочки, не имеет особых ограничений, если только она представлена содержащей тиольную группу аминокислотой, поэтому аналогично Cys также можно использовать, к примеру, D-цистеин (D-Cys), гомоцистеин, норцистеин, пеницилламин и др.

Тип сахаридной цепочки, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, не имеет особых ограничений, но предпочтительно общее количество сахаридных остатков, присутствующих в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 5 или больше. Например, можно добавлять одну или несколько сахаридных цепочек, представленных пентасахаридами или выше, либо несколько сахаридных цепочек, представленных пентасахаридами или ниже, с тем, чтобы количество сахаридных остатков, присутствующих в сахаридной цепочке, добавленной на один комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, составляло 5 или больше. При добавлении нескольких сахаридных цепочек с одним пептидом могут связываться одинаковые сахаридные цепочки или же сахаридные цепочки различного типа в сочетании, но предпочтительно они одинаковы.

Например, если общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 5, то может связываться одна мальтозная сахаридная цепочка, содержащая два сахаридных остатка, и одна мальтотриозная сахаридная цепочка, содержащая три сахаридных остатка.

5 Далее, если общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 6, то могут связываться три мальтозные сахаридные цепочки либо две мальтотриозные сахаридные цепочки. Далее, если общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 7, то могут связываться
10 две мальтозные сахаридные цепочки и одна мальтотриозная сахаридная цепочка или же одна diGlcNAc-сахаридная цепочка, содержащая семь сахаридных остатков. Точно так же, могут связываться различные комбинации сахаридных цепочек в тех случаях, когда общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 8 или больше.

15 Количество сахаридных цепочек, связанных с комплексом сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, не имеет ограничений, если только комплекс сахаридная цепочка-полипептид не будет терять характерную для него структуру Р-листа при самосборке в водном растворе при близких к нейтральным значениям pH. Например, это может быть 1, 2, 3, 4, 5 или 6 цепочек, предпочтительно 1, 2 или 3 цепочки.

20 У комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению положение аминокислотного остатка, с которым связывается сахаридная цепочка, не имеет ограничений, если только комплекс сахаридная цепочка-полипептид не будет терять характерную для него структуру β -листа при самосборке в водном растворе при близких к нейтральным значениям pH. Например, положение аминокислотного
25 остатка, с которым связывается сахаридная цепочка, может находиться на N- и/или C-концевой стороне полипептида, или же это может быть другое положение, находящееся ни на N-, ни на C-концевой стороне.

Предпочтительно сахаридные цепочки могут связываться с каждой аминокислотой вплоть до положения x, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-
30 конце данного полипептида, и с каждой аминокислотой вплоть до положения y, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце (где x и y - целые числа, $x \geq 0$, $y \geq 0$, а $x+y$ есть общее количество сахаридных цепочек, связанных с полипептидом).

В частности, если количество сахаридных цепочек, связанных с полипептидом, составляет 1, то данная одна сахаридная цепочка может связываться с аминокислотным
35 остатком, расположенным на N-конце данного полипептида, либо с аминокислотным остатком, расположенным на C-конце.

Далее, если количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 2, то данные две сахаридные цепочки могут связываться с аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-3 ниже:

40 (1) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце полипептида,

(2) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце полипептида, и

(3) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце полипептида, и
45 аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида.

Далее, если количество сахаридных цепочек, связанных с данным полипептидом, составляет 3, то данные три сахаридные цепочки могут связываться с любыми аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-4 ниже:

(1) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце полипептида,

(2) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце полипептида,

5 (3) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце полипептида, а также от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце полипептида, и

(4) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце полипептида, а также аминокислотных остатков, расположенных в положениях 1 и 2, считая от C-конца
10 данного полипептида.

Предпочтительно сахаридная цепочка, добавляемая к комплексу типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, является разветвленной. При этом то, что сахаридная цепочка, связанная с полипептидом, является "сахаридной цепочкой с разветвлением", в настоящем изобретении не ограничивается, например, теми, у
15 которых есть разветвление в одной сахаридной цепи, как у дисахаридной цепи, асидосахаридной цепи или diGlcNAc-сахаридной цепи, но также охватывает, например, и те, у которых есть множественные линейные сахаридные цепи, добавленные к одному полипептиду, создавая такое состояние, при котором сахаридная цепочка является разветвленной во всем пептиде в целом. Например, те, у которых есть две или несколько
20 линейных сахаридных цепочек типа мальтозных или мальтотриозных сахаридных цепей, связанных с одним пептидом, также относятся здесь к "сахаридным цепочкам с разветвлением".

Гидрогель в настоящем изобретении означает гель, в котором дисперсионной средой практически является вода. Пептид по настоящему изобретению будет образовывать
25 гидрогель при диспергировании в воде. Соотношение между пептидом и водой в смеси не имеет особых ограничений, и специалисты смогут правильно подобрать их соотношение в соответствии с применением гидрогеля. Например, при получении гидрогеля с C(diGlcNAc)-(RADA)₄ в соответствии с одним воплощением настоящего изобретения, гидрогель образуется в широком диапазоне pH, если концентрация пептида
30 составляет 0,5% масс. или больше, также гидрогель образуется при нейтральном pH, но не может образоваться при кислом pH, если концентрация пептида составляет около 0,25% масс. Таким образом, при получении гидрогеля из пептидов по настоящему изобретению образование гидрогеля может контролироваться посредством pH, если концентрация пептида будет низкой. Используя это свойство, от них можно быстро
35 избавиться или удалить, к примеру, превращая гель в золь путем изменения pH после использования гидрогеля.

В настоящем изобретении способ оценки прочности или характера гидрогеля не имеет особых ограничений, к примеру, можно оценивать посредством испытания на
40 нагрузку стальным шариком или кинетического измерения вязкости. При испытании на нагрузку стальным шариком, к примеру, прочность гидрогеля оценивается путем нанесения стального шарика заданного веса на поверхность гидрогеля, образовавшегося внутри пробирки Durham, и наблюдения, останется он на поверхности гидрогеля или провалится. Кроме того, при испытании на нагрузку стальным шариком можно
45 визуально проверить прозрачность гидрогеля либо наличие или отсутствие нерастворимого вещества или осадка. При кинетическом измерении вязкости гидрогеля измеряется изменение прочности гидрогеля по времени путем измерения кинетической вязкости данного гидрогеля с помощью реометра.

При оценке гидрогеля в настоящих примерах операция энергичного перемешивания

охватывается как единая операция для формирования гидрогеля. Очень однородный гель может быть получен при выполнении такой операции энергичного перемешивания, и осуществляется более надежная оценка.

Гидрогель по настоящему изобретению может использоваться для различного применения. Например, поскольку гидрогель по настоящему изобретению является
5 весьма безопасным для живых организмов, то он может применяться в медицине (как вспомогательное средство в хирургии типа гемостатического матрикса или материала для эмболизации кровеносных сосудов, носителя для контролируемого высвобождения фармацевтических препаратов, материала для перевязки ран, к примеру, при
10 хирургической операции или в регенеративной медицине, материала для протрузии слизистой, материала для реконструкции губчатой кости, материала для реконструкции тканей типа материала для регенерации роговицы и матрикса для трехмерных культур, например, для экспериментов на культуре ткани) или для применения в косметике (типа препаратов по уходу за кожей и за волосами). Особенно предпочтительно он может
15 применяться в качестве гемостатического матрикса, носителя для контролируемого высвобождения или матрикса для культивирования.

Гемостатический матрикс в настоящем изобретении означает в широком смысле матрикс для прекращения кровотечения у живых организмов. Гемостатический матрикс по настоящему изобретению не ограничивается теми, что содержат только комплекс
20 типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению и воду, он может содержать и различные другие компоненты. Например, поскольку он включает средство, содержащее дезинфицирующий/стерилизующий компонент, то он может не только останавливать кровотечение из раны, но одновременно и стерилизовать/дезинфицировать раны.

Носитель для контролируемого высвобождения в настоящем изобретении означает в широком смысле носитель, обладающий свойством постепенного высвобождения инкапсулированного вещества или средства. Вещества, которые можно инкапсулировать в носителях для контролируемого высвобождения по настоящему изобретению, не
25 имеют особых ограничений, и можно инкапсулировать различные вещества или средства. Кроме того, вещества или средства, которые можно инкапсулировать в носителях для
30 контролируемого высвобождения по настоящему изобретению, не ограничивается каким-то одним типом, и можно одновременно инкапсулировать два или несколько типов веществ или средств.

Матрикс для культивирования в настоящем изобретении означает в широком смысле
35 матрикс, используемый для культивирования клеток или тканей. Например, при покрытии чашек с клеточной культурой матриксом для культивирования по настоящему изобретению и культивировании клеток может улучшаться адгезивность/способность к росту клеток. Кроме того, например, при инкапсуляции клеток или тканей в матриксе для культивирования по настоящему изобретению и культивировании их может
40 проводиться эффективное трехмерное культивирование клеток или тканей.

Материал для протрузии слизистой в настоящем изобретении означает в широком смысле вводимый под оболочку материал для формирования протрузии слизистой по
месту повреждения при резекционной хирургии слизистой, например, при раке желудка или пищевода с помощью эндоскопической хирургии. Например, при резекции
45 пораженного участка, например, с помощью эндоскопа, материал для протрузии ткани по настоящему изобретению вводится под пораженный участок и способствует протрузии участка для резекции с тем, чтобы облегчить резекцию пораженного участка.

Материал для эмболизации кровеносных сосудов в настоящем изобретении означает

в широком смысле протезный материал, способствующий внутрисосудистой эмболизации, для применения в качестве эмбола при артериальной эмболизации. При артериальной эмболизации, например, при раке печени или фиброме матки, когда материал для эмболизации кровеносных сосудов по настоящему изобретению вводится в артерию выше от пораженного места, то при контакте с кровью образуется гидрогель. Он может блокировать артерию, поставляющую питательные вещества для опухоли, и тем самым убивать опухоль.

Материал для реконструкции тканей в настоящем изобретении означает в широком смысле материал, который составляет строительный каркас в регенеративной медицине при реконструкции тканей *in vivo*. Например, если материал для реконструкции тканей по настоящему изобретению вводится при регенерации кости, то он может составить каркас для клеток, осуществляющих остеогенез, и тем самым способствовать регенерации кости.

Используемые здесь термины должны применяться для описания определенных воплощений, а не для ограничения изобретения.

Кроме того, в настоящем изобретении термин "включающий", если содержание четко не указывает иное понимание, означает наличие описанных элементов (как-то компонентов, стадий, элементов и чисел) и не исключает наличия других элементов (как-то компонентов, стадий, элементов и чисел).

Если не указано иначе, в настоящем изобретении все термины (включая технические и научные термины) имеют такие же значения, которые широко признаны специалистами в той области, к которой относится настоящее изобретение. Используемые здесь термины, если прямо не указано иначе, следует понимать как имеющие те значения, которые соответствуют принятым здесь и в родственных областях техники значениям, и их не следует понимать как имеющие идеализированные или чрезмерно формальные значения.

Термины типа первый и второй иногда применяются для обозначения различных элементов, и следует иметь в виду, что эти элементы не должны ограничиваться этими терминами. Эти термины применяются исключительно с целью отличить один элемент от другого, поэтому можно, к примеру, описывать первый элемент в качестве второго элемента и точно так же описывать второй элемент в качестве первого элемента, не выходя за рамки настоящего изобретения.

Далее настоящее изобретение будет описано более конкретно на примерах. Однако настоящее изобретение может быть реализовано по различным воплощениям и не должно восприниматься как ограничивающееся описанными здесь примерами.

Например, дисиало-BrAc, как показано здесь, означает бромацетилированную дисиалосахаридную цепочку. Далее, к примеру, C(дисиало)-(RADA)₄, как показано здесь, означает, что остаток цистеина, с которым связана дисиалосахаридная цепочка, связан с N-концом полипептида, имеющего аминокислотную последовательность RADARADA RADARADA.

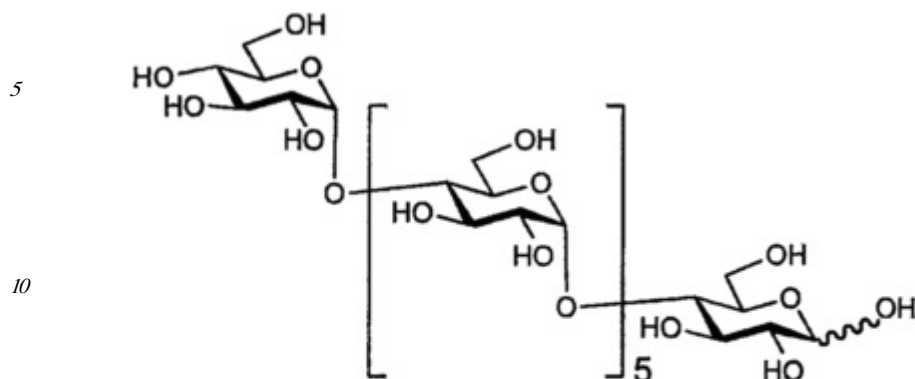
Примеры

Пример синтеза 1. Синтез BrAc-мальтогептаозы

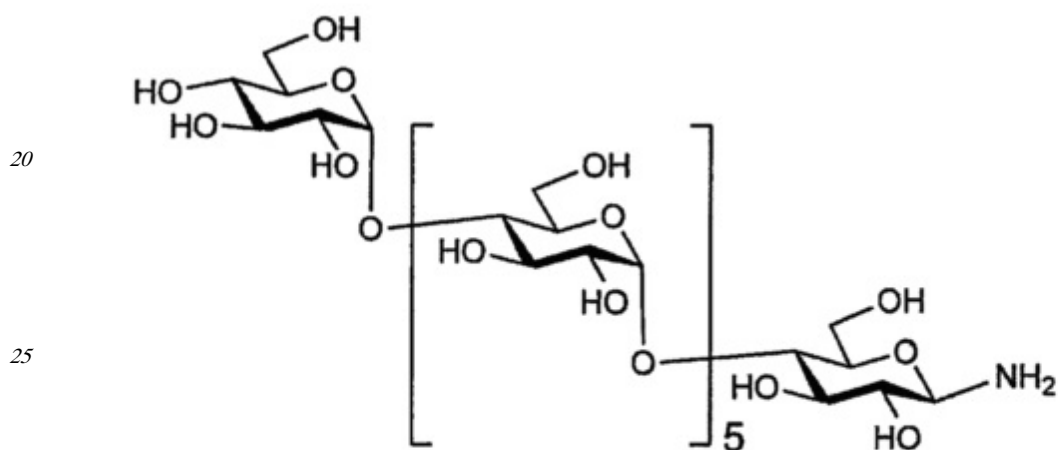
1-1. Аминирование

Соединение 1, представленное следующей формулой (11) (наименование продукта: мальтогептаоза, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (53,2 мг, 46,1 мкмоль), растворяли в воде (5 мл). В раствор, нагретый до 37°C, добавляли гидрокарбонат натрия (3,6 г), а затем перемешивали в течение 19 ч. После добавления воды несколько раз проводили упаривание при пониженном давлении. Все опять растворяли в воде и

лиофилизировали, получая лиофилизат, содержащий соединение 2, представленное следующей формулой (12).



15 **Формула (11)**

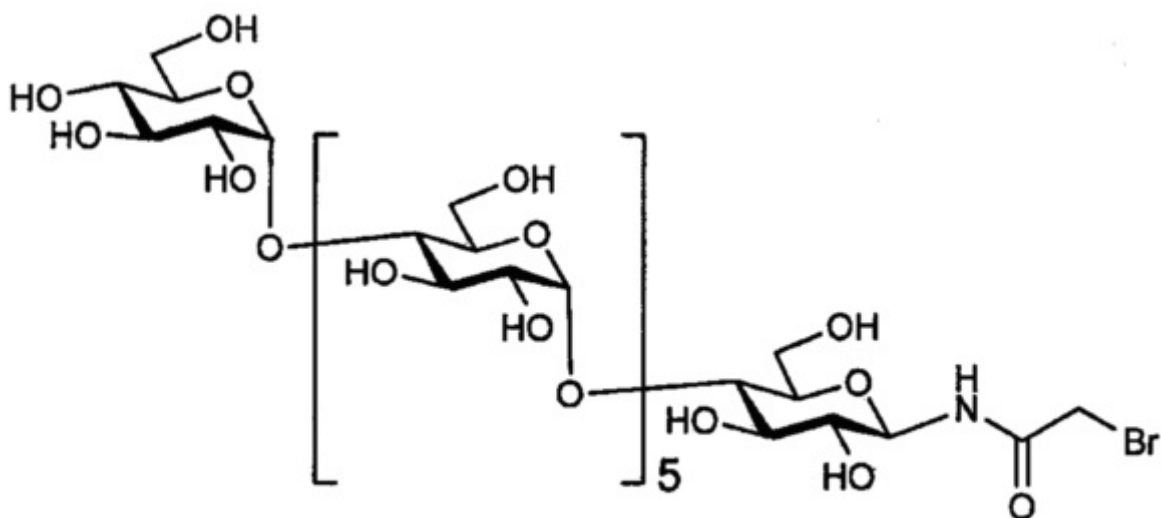


30 **Формула (12)**

1-2. Бромацетилирование

35 Соединение 2, полученное на стадии 1-1, и карбонат натрия (83,0 мг, 0,92 ммоль, 20 экв. относ. соединения 2) растворяли в воде и охлаждали до 0°C. Медленно по каплям добавляли растворенный в дихлорметане бромацетилбромид (40,0 мкл, 0,46 ммоль, 10 экв. относ. соединения 2) и перемешивали в течение 2 ч. Все это распределяли между дихлорметаном и водой и в водную фазу добавляли бромистоводородную кислоту. Водную фазу частично упаривали при пониженном давлении.

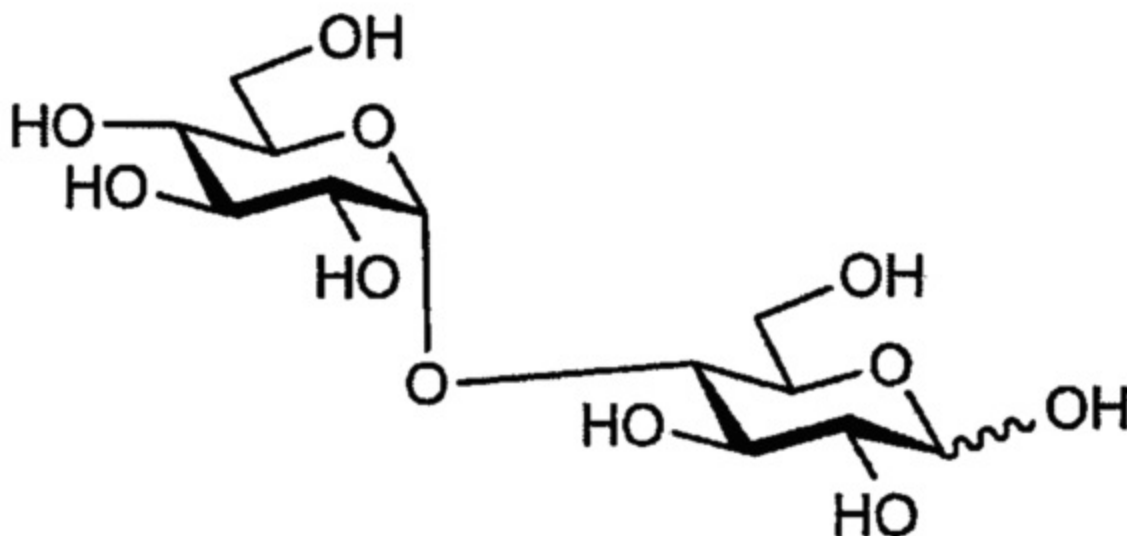
40 Реакционный раствор подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: вода, В: ацетонитрил, градиент А:В=99,5:0,5→90:10, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая BrAc-мальтогептаозу, представленную следующей формулой (13) (26,7 мг, 20,9 мкмоль, выход 46%).



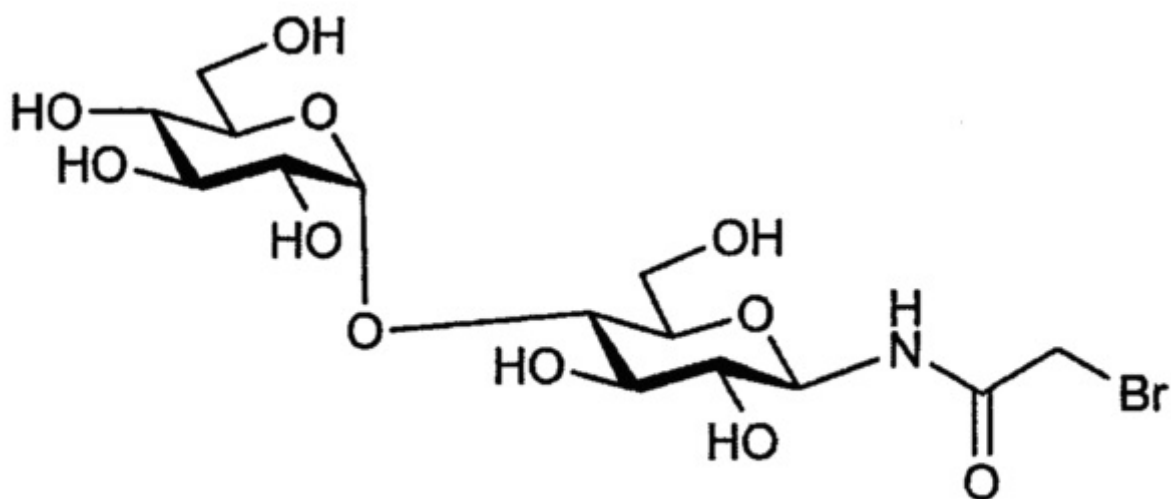
Формула (13)

Пример синтеза 2. Синтез BrAc-мальтозы

Синтез проводили таким же способом, как и в Примере синтеза 1, за исключением того, что вместо соединения 1 использовали соединение 3, представленное следующей формулой (14) (наименование продукта: мальтоза, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (200 мг, 0,58 ммоль), получая BrAc-мальтозу, представленную следующей формулой (15) (179,1 мг, выход 67%).



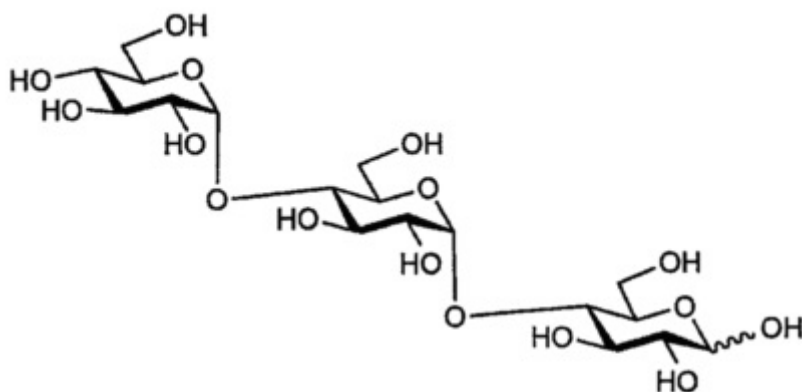
Формула (14)



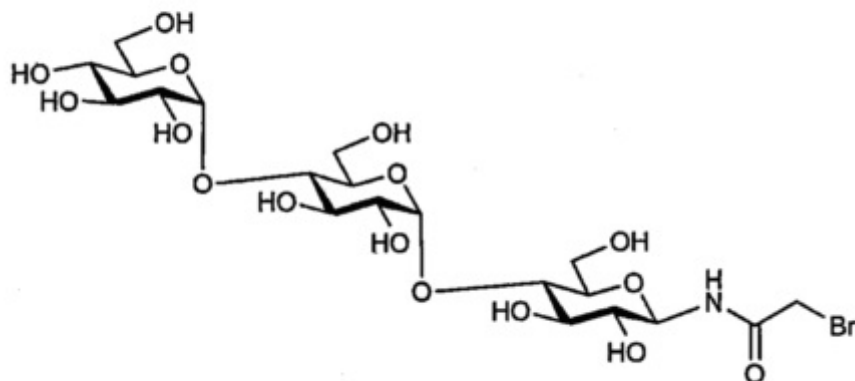
Формула (15)

Пример синтеза 3. Синтез BrAc-мальтотриозы

Синтез проводили таким же способом, как и в Примере синтеза 1, за исключением того, что вместо соединения 1 использовали соединение 4, представленное следующей формулой (16) (наименование продукта: мальтотриоза, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (100 мг, 198,6 мкмоль), получая BrAc-мальтотриозу, представленную следующей формулой (17) (58,2 мг, выход 47%).



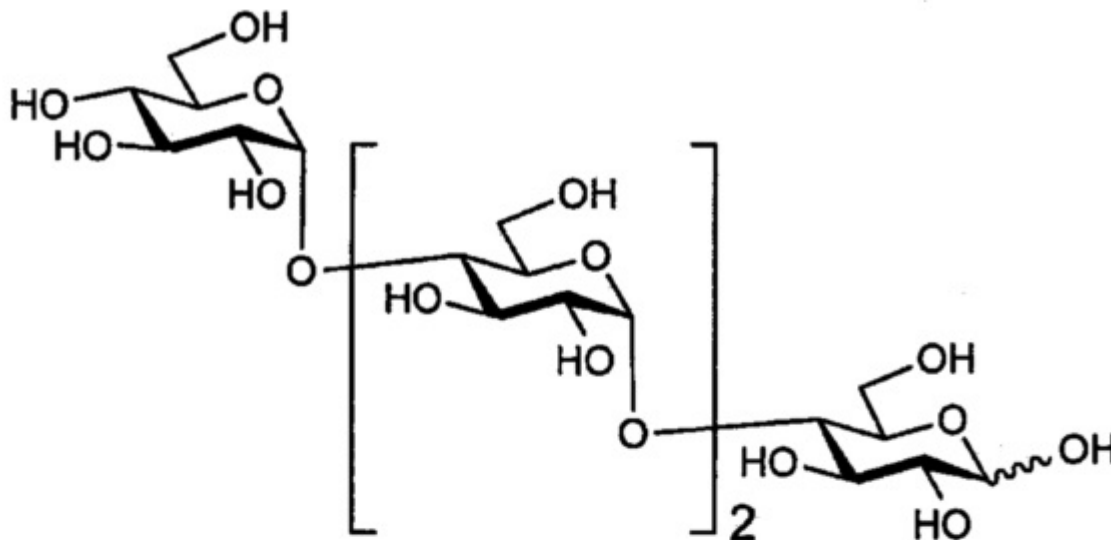
Формула (16)



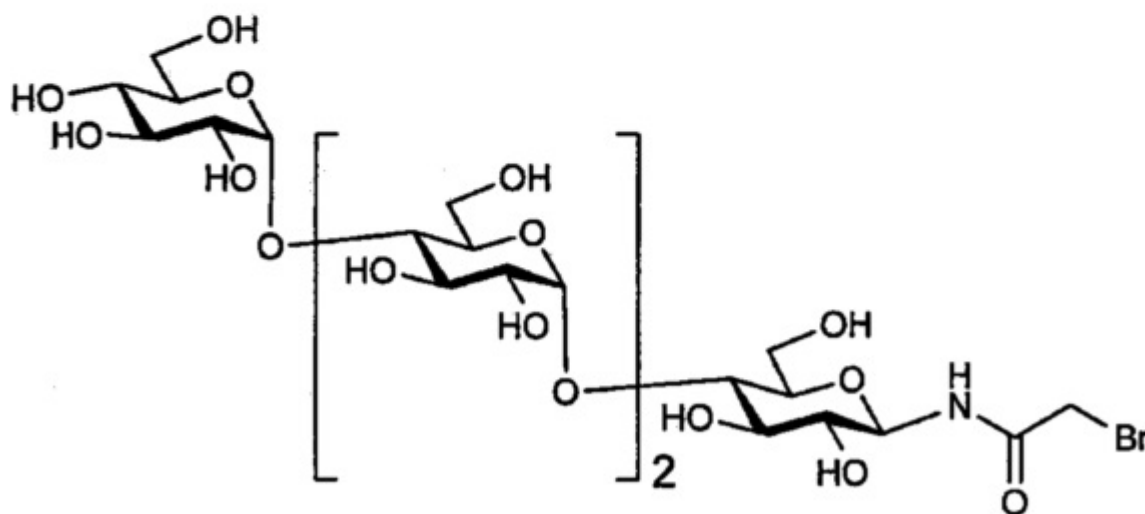
Формула (17)

Пример синтеза 4. Синтез BrAc-мальтотетраозы

Синтез проводили таким же способом, как и в Примере синтеза 1, за исключением того, что вместо соединения 1 использовали соединение 5, представленное следующей формулой (18) (наименование продукта: мальтотетраоза, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (200 мг, 0,2 ммоль), получая BrAc-мальтотетраозу, представленную следующей формулой (19) (133,1 мг, выход 51%).



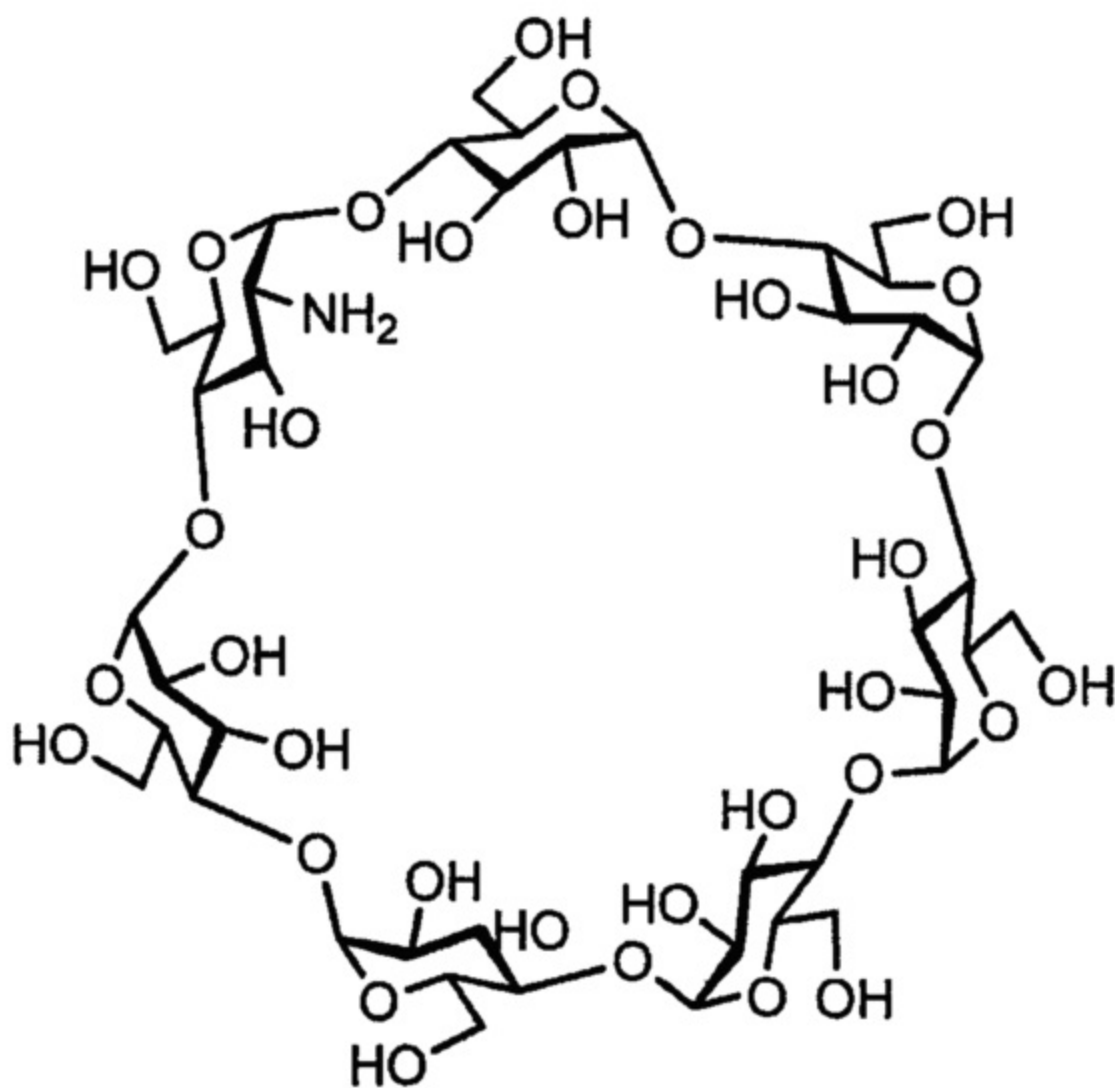
Формула (18)



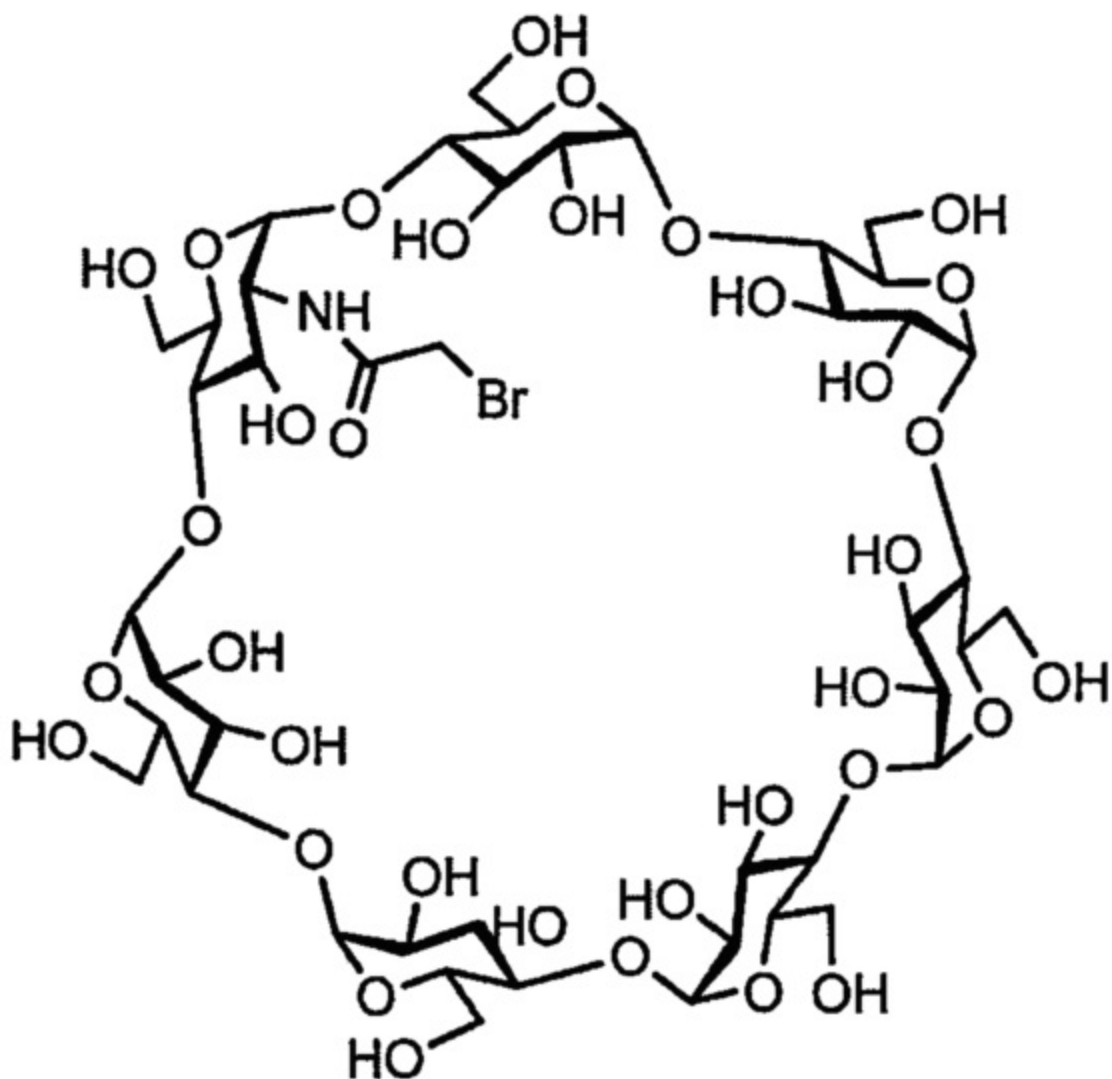
Формула (19)

Пример синтеза 5. Синтез BrAc-β-циклодекстрина

Синтез проводили таким же способом, как и в Примере синтеза 1-2, за исключением того, что вместо соединения 1 использовали соединение 6, представленное следующей формулой (20) (наименование продукта: 3A-амино-3A-дезоксидеокси-(2AS,3AS)-β-циклодекстрин гидрат, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (101,5 мг, 89,5 мкмоль), получая BrAc-β-циклодекстрин, представленный следующей формулой (21) (31,2 мг, выход 28%).



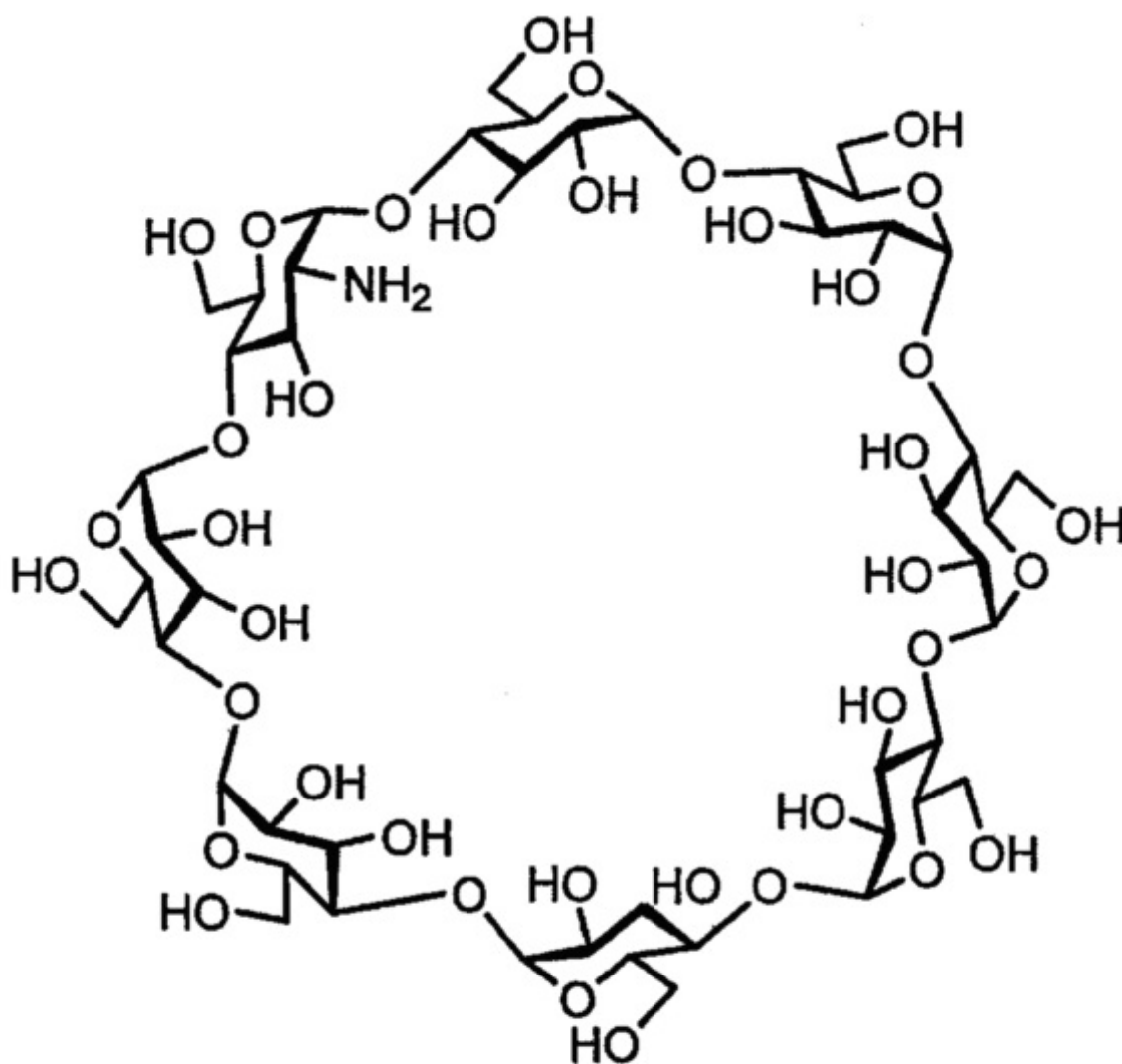
Формула (20)



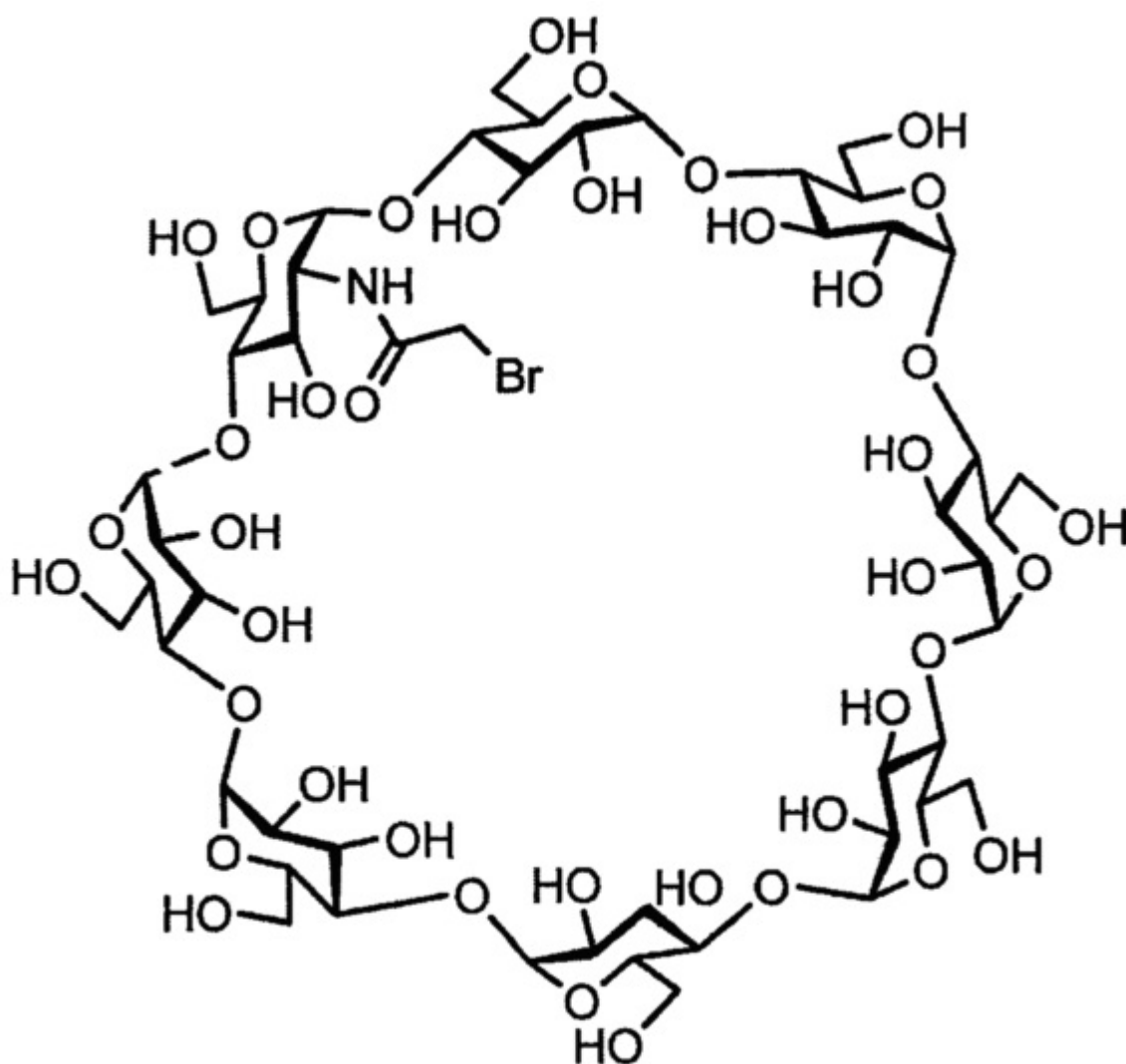
Формула (21)

Пример синтеза 6. Синтез BrAc-γ-циклодекстрина

Синтез проводили таким же способом, как и в Примере синтеза 1-2, за исключением того, что вместо соединения 1 использовали соединение 7, представленное следующей формулой (22) (наименование продукта: 3А-амино-3А-дезоксидеокси-(2AS,3AS)-γ-циклодекстрин гидрат, фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (100,0 мг, 77,1 мкмоль), получая BrAc-γ-циклодекстрин, представленный следующей формулой (23) (41,1 мг, выход 38%).



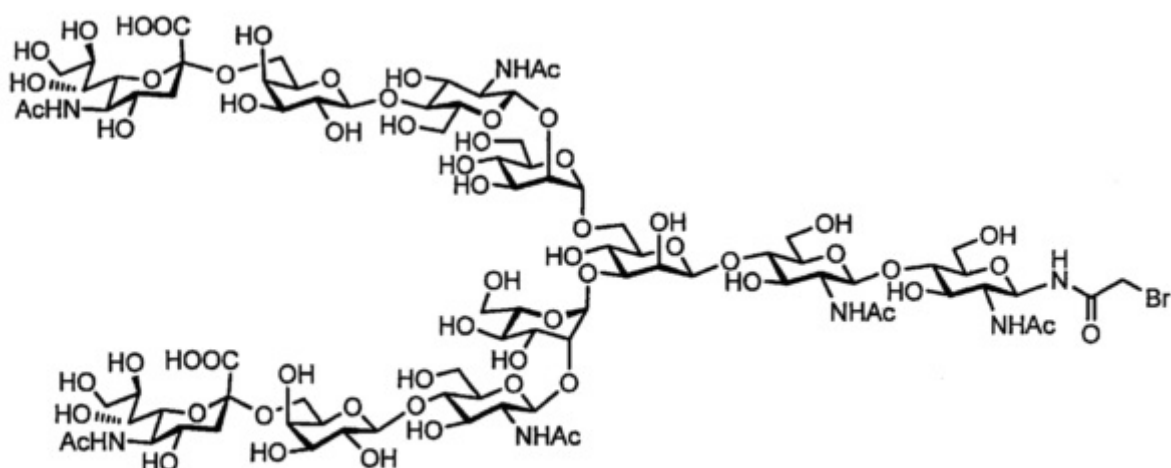
Формула (22)



Формула (23)

Пример синтеза 7. Синтез дисиало-BrAc

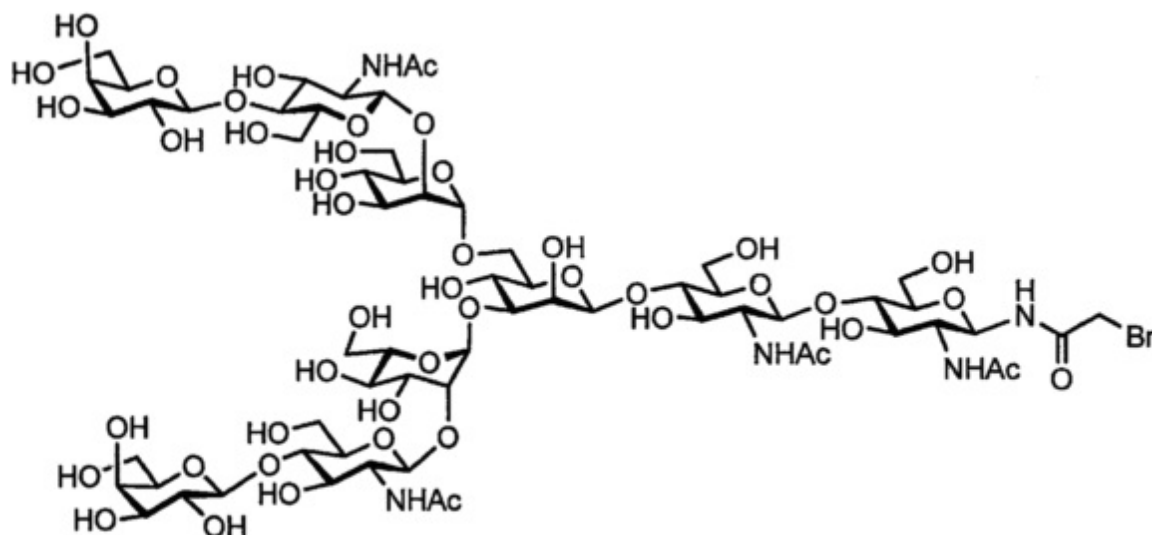
Синтез проводили таким же способом, как и в WO 2005/010053, получая дисиало-BrAc, представленный следующей формулой (25).



Формула (25)

Пример синтеза 8. Синтез асиало-BrAc

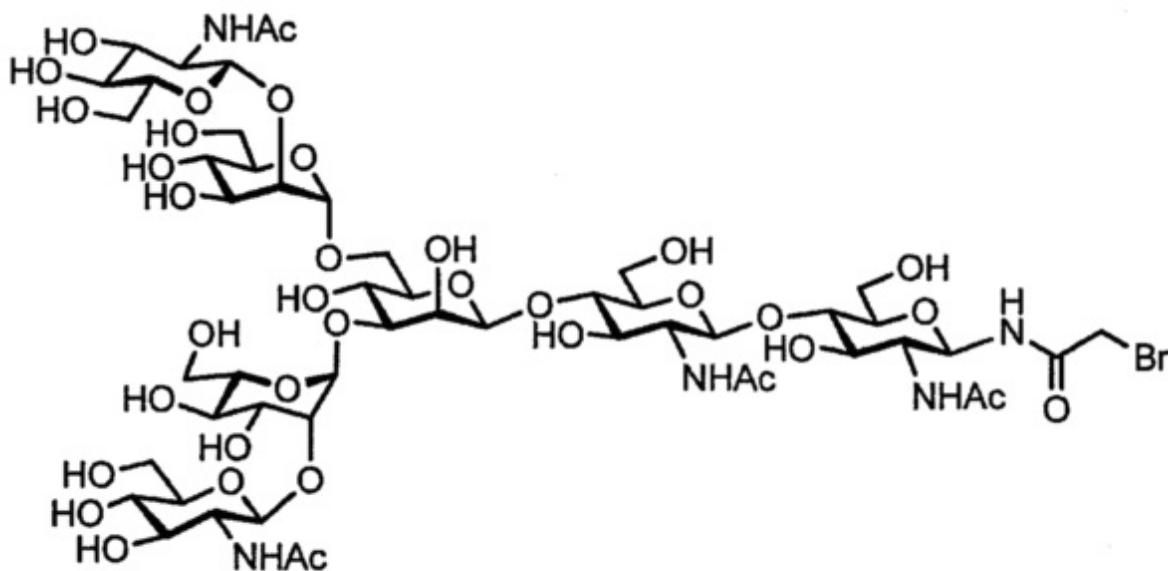
Синтез проводили таким же способом, как и в WO 2005/010053, получая асиало-BrAc, представленный следующей формулой (27).



Формула (27)

Пример синтеза 9. Синтез diGlcNAc-BrAc

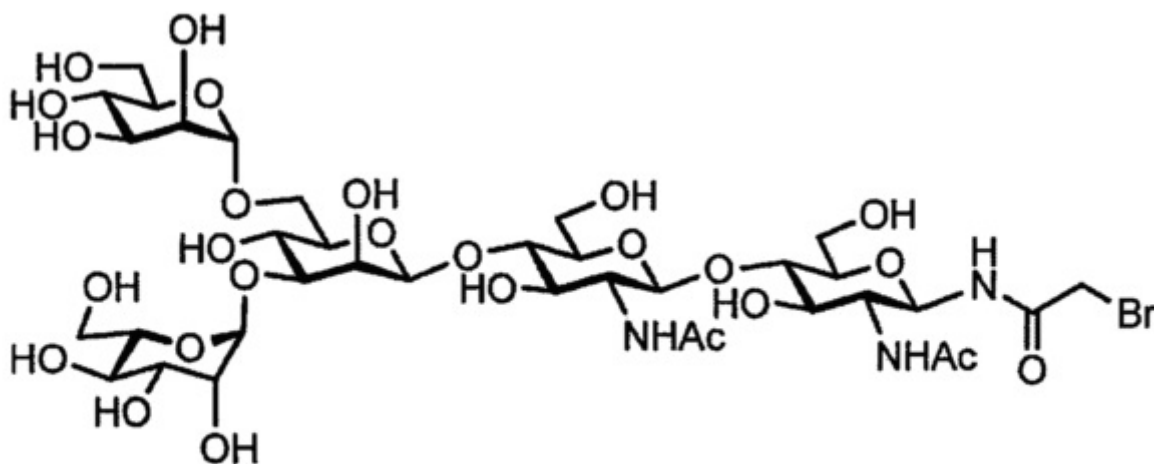
Синтез проводили таким же способом, как и в WO 2005/010053, получая diGlcNAc-BrAc, представленный следующей формулой (29).



Формула (29)

Пример синтеза 10. Синтез diMan-BrAc

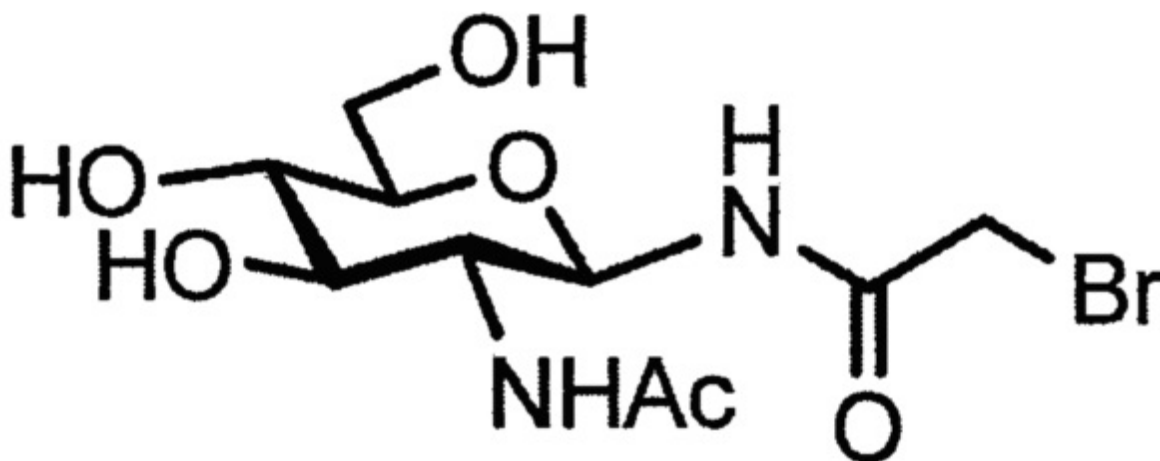
Синтез проводили таким же способом, как и в WO 2005/010053, получая diMan-BrAc, представленный следующей формулой (31).



Формула (31)

Пример синтеза 11. Синтез GlcNAc-BrAc

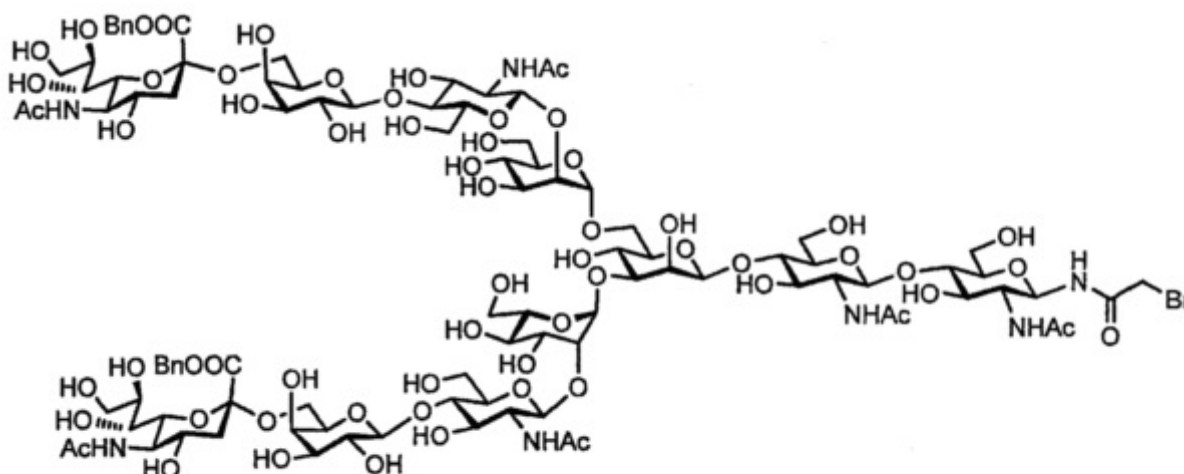
Синтез проводили таким же способом, как и в WO 2005/010053, получая GlcNAc-BrAc, представленный следующей формулой (33).



Формула (33)

Пример синтеза 12. Синтез diBn-дисиало-Brc

К дисиало-Brc (28,9 мг, 12,3 мкмоль) последовательно добавляли DMF (0,58 мл), бромид лития (21,5 мг, 248 мкмоль) и бенzilбромид (14,6 мкл, 122 мкмоль) и проводили реакцию при 30°C в течение 20 ч. Еще добавляли бенzilбромид (14,6 мкл, 122 мкмоль) и продолжали реакцию в течение 20 ч. В реакционную смесь добавляли толуол (30 мл), разделяли центрифугированием (10000×g, 10 мин), а затем растворяли осадок в воде (100 мкл) и очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 8,0 мл/мин, элюирующий растворитель : вода : ацетонитрил =95:5→70:30, 20 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая diBn-дисиало-Brc, представленный следующей формулой (35) (7,6 мг, выход 24%).



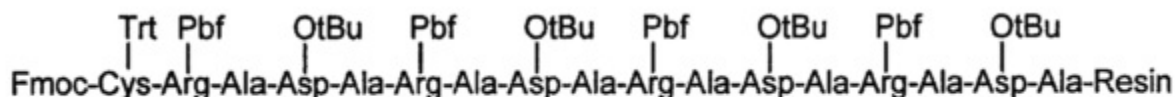
Формула (35)

MALDI-MS: (m/z) теор. для $C_{100}H_{152}BrN_7O_{62}$: $[M+Na]^+$ 2544,8, факт. 2544,4.

Пример синтеза 13. Синтез C(дисиало)-(RADA)₄

13-1. Синтез Ac-C(RADA)₄-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), 1-бис-диметиламинометил-5-хлор-1H-бензотриазолий-3-оксида гексафторфосфата (HCTU) (157,2 мг, 380 мкмоль) и диизопропилэтиламина (DIPEA) (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (36) (SEQ ID NO. 4). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (36)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (37) (SEQ ID NO. 5) (32,7 мг).



Формула (37)

13-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, полученный способом, описанным в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (20,5 мг, 11,2 мкмоль), и дисиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 7 (66,0 мг, 28,0 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,7 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (38) (SEQ ID NO. 6) (23,8 мг, 5,83 мкмоль, выход 52%).



Формула (38)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$: $[M+2H]^{2+}$ 2040,5, $[M+3H]^{3+}$ 1360,7, $[M+4H]^{4+}$ 1020,7, факт. 2040,4, 1360,6, 1020,7.

Пример синтеза 14. Синтез C(асиало)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (22,7 мг, 12,5 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (55,0 мг, 31,2 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 4,7 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 18 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (39) (SEQ ID NO. 7) (20,5 мг, 5,86 мкмоль, выход 47%).



Формула (39)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{133}H_{223}N_{35}O_{72}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1749,2, $[M+3H]^{3+}$ 1166,5, $[M+4H]^{4+}$ 875,1, факт. 1749,3, 1166,2, 874,9.

Пример синтеза 15. Синтез C(diGlcNAc)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (25,3 мг, 13,9 мкмоль), и diGlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 9 (30,0 мг, 20,9 мкмоль, 1,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 4,7 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→81:19, 10 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (40) (SEQ ID NO. 8) (23,9 мг, 7,53 мкмоль, выход 54%).



Формула (40)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1587,1, $[M+3H]^{3+}$ 1058,4, $[M+4H]^{4+}$ 794,0, факт. 1586,7, 1058,1, 793,8.

Пример синтеза 16. Синтез C(diMan)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (15,2 мг, 8,37 мкмоль), и diMan-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 10 (21,5 мг, 20,9 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при

комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (41) (SEQ ID NO. 9) (16,9 мг, 6,11 мкмоль, выход 73%).



Формула (41)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{121}\text{P}_{203}\text{T}_{35}\text{O}_{62}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1383,9, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 922,9, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 629,5, факт. 1383,6, 922,7, 692,3.

Пример синтеза 17. Синтез C(GlcNAc)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (14,9 мг, 8,21 мкмоль), и GlcNAc-BgAc, синтезированный в Примере синтеза 11 (5,6 мг, 16,4 мкмоль, 2,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→5:95, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (42) (SEQ ID NO. 10) (15,4 мг, 7,42 мкмоль, выход 90%).



Формула (42)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{79}\text{H}_{134}\text{N}_{32}\text{O}_{32}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1039,1, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 693,1, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 520,0, факт. 1039,0, 692,6, 520,0.

Пример синтеза 18. Синтез C(мальтогептаоза)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (9,3 мг, 5,12 мкмоль), и BgAc-мальтогептаозу, синтезированную в Примере синтеза 1 (9,8 мг, 7,68 мкмоль, 1,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→72:28, 16 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (43) (SEQ ID NO. 11) (5,1 мг, 1,70 мкмоль, выход 33%).



Формула (43)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{113}\text{H}_{191}\text{N}_{31}\text{O}_{62}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1505,0, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1003,7, факт. 1504,6, 1003,4.

Пример синтеза 19. Синтез C(β -циклодекстрин)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (17,7 мг, 9,75 мкмоль), и BrAc- β -циклодекстрин, синтезированный в Примере синтеза 5 (36,7 мг, 29,2 мкмоль, 3,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,3 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 24 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→72:28, 16 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (44) (SEQ ID NO. 12) (6,8 мг, 2,27 мкмоль, выход 23%).



Формула (44)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{113}\text{H}_{189}\text{N}_{31}\text{O}_{61}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1496,0, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 997,7, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 748,5, факт. 1495,6, 997,7, 748,3.

Пример синтеза 20. Синтез C(γ -циклодекстрин)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 13-1 (SEQ ID NO. 5) (16,0 мг, 8,81 мкмоль), и BrAc- γ -циклодекстрин, синтезированный в Примере синтеза 6 (36,7 мг, 25,9 мкмоль, 3,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,0 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 24 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→5:95, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (45) (SEQ ID NO. 13) (6,0 мг, 1,90 мкмоль, выход 22%).



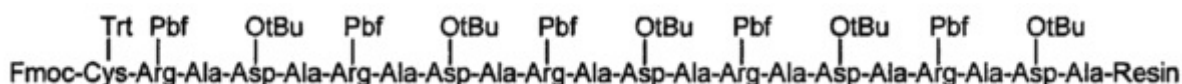
Формула (45)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{119}\text{H}_{199}\text{N}_{31}\text{O}_{66}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1577,1, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1051,7, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 789,0, факт. 1576,7, 1051,4, 788,8.

Пример синтеза 21. Синтез C(дисиаало)-(RADA)₅

21-1. Синтез Ac-C(RADA)₅-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (46) (SEQ ID NO. 14). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (46)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (ТРА): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (47) (SEQ ID NO. 15) (32,7 мг).



Формула (47)

21-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (13,9 мг, 6,24 мкмоль), и дисиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 7 (36,5 мг, 15,6 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (48) (SEQ ID NO. 16) (7,8 мг, 1,74 мкмоль, выход 28%).



Формула (48)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{171}H_{284}N_{44}O_{94}S$: $[M+3H]^{3+}$ 1498,5, $[M+4H]^{4+}$ 1124,1, $[M+5H]^{5+}$ 899,5, факт. 1498,6, 1123,9, 899,4.

Пример синтеза 22. Синтез C(асиало)-(RADA)₅

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (18,8 мг, 8,43 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (44,5 мг, 25,3 мкмоль, 3,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,2, 2,8 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (49) (SEQ ID NO. 17) (16,0 мг, 4,09 мкмоль, выход 49%).



Формула (49)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{149}H_{250}N_{42}O_{78}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1955,9, $[M+3H]^{3+}$ 1304,3, $[M+4H]^{4+}$ 978,5, факт. 1955,8, 1304,2, 978,2.

Пример синтеза 23. Синтез C(diGlcNAc)-(RADA)₅

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (19,4 мг, 8,70 мкмоль), и diGlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 9 (20,0 мг, 21,7 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,2, 3,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→60:40, 20 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (50) (SEQ ID NO. 18) (16,8 мг, 4,69 мкмоль, выход 54%).



Формула (50)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{149}H_{250}N_{42}O_{78}S$: $[M+3H]^{3+}$ 1196,2, $[M+4H]^{4+}$ 897,4, факт. 1195,9, 897,2.

Пример синтеза 24. Синтез C(GlcNAc)-(RADA)₅

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (18,8 мг, 8,43 мкмоль), и GlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 11 (8,7 мг, 25,3 мкмоль, 3,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 7 М гуанидине, 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,2, 4,2 мл) и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell

ПАК C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→5:95, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (51) (SEQ ID NO. 19) (14,9 мг, 5,99 мкмоль, выход 71%).



Формула (51)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{95}\text{H}_{161}\text{N}_{39}\text{O}_{38}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1245,8, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 830,9, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 623,4, факт. 1245,1, 830,8, 623,3.

Пример синтеза 25. Синтез C(diBn-дисиало)-(RADA)₅

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (20,7 мг, 9,29 мкмоль), и diBn-дисиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 12 (58,6 мг, 23,2 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,2 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell ПАК C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=85:15→73:27, 17 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (52) (SEQ ID NO. 20) (7,5 мг, 1,61 мкмоль, выход 17%).

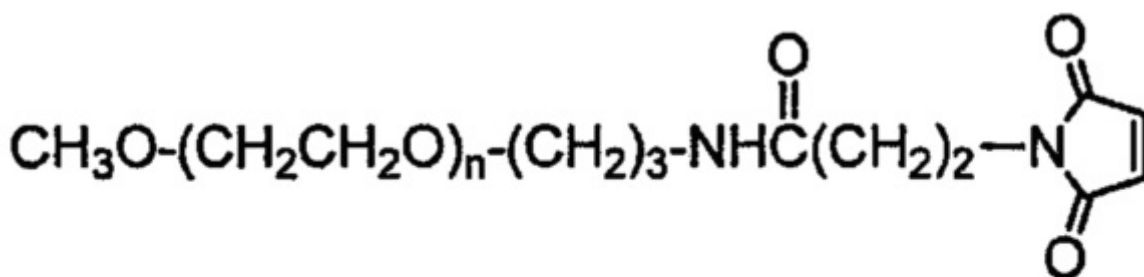


Формула (52)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{185}\text{H}_{296}\text{N}_{44}\text{O}_{94}\text{S}$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1558,6, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1169,2, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 935,5, факт. 1558,4, 1169,0, 925,6.

Пример синтеза 26. Синтез C(PEG2000)-(RADA)₅

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 21-1 (SEQ ID NO. 15) (15,9 мг, 7,13 мкмоль), и соединение, представленное следующей формулой (53) (малеимидированный PEG, наименование продукта: Sunbright™ ME-020MA, средний молекулярный вес 2333, фирмы NOF Corporation) (24,9 мг, 10,7 мкмоль, 1,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,4 мл), содержащем 8 М гуанидина, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч.



Формула (53)

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=75:25→40:60, 12 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (54) (SEQ ID NO. 21) (10,9 мг, 2,39 мкмоль, выход 34%).

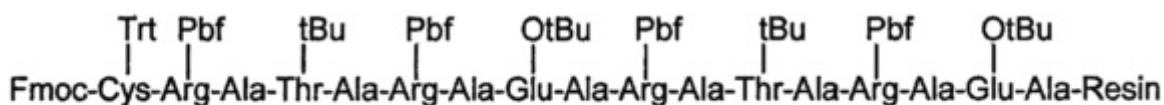


Формула (54)

Пример синтеза 27. Синтез C(асиало)-(RATARA EA)₂

27-1. Синтез Ac-C(RATARA EA)₂-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (55) (SEQ ID NO. 22). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (55)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (ТРА): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий

растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (56)(SEQ ID NO. 23) (32,7 мг).

Ac-Cys-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-NH₂

Формула (56)

27-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 27-1 (SEQ ID NO. 23) (7,3 мг, 4,02 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (17,7 мг, 16,5 мкмоль, 1,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 1,3 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→29:71, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (57) (SEQ ID NO. 24) (4,6 мг, 1,32 мкмоль, выход 33%).

Asialo
|
Ac-Cys-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-NH₂

Формула (57)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₂₃H₂₁₁N₃₅O₆₀S: [M+3H]³⁺ 1166,5, [M+4H]⁴⁺ 875,1, факт. 1166,2, 875,1.

Пример синтеза 28. Синтез C(diGlcNAc)-(RATARA EA)₂

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 27-1 (SEQ ID NO. 23) (20,0 мг, 11,0 мкмоль), и дисиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 7 (23,7 мг, 16,5 мкмоль, 1,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в DMSO (0,9 мл). В раствор добавляли DIPEA (5,8 мкл) и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 15 мин.

В реакционную смесь добавляли дистиллированную воду (4,0 мл) и подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→29:71, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (58) (SEQ ID NO. 25) (23,9 мг, 7,53 мкмоль, выход 68%).

DiGlcNAc
|
Ac-Cys-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-Arg-Ala-Thr-Ala-Arg-Ala-Glu-Ala-NH₂

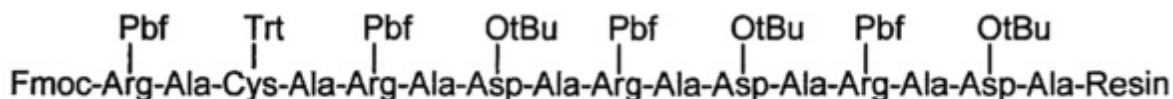
Формула (58)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₂₃H₂₁₁N₃₅O₆₀S: [M+3H]³⁺ 1058,4, [M+4H]⁴⁺ 794,0, факт. 1057,8, 793,9.

Пример синтеза 29. Синтез RAC(асиало)-A-(RADA)₃

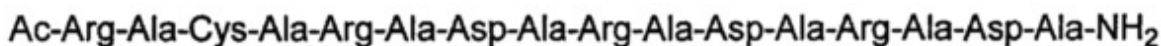
29-1. Синтез Ac-RACA-(RADA)₃-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (59) (SEQ ID NO. 26). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (59)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (60) (SEQ ID NO. 27) (32,7 мг).



Формула (60)

29-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 29-1 (SEQ ID NO. 27) (14,1 мг, 8,29 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (36,0 мг, 20,7 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,6 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→29:71, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (61) (SEQ ID NO. 28) (13,4 мг, 3,96 мкмоль, выход 48%).



Формула (61)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{129}H_{218}N_{34}O_{69}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1691,7, $[M+3H]^{3+}$ 1128,1, факт. 1691,8, 1128,2.

Пример синтеза 30. Синтез RAC(diGlcNAc)-A-(RADA)₃

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 29-1 (SEQ ID NO. 27) (10,1 мг, 5,94 мкмоль), и дисиаало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 7 (21,3 мг, 14,8 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,0 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (62) (SEQ ID NO. 29) (11,9 мг, 3,89 мкмоль, выход 66%).



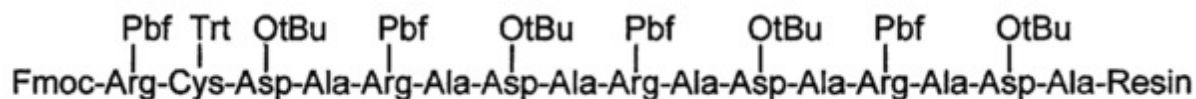
Формула (62)

ESI-MS: (m/z) теор. для $C_{117}H_{198}N_{34}O_{59}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1529,5, $[M+3H]^{3+}$ 1020,0, $[M+4H]^{4+}$ 765,3, факт. 1529,2, 1019,8, 765,1.

Пример синтеза 31. Синтез RC(acnano)-DA-(RADA)₃

31-1. Синтез Ac-RCDA-(RADA)₃-NH₂

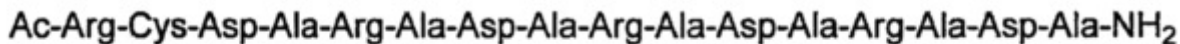
В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (63) (SEQ ID NO. 30). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (63)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент

А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (64) (SEQ ID NO. 31) (32,7 мг).



Формула (64)

31-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 31-1 (SEQ ID NO. 31) (14,8 мг, 8,48 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (37,4 мг, 21,2 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,8 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→29:71, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (65) (SEQ ID NO. 32) (21,7 мг, 6,34 мкмоль, выход 75%).



Формула (65)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{130}\text{H}_{218}\text{N}_{34}\text{O}_{71}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1713,7, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1142,8, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 857,3, факт. 1713,7, 1142,5, 857,1.

Пример синтеза 32. Синтез RC(diGlcNAc)-DA-(RADA)₃

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 31-1 (SEQ ID NO. 31) (11,0 мг, 6,30 мкмоль), и diGlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 9 (22,6 мг, 15,7 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (66) (SEQ ID NO. 33) (19,0 мг, 6,12 мкмоль, выход 97%).



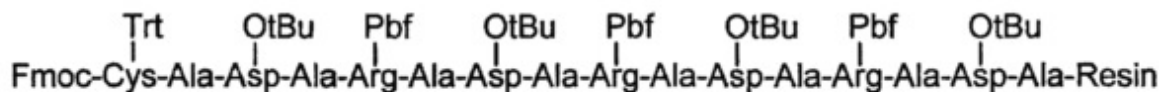
Формула (66)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{118}\text{H}_{198}\text{N}_{34}\text{O}_{61}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1551,6, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1034,7, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 776,3, факт. 1551,2, 1034,5, 776,1.

Пример синтеза 33. Синтез C(асиало)-ADA-(RADA)₃

33-1. Синтез Ac-CADA-(RADA)₃-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (67) (SEQ ID NO. 34). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (67)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=88:12→78:22%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (68) (SEQ ID NO. 35) (32,7 мг).



Формула (68)

33-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 33-1 (SEQ ID NO. 35) (13,0 мг, 7,83 мкмоль), и асиало-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 8 (34,5 мг, 19,6 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,6 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=95:5→29:71, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (69) (SEQ ID NO. 36) (15,2 мг, 4,55 мкмоль, выход 58%).



Формула (69)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₂₇H₂₁₁N₃₁O₇₁S: [M+2H]²⁺ 1671,1, [M+3H]³⁺ 1114,4, [M+4H]⁴⁺ 836,1, факт. 1671,2, 1114,1, 835,8.

Пример синтеза 34. Синтез C(diGlcNAc)-ADA-(RADA)₃

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 33-1 (SEQ ID NO. 34) (9,9 мг, 5,96 мкмоль), и diGlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 9 (21,4 мг, 15,7 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (70) (SEQ ID NO. 37) (10,9 мг, 3,61 мкмоль, выход 61%).

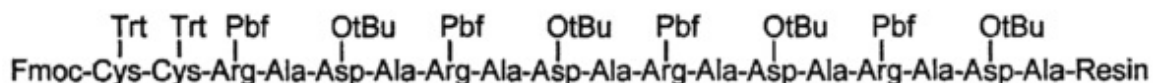


Формула (70)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₁₅H₁₉₁N₃₁O₆₁S: [M+2H]²⁺ 1509,0, [M+3H]³⁺ 1006,3, [M+4H]⁴⁺ 755,0, факт. 1508,7, 1006,1, 754,9.

Пример синтеза 35. Синтез 2C(мальтоза)-(RADA)₄35-1. Синтез Ac-2C-(RADA)₄-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (71) (SEQ ID NO. 38). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (71)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (72) (SEQ ID NO. 39).

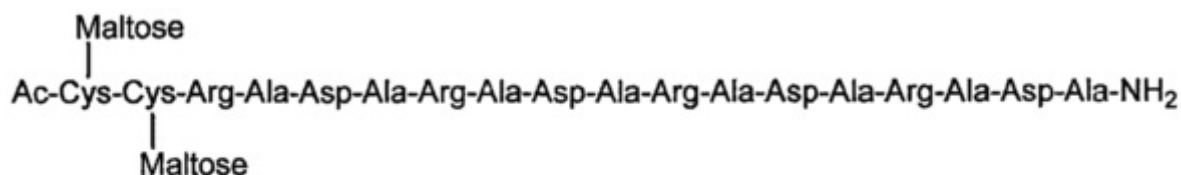
Ac-Cys-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH₂

Формула (72)

35-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 35-1 (SEQ ID NO. 39) (9,8 мг, 5,11 мкмоль), и BrAc-мальтозу, синтезированную в Примере синтеза 2 (11,8 мг, 54,6 мкмоль, 5,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 1,7 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (73) (SEQ ID NO. 40) (9,2 мг, 3,43 мкмоль, выход 67%).



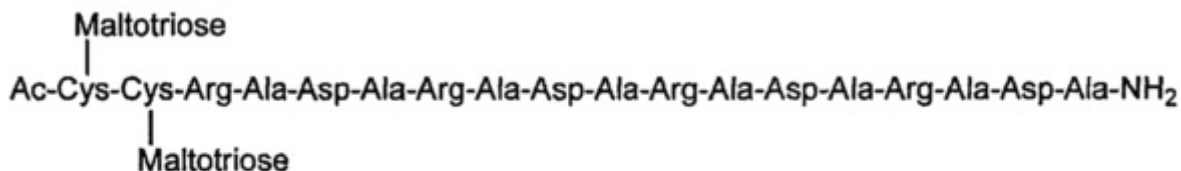
Формула (73)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₀₀H₁₆₉N₃₃O₄₉S₂: [M+2H]²⁺ 1341,9, [M+3H]³⁺ 894,9, [M+4H]⁴⁺ 671,4, факт. 1341,6, 894,7, 671,3.

Пример синтеза 36. Синтез 2C(мальтотриоза)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 35-1 (SEQ ID NO. 39) (17,5 мг, 9,12 мкмоль), и BrAc-мальтотриозу, синтезированную в Примере синтеза 3 (34,1 мг, 54,6 мкмоль, 6,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 3,1 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (74) (SEQ ID NO. 41) (19,6 мг, 3,61 мкмоль, выход 72%).



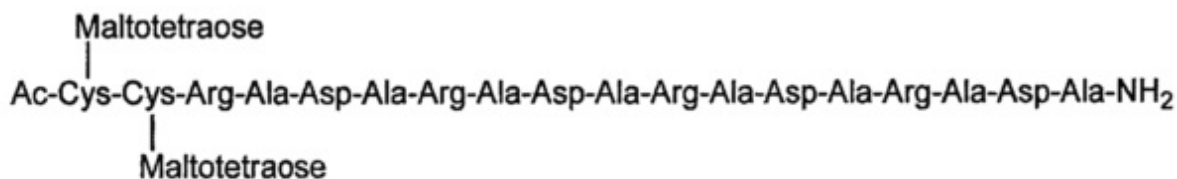
Формула (74)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₁₂H₁₈₉N₃₃O₅₉S₂: [M+2H]²⁺ 1504,0, [M+3H]³⁺ 1003,0, [M+4H]⁴⁺ 752,5, факт. 1503,7, 1002,7, 752,3.

Пример синтеза 37. Синтез 2C(мальтотетраоза)-(RADA)₄

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 35-1 (SEQ ID NO. 39) (9,8 мг, 5,11 мкмоль), и BгAc-мальтотетраозу, синтезированную в Примере синтеза 4 (20,1 мг, 25,5 мкмоль, 5,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 1,7 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (75) (SEQ ID NO. 42) (10,6 мг, 3,18 мкмоль, выход 62%).



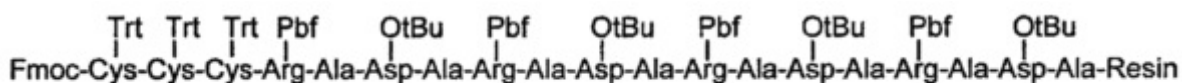
Формула (75)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{124}\text{H}_{209}\text{N}_{33}\text{O}_{69}\text{S}_2$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1666,2, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1111,1, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 833,6, факт. 1666,2, 1110,8, 833,3.

Пример синтеза 38. Синтез 3C(мальтоза)-(RADA)₄

38-1. Синтез Ac-3C-(RADA)₄-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (76) (SEQ ID NO. 43). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (76)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 11 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (77) (SEQ ID NO. 44).

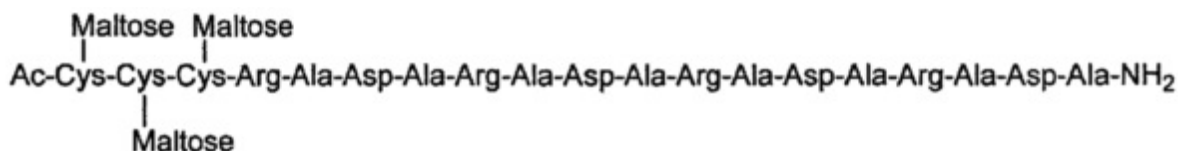
Ac-Cys-Cys-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH₂

Формула (77)

38-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 38-1 (SEQ ID NO. 44) (15,0 мг, 7,42 мкмоль), и BrAc-мальтозу, синтезированную в Примере синтеза 2 (20,6 мг, 44,6 мкмоль, 6,0 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,4 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (78) (SEQ ID NO. 45) (16,1 мг, 5,09 мкмоль, выход 69%).



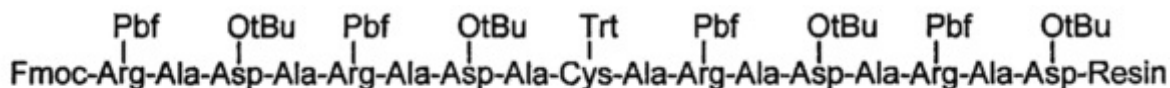
Формула (78)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₁₇H₁₉₇N₃₅O₆₁S₃: [M+2H]²⁺ 1584,1, [M+3H]³⁺ 1056,4, [M+4H]⁴⁺ 792,6, факт. 1583,7, 1056,1, 792,4.

Пример синтеза 39. Синтез (RADA)₂-C(мальтоза)-(ARAD)₂

39-1. Синтез Ac-(RADA)₂-C-(ARAD)₂-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (79) (SEQ ID NO. 46). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (79)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий

растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (80) (SEQ ID NO. 47).

Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-NH₂

Формула (80)

39-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 39-1 (SEQ ID NO. 47) (15,4 мг, 8,48 мкмоль), и BrAc-мальтозу, синтезированную в Примере синтеза 2 (9,8 мг, 21,2 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,9 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (81) (SEQ ID NO. 48) (17,8 мг, 8,10 мкмоль, выход 96%).

Maltose
|
Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-NH₂

Формула (81)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₈₃H₁₄₁N₃₁O₃₇S: [M+2H]²⁺ 1099,6, [M+3H]³⁺ 733,4, [M+4H]⁴⁺ 550,3, факт. 1099,5, 733,0, 550,2.

Пример синтеза 40. Синтез (RADA)₂-C(мальтотриоза)-(ARAD)₂

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 39-1 (SEQ ID NO. 47) (14,8 мг, 8,15 мкмоль), и BrAc-мальтотриозу, синтезированную в Примере синтеза 3 (12,7 мг, 20,3 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,8 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (82) (SEQ ID NO. 49) (13,8 мг, 5,85 мкмоль, выход 72%).

Maltotriose
|
Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-NH₂

Формула (82)

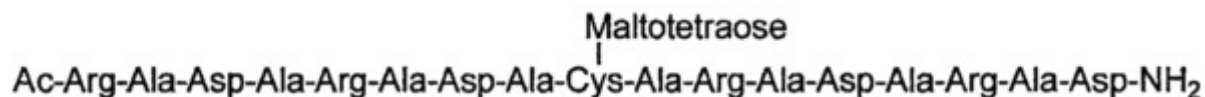
ESI-MS: (m/z) теор. для C₈₉H₁₅₁N₃₁O₄₂S: [M+2H]²⁺ 1180,2, [M+3H]³⁺ 787,1, [M+4H]⁴⁺ 590,6, факт. 1180,5, 787,0, 590,8.

Пример синтеза 41. Синтез (RADA)₂-C(мальтотетраоза)-(ARAD)₂

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 39-1 (SEQ ID NO. 47) (14,0 мг, 7,71 мкмоль), и BrAc-мальтотетраозу, синтезированную в Примере синтеза 4 (15,2 мг, 20,3

мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,6 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2,5 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. ТФА, В: 0,09% ТФА/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (83) (SEQ ID NO. 50) (14,9 мг, 5,91 мкмоль, выход 77%).



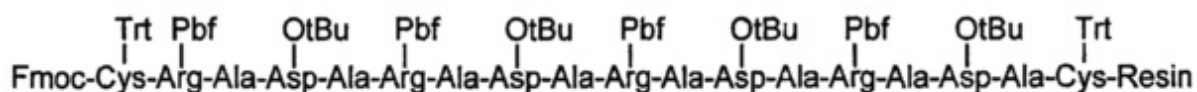
Формула (83)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{95}\text{H}_{161}\text{N}_{31}\text{O}_{47}\text{S}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1261,8, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 841,5, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 631,4, факт. 1261,6, 841,4, 631,3.

Пример синтеза 42. Синтез C(мальтоза)-(RADA)₄-C(мальтоза)

42-1. Синтез Ac-C-(RADA)₄-C-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Cys(Trt)-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и 2,4,6-триметилпиридина (79,3 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 1 часа. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (84) (SEQ ID NO. 51). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



Формула (84)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (ТФА): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонок: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. ТФА, В: 0,09% ТФА/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (85) (SEQ ID NO. 52).

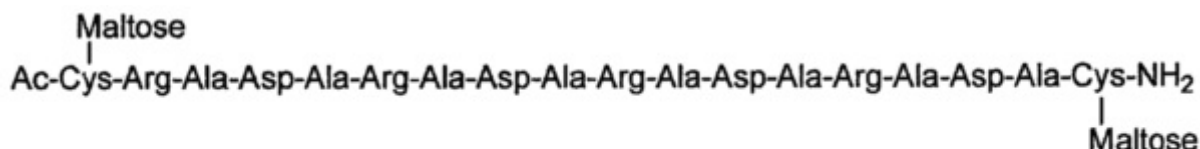


Формула (85)

42-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 42-1 (SEQ ID NO. 52) (14,7 мг, 7,66 мкмоль), и BrAc-мальтозу, синтезированную в Примере синтеза 2 (17,7 мг, 38,3 мкмоль, 5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,6 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (86) (SEQ ID NO. 53) (6,5 мг, 2,42 мкмоль, выход 32%).



Формула (86)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{100}\text{H}_{169}\text{N}_{33}\text{O}_{49}\text{S}_2$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1341,9, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 894,9, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 671,4, факт. 1341,5, 894,7, 671,3.

Пример синтеза 43. Синтез C(мальтотриоза)-(RADA)₄-C(мальтотриоза)

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 42-1 (SEQ ID NO. 52) (13,9 мг, 7,24 мкмоль), и BrAc-мальтотриозу, синтезированную в Примере синтеза 3 (22,6 мг, 36,2 мкмоль, 5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,3, 2,5 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (87) (SEQ ID NO. 54) (9,6 мг, 3,19 мкмоль, выход 44%).



Формула (87)

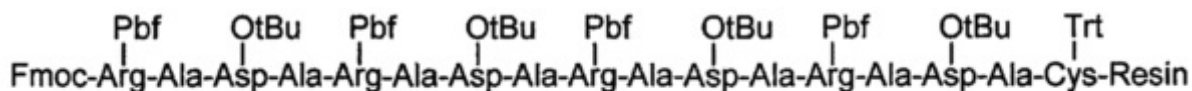
ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{112}\text{H}_{189}\text{N}_{33}\text{O}_{59}\text{S}_2$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1504,1, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1003,0, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 752,5, факт. 1503,8, 1002,8, 752,4.

Пример синтеза 44. Синтез Ac-(RADA)₄-C(diGlcNAc)

44-1. Синтез Ac-(RADA)₄-C-NH₂

В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Cys(Trt)-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и 2,4,6-триметилпиридина (79,3 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5 мл) и все это встряхивали в течение 1 часа. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20%

пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (88) (SEQ ID NO. 55).
 Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего
 5 реагента HCTU.



Формула (88)

Защитную группу Fmoc удаляли обработкой 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли уксусный ангидрид и пиридин и встряхивали в течение 1 часа. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан : этандитиол (90:2,5:5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к
 15 фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент
 20 А:В=90:10→75:25%, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая полипептид, представленный следующей формулой (89) (SEQ ID NO. 56).



Формула (89)

44-2. Реакция гликозилирования тиола

Полипептид, синтезированный в Примере синтеза 44-1 (SEQ ID NO. 56) (15,1 мг, 8,31 мкмоль), и diGlcNAc-BrAc, синтезированный в Примере синтеза 9 (29,8 мг, 20,8 мкмоль, 2,5 экв. относ. пептида 1), растворяли в 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,3, 2,8 мл), содержащем 33 мкМ ТСЕР и 8 М гуанидина гидрохлорида, и проводили реакцию при
 30 комнатной температуре в течение 3 ч.

Реакционную смесь подвергали очистке методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая
 35 комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (90) (SEQ ID NO. 57) (15,8 мг, 5,01 мкмоль, выход 60%).



Формула (90)

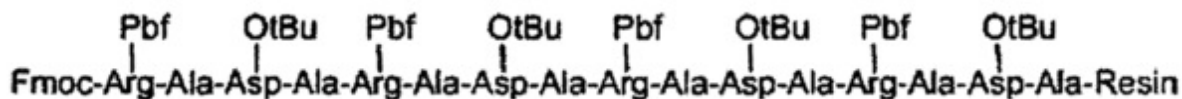
ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₂₁H₂₀₃N₃₅O₆₂S: [M+2H]²⁺ 1587,1, [M+3H]³⁺ 1058,4, [M+4H]⁴⁺ 794,0, факт. 1586,7, 1058,1, 793,8.

Пример синтеза 45. Синтез Ac-N(асиало)-(RADA)₄

45-1. Синтез Fmoc-(RADA)₄-смола

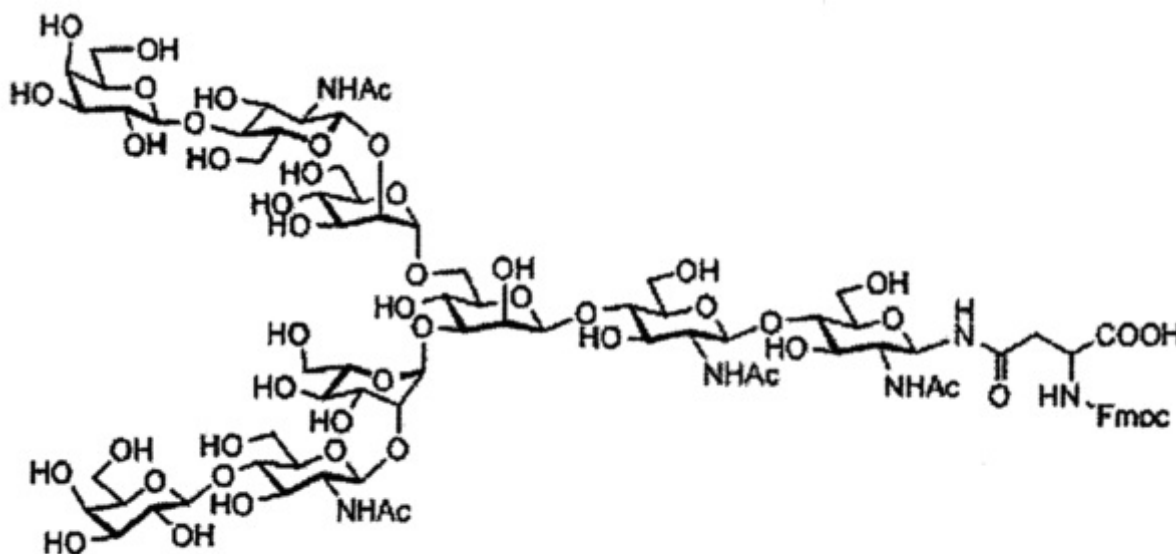
В колонку для твердофазного синтеза вносили смолу Rink-Amide-PEGA (100 мкмоль), промывали DMF и дихлорметаном, а затем добавляли раствор Fmoc-Ala-OH (124,5 мг, 400 мкмоль), HCTU (157,2 мг, 380 мкмоль) и DIPEA (104,5 мкл, 600 мкмоль) в DMF (2,5

мл) и все это встряхивали в течение 15 мин. После промывки дихлорметаном и DMF удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF методом твердофазного синтеза пептидов на пептидном синтезаторе Prelude™ синтезировали связанный со смолой полипептид, блокированный Fmoc, представленный следующей формулой (91) (SEQ ID NO. 58). Реакцию конденсации проводили в DMF, используя в качестве конденсирующего реагента HCTU.



45-2. Реакция конденсации сахаридной цепочки на смоле

У связанного со смолой полипептида (10 мкмоль), синтезированного в Примере синтеза 45-1, удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном последовательно добавляли Fmoc-Asn (Асиало)-ОН, представленный следующей формулой (92) (29,8 мг, 15 мкмоль), DMF-DMSO (1:1, об/об, 433 мкл), О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TBTU) (6,4 мг, 30 мкмоль) и DIPEA (5,2 мкл, 30 мкмоль) и встряхивали в течение ночи. После промывки DMF и дихлорметаном удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли раствор уксусной кислоты (2,86 мкл, 50 мкмоль), 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (6,8 мг, 50 мкмоль) и N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC) (7,3 мкл, 50 мкмоль) в DMF (500 мкл) и встряхивали в течение 1 ч.



Формула (92)

После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (ТРА): вода : триизопропилсилан (95:2,5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Carcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. ТФА, В: 0,09% ТФА/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (93) (SEQ ID NO. 59) (5,5 мг).

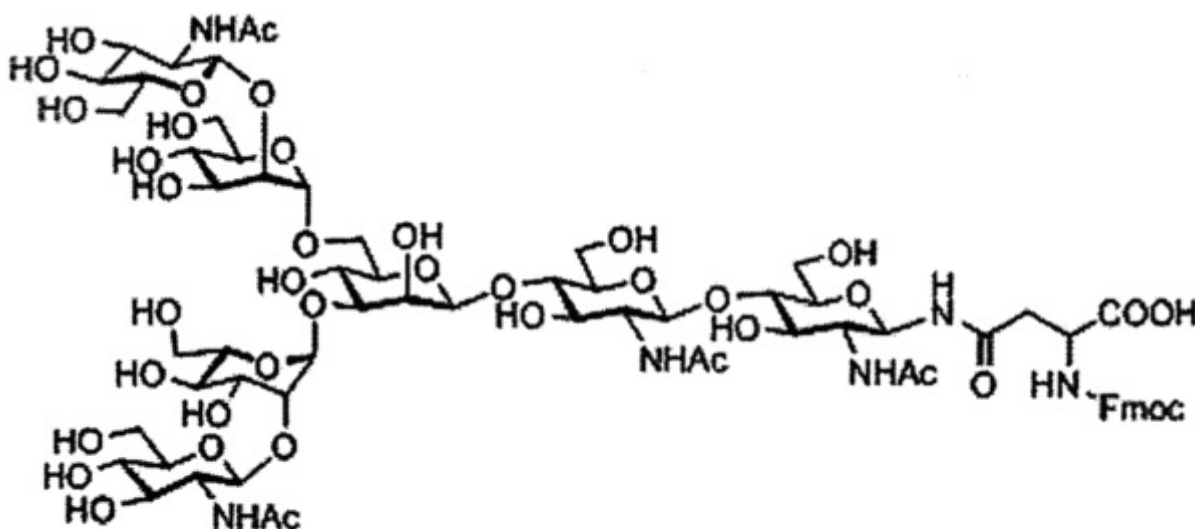


Формула (93)

ESI-MS: (m/z) теор. для C₁₃₂H₂₂₁N₃₅O₇₂: [M+2H]²⁺ 1726,2, [M+3H]³⁺ 1151,1, [M+4H]⁴⁺ 863,6, факт. 1726,0, 1150,8, 863,4.

Пример синтеза 46. Синтез Ac-N(diGlcNAc)-(RADA)₄

У связанного со смолой полипептида (32,1 мкмоль), синтезированного в Примере синтеза 45-1, удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном последовательно добавляли Fmoc-Asn(diGlcNAc)-OH, представленный следующей формулой (94) (79,5 мг, 15 мкмоль), DMF-DMSO (1:1, об/об, 2,5 мл), TBTU (20,6 мг, 96,3 мкмоль) и DIPEA (17,2 мкл, 96,3 мкмоль) и встряхивали в течение 2 ч. После промывки DMF и дихлорметаном удаляли защитную группу Fmoc путем обработки 20% пиперидином в DMF. После промывки DMF и дихлорметаном добавляли раствор уксусной кислоты (9,2 мкл, 160,5 мкмоль), HOBt (21,6 мг, 160,5 мкмоль) и DIC (25,1 мкл, 160,5 мкмоль) в DMF (2 мл) и встряхивали в течение 1 ч.



Формула (94)

После промывки DMF и дихлорметаном добавляли смесь трифторуксусная кислота (TFA): вода : триизопропилсилан (95:2,5:2,5) и встряхивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, к фильтрату добавляли охлажденный диэтиловый эфир и получали неочищенный пептид в виде осадка. Часть неочищенного пептида очищали методом HPLC [колонка: Shiseido Capcell PAK C18 UG-120 (5 мкм), ф 20×250 мм, скорость потока: 7,0 мл/мин, элюирующий растворитель А: 0,1% водн. TFA, В: 0,09% TFA/10% вода/90% ацетонитрил, градиент А:В=90:10→75:25%, 15 мин при элюции линейным градиентом концентраций], получая комплекс сахаридная цепочка-полипептид, представленный следующей формулой (95) (SEQ ID NO. 60) (31,2 мг).



Формула (95)

ESI-MS: (m/z) теор. для $\text{C}_{120}\text{H}_{201}\text{N}_{35}\text{O}_{62}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1564,1, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1043,0, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 782,5, факт. 1563,7, 1043,8, 782,3.

Пример 1. Оценка свойств гидрогелей испытанием на нагрузку стальным шариком - 1

Растворяли 10 мг комплекса типа сахаридная цепочка-полипептид или 10 мг контрольного полипептида в 500 мкл сверхчистой воды, получая 2% масс. растворы полипептидов. Равные количества этих растворов и различных буферов вносили в пробирки Durham (6×30 мм, Maruemu Corporation) и при интенсивном перемешивании на вибромешалке получали гидрогели с концентрацией пептида в 1% масс. При этом в качестве буфера использовали цитрат-фосфатный буфер (pH 2,0 и 3,5), фосфатный буфер (pH 7,4) и NaOH-фосфатный буфер (pH 11,5). Поверхность гидрогеля внутри пробирки Durham выравнивали горизонтально, оставляя неподвижным на 20 мин при комнатной температуре, а затем на гидрогель наносили стальной шарик (диаметр 1,56 мм, вес 16 мг, Funabe Seiko Co., Ltd.). Через 10 мин проверяли положение стального шарика путем визуального наблюдения.

Положение стального шарика внутри трубки Durham оценивали в 3 градациях. Состояние, когда стальной шарик оставался у поверхности гидрогеля, оценивалось как о, опускание после нанесения и зависание внутри оценивалось как Δ, а опускание на дно пробирки Durham оценивалось как ×. Кроме того, добавляли * в тех случаях, когда гидрогель был неоднородным и наблюдалось помутнение или нерастворимое вещество (осадок). Прозрачным и однородным гелем считали гидрогель, в котором стальной шарик оставался у поверхности (о) и не отмечалось помутнения или нерастворимого вещества (без *). Полученные фотографии представлены на фиг. 1, а результаты оценки приведены в таблице 1.

В таблице 1 "количество сахаридных остатков" означает общее количество остатков сахаридов в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид. Кроме того, номера соединений, приведенные в таблице, установлены для удобства описания и не совпадают с номерами примеров их получения.

Таблица 1

№	Название соединения	Количество сахаридных остатков	pH			
			2,0	3,5	7,4	11,5
1	(RADA) ₄	—	о	Δ*	×*	×*
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	о	о	о	о

Как видно из фиг. 1 и таблицы 1, C(diGlcNAc)-(RADA)₄ образует прозрачные и однородные гидрогели во всем диапазоне pH (pH 2,0 - pH 11,5), а стальной шарик остается у поверхности гидрогеля. С другой стороны, (RADA)₄ дает прозрачный и однородный гидрогель при pH 2,0, причем стальной шарик остается у поверхности гидрогеля, но образует неоднородный гидрогель с помутнением при pH 3,5 или выше, а стальной шарик проникает внутрь гидрогеля или оседает на дно трубки Durham.

Из вышеизложенного ясно, что C(diGlcNAc)-(RADA)₄ может образовывать прозрачный и однородный гидрогель с сохранением прочности гидрогеля при нейтральном pH.

Пример 2. Оценка свойств гидрогелей испытанием на нагрузку стальным шариком-2

Проводили испытания на нагрузку стальным шариком с C(дисиало)-(RADA)₄, C(асиало)-(RADA)₄, C(дисиало)-(RADA)₅, C(diGlcNAc)-(RADA)₅ и (RADA)₄ таким же методом, как в Примере 1. Полученные результаты оценки представлены в таблице 2.

Таблица 2

№	Название соединения	Количество сахаридных остатков	pH	
			3,5	7,4
1	(RADA) ₄	—	Δ*	×*
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	○	○
3	C(дисиало)-(RADA) ₄	11	○	○
4	C(асиало)-(RADA) ₄	9	○	○
5	C(дисиало)-(RADA) ₅	11	○	○
6	C(асиало)-(RADA) ₅	9	○	○
7	C(diGlcNAc)-(RADA) ₅	7	○	○

Как видно из таблицы 2, при модификации полипептида сравнительной большой сахаридной цепочкой на конце (RADA)₄ образуются прозрачные и однородные гидрогели с сохранением прочности гидрогеля при нейтральном pH. Полагаем, что это является результатом модификации полипептида громоздкой сахаридной цепочкой с высокой растворимостью в воде, что вызывает подавление излишних связей между пептидными цепями, улучшение растворимости комплекса в воде или то и другое.

Из вышеизложенного ясно, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид, которые представляют собой (RADA)₄ или (RADA)₅, модифицированные различными сахаридными цепочками, тоже могут образовывать прозрачные и однородные гидрогели с сохранением прочности гидрогеля при нейтральном pH.

Пример 3. Оценка свойств гидрогелей испытанием на нагрузку стальным шариком - 3

Таким же методом, как в Примере 1, проводили испытания на нагрузку стальным шариком с C(diGlcNAc)-(RADA)₄ при концентрации гидрогеля 1% масс., 0,5% масс. и 0,25% масс. Полученные результаты оценки представлены в таблице 3.

Таблица 3

№	Название соединения	Количество сахаридных остатков	Концентрация гидрогеля	pH	
				3,5	7,4
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	1% масс.	○	○
			0,5% масс.	○	○
			0,25% масс.	×	○

Как видно из таблицы 3, C(diGlcNAc)-(RADA)₄ образует однородный гидрогель при pH 7,4 даже в диапазоне низких концентраций. Более того, при снижении концентрации гидрогеля до 0,25% масс. C(diGlcNAc)-(RADA)₄ образует однородный гидрогель только

при pH 7,4. Из этого следует, что образование гидрогеля C(diGlcNAc)-(RADA)₄ можно контролировать с помощью pH при низкой концентрации гидрогеля.

Таким образом, было установлено, что комплекс сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению может образовывать прозрачный и однородный гидрогель с сохранением прочности гидрогеля в водном растворе с нейтральным pH даже при низкой концентрации гидрогеля. Также было установлено, что образование гидрогеля у комплекса типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению можно контролировать с помощью pH при низкой концентрации гидрогеля.

Пример 4. Оценка свойств гидрогелей испытанием на нагрузку стальным шариком - 4

Таким же методом, как в Примере 1, только при концентрации гидрогеля в 0,5% масс., проводили испытания на нагрузку стальным шариком с C(diGlcNAc)-(RADA)₄, 2C(мальтоза)-(RADA)₄, 2C(мальтотриоза)-(RADA)₄, C(мальтоза)-(RADA)₄-C(мальтоза), C(мальтотриоза)-(RADA)₄-C(мальтотриоза), 3C(мальтоза)-(RADA)₄, (RADA)₄-C(diGlcNAc), C(мальтогептаоза)-(RADA)₄, (RATARA EA)₂ и C(diGlcNAc)-(RATARA EA)₂. Полученные результаты оценки представлены в таблице 4.

Таблица 4

№	Название соединения	Количество сахаридных остатков	pH	
			3,5	7,4
1	(RADA) ₄	—	Δ*	×*
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	○	○
8	2C(мальтоза)-(RADA) ₄	4	○*	×*
9	2C(мальтотриоза)-(RADA) ₄	6	○	○
10	C(мальтоза)-(RADA) ₄ -C(Мальтоза)	4	○*	×*
11	C(мальтотриоза)-(RADA) ₄ -C(мальтотриоза)	6	○	○
12	3C(мальтоза)-(RADA) ₄	6	○	○
13	(RADA) ₄ -C(diGlcNAc)	7	○	○
14	C(PEG2000)-(RADA) ₄	—	×	×
15	C(PEG2000)-(RADA) ₅	—	×	×
16	(RATARA EA) ₂	—	×*	×*
17	C(diGlcNAc)-(RATARA EA) ₂	7	○	○

Как видно из таблицы 4, соединения №2, 9, 11, 12, 13 и 17, у которых общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 5 или больше, образуют прозрачные и однородные гидрогели при pH 3,5 и pH 7,4. Хотя это и не показано в таблице, комплекс сахаридная цепочка-полипептид, содержащий C(diBn-дисиало), связанный с N-концом (RADA)₄ (11 сахаридных остатков), также образует прозрачный и однородный гидрогель при pH 7,4. С другой стороны, соединения №8 и №10, у которых общее количество сахаридных остатков в сахаридной цепочке, связанной с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, составляет 4 или меньше, не образуют гидрогели при pH 7,4.

Таким образом, ясно, что когда сахаридная цепочка, у которой общее количество сахаридных остатков составляет 5 или больше, связывается с полипептидом, обладающим свойством самосборки в водном растворе, то такой комплекс сахаридная цепочка-полипептид будет проявлять хорошую растворимость в воде и образовывать

прозрачный и однородный гидрогель в нейтральном диапазоне pH. Далее, становится ясно, что прозрачный и однородный гидрогель образуется при pH 3,5 и pH 7,4 не только тогда, когда сахаридная цепочка, связанная с комплексом типа сахаридная цепочка-полипептид, сама по себе содержит разветвление (типа сахаридных цепочек diGlcNAc у №2 и №13, а также дисиаловых и асиаловых сахаридных цепочек, приведенных в таблице 2), но и тогда, когда это линейные сахаридные цепочки (типа мальтозных или мальтотриозных сахаридных цепочек), если только сахаридная цепочка содержит разветвления в комплексе сахаридная цепочка-полипептид в целом типа двух или нескольких цепочек, связанных с одним полипептидом, как-то у №9, №11 и №12.

Далее, хотя метод связывания PEG с полипептидом применяется для улучшения водорастворимости полипептидов и при связывании PEG2000 с (RADA)₄ и (RADA)₅ (№14 и №15) не отмечались нерастворимые вещества, однако однородные гидрогели не образовывались при pH 3,5 и pH 7,4. Таким образом, ясно, что комплексы сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению проявляют более высокую растворимость в воде и образуют более прозрачные и однородные гидрогели, чем комплексы PEG-полипептид.

Кроме того, у №11 сахаридные цепочки связаны с N- и C-концевым участком полипептида, а у №13 сахаридная цепочка связана с C-концевой частью полипептида. Оба они проявляют высокую растворимость в воде и образуют прозрачные и однородные гидрогели при pH 3,5 и pH 7,4. Таким образом, ясно, что у комплексов типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению местом связывания сахаридной цепочки может служить не только N-концевая часть, но и C-концевая часть полипептида, равно как и оба концевых участка.

Далее, известно, что полипептид (RATARA EA)₂, как и (RADA)₄ или (RADA)₅, образует гидрогель. Улучшение гелеобразующей способности при связывании сахаридной цепочки с (RATARA EA)₂ оценивали испытанием на нагрузку стальным шариком. Как видно из таблицы 4, соединение №16, у которого нет сахаридной цепочки, связанной с (RATARA EA)₂, образует неоднородный и мутный гидрогель, а стальной шарик падает на дно пробирки Durham при pH 3,5 и 7,4. С другой стороны, соединение №17, то есть комплекс сахаридная цепочка-полипептид, у которого C(diGlcNAc) связан с N-концевой частью (RATARA EA)₂, образует прозрачный и однородный гель при pH 3,5 и pH 7,4. Хотя это и не показано в таблице, комплекс сахаридная цепочка-полипептид, у которого C(асиало) связан с N-концом (RATARA EA)₂, тоже образует прозрачный и однородный гидрогель при pH 7,4. Таким образом, ясно, что если с полипептидом, составляющим (RATARA EA)₂, связана сахаридная цепочка, то проявляется большая растворимость в воде и образуется более прозрачный и однородный гидрогель.

Из вышеприведенных результатов видно, что комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид, который образует прозрачный и однородный гель в широком диапазоне pH, включая нейтральный диапазон, может быть получен при связывании сахаридной цепочки не только с (RADA)₄, но также и с полипептидами с другими последовательностями.

Пример 5. Оценка свойств гидрогелей испытанием на нагрузку стальным шариком - 5

Проводили испытания на нагрузку стальным шариком с N(асиало)-(RADA)₄, N(diGlcNAc)-(RADA)₄ и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ таким же методом, как в Примере 1.

Полученные результаты оценки представлены в таблице 5.

Таблица 5

№	Название соединения	Количество сахаридных остатков	pH	
			3,5	7,4
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	○	○
18	N(асиало)-(RADA) ₄	9	○	○
19	N(diGlcNAc)-(RADA) ₄	7	○	○

Как видно из таблицы 5, соединения №18 и 19, у которых сахаридные цепочки комплекса связаны с аспарагином, как и №2, у которого сахаридная цепочка комплекса связана с цистеином, образуют прозрачные и однородные гидрогели при pH 3,5 и pH 7,4. Таким образом, ясно, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образуют прозрачные и однородные гидрогели даже тогда, когда аминокислота, с которой связана сахаридная цепочка, представлена не цистеином.

Пример 6. Исследование применимости в качестве гемостатического материала

Проводили оценочное испытание с использованием плазмы крови крыс для проверки того, можно ли использовать гидрогель, содержащий комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, в качестве гемостатического материала.

Готовили водные растворы полипептидов таким же образом, как в Примере 1. Брали кровь у 7-недельных крыс Crlj: WI с введением гепарина натрия (Ajinomoto) и получали плазму крови из надосадочной жидкости после центрифугирования. Водные растворы полипептидов, плазму крови и PBS вносили в пробирки Durham и готовили гидрогели таким образом, чтобы концентрация плазмы составляла 5-50%, а концентрация полипептида составляла 0,5% масс. После этого их оставляли на 20 мин при комнатной температуре, а затем проводили испытание на нагрузку стальным шариком таким же способом, как в Примере 1. Фотографии гидрогелей после выдерживания в течение 20 мин представлены на фиг. 2, а результаты оценки приведены в таблице 6.

Таблица 6

№	Название соединения	Концентрация плазмы				Примечания
		50%	25%	10%	5%	
1	(RADA) ₄	Δ*	Δ*	×*	×*	Отмечались осадки при всех концентрациях. При 50% шарик застревал на осадке
2	C(diGlcNAc)-(RADA) ₄	○	○	○	○	

Как видно из фиг. 2 и таблицы 6, растворы полипептидов, содержащие C(diGlcNAc)-(RADA)₄, образуют однородные гидрогели независимо от концентрации плазмы. Вне ожидания, C(diGlcNAc)-(RADA)₄ образует однородный гидрогель даже при высокой концентрации плазмы в 50%. С другой стороны, растворы полипептидов, содержащие C(diGlcNAc)-(RADA)₄, были мутными, и наблюдались нерастворимые вещества при

всех концентрациях плазмы. Кроме того, у каждого гидрогеля проверяли pH и все они оказались между pH 6 и 8. Таким образом, ясно, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению не только образуют однородный гидрогель при нейтральном pH, но и с меньшей вероятностью образуют нерастворимые вещества, причем образуют прозрачный гидрогель даже при высокой концентрации плазмы крови.

Из вышеприведенных результатов видно, что комплексы типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению имеют очень высокую применимость в качестве гемостатической фармацевтической композиции.

Пример 7. Исследование способности к контролируемому высвобождению для кислого белка

Проводили испытание для изучения того, может ли гидрогель, содержащий комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению, применяться в качестве носителя для контролируемого высвобождения при нейтральном pH.

В качестве буфера использовали фосфатный буфер (pH 7,4). Кроме того, в качестве кислого белка, инкапсулируемого в гидрогель, использовали бычий сывороточный альбумин (BSA), флуоресцентно меченый Alexa Fluor™ 488 (A13100, Life Technologies).

Компоненты вносили в пробирки так, чтобы концентрация буферной соли составляла 0,15 М, концентрация BSA - 5 мкМ, а концентрация полипептида - 0,25-1% масс., и перемешивали на вибромешалке. Для получения инкапсулирующих BSA гидрогелей вносили по 50 мкл смеси в Multiwell Insert System (351130, BD) и оставляли на ночь в инкубаторе при 37°C (инкубатор с CO₂ для культуры клеток, MCO-18AIC, Sanyo) с затенением. В инкубаторе на 37°C вставляли Insert System в 96-луночный плоскодонный планшет (353928, BD) с таким же буфером, как в добавляемом гидрогеле, по 225 мкл на лунку, и встряхивали планшет на качалке (Micro Plate Mixer NS-P, AS One Corporation, скорость вращения: 1/5 по шкале), запуская испытание (0 ч). После этого измеряли по времени уровень выделяющейся из геля флуоресценции со стороны плоского дна планшета на считывающем устройстве для флуоресценции (SpectraMax M3, Molecular Devices, LLC). Строили стандартную кривую по такому же флуоресцентно меченому BSA и рассчитывали концентрацию белка по количеству выделяющегося флуоресцентного красителя. На фиг. 3 представлены результаты для гидрогеля, содержащего (RADA)₄, и гидрогеля, содержащего C(diGlcNAc)-(RADA)₄. В качестве контроля использовали раствор одного лишь BSA, добавленного в буфер (без SAP). На фиг. 3 по оси Y приведена концентрация BSA в плоскодонном планшете, а по оси X - время, прошедшее от начала испытания.

Как видно из фиг. 3, большая часть BSA, инкапсулированного в гидрогеле, содержащем (RADA)₄, выделяется за короткое время после запуска испытания. Кроме того, скорость его выделения при концентрации полипептида в 0,5% масс, или меньше была эквивалентна скорости выделения из раствора без полипептида, свидетельствуя, что он не обладает способностью к контролируемому высвобождению. С другой стороны, у гидрогеля, содержащего C(diGlcNAc)-(RADA)₄, скорость выделения BSA была низкой по сравнению с раствором вообще без полипептида даже при столь низкой концентрации, как 0,25% масс., что свидетельствует о способности к контролируемому высвобождению.

Таким образом, ясно, что комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению инкапсулирует и удерживает кислый белок при нейтральном pH и обладает эффектом контролируемого высвобождения.

Пример 8. Исследование способности к контролируемому высвобождению для основного белка

Проводили испытание контролируемого высвобождения таким же способом, как описано в Примере 7, за исключением того, что в качестве инкапсулируемого белка использовали основной белок лизоцим. Для этого лизоцим метили Alexa Fluor™ 488 с помощью набора Alexa Fluor™ 488 Protein Labeling Kit (A10235, Invitrogen). Результаты представлены на фиг. 4.

Как видно из фиг. 4, большая часть лизоцима, инкапсулированного в гидрогеле, содержащем (RADA)₄, выделяется в пределах 1 часа после запуска испытания. Кроме того, скорость его выделения была почти равна скорости выделения из раствора без полипептида, свидетельствуя, что он не обладает способностью к контролируемому высвобождению. С другой стороны, у гидрогеля, содержащего C(diGlcNAc)-(RADA)₄, скорость выделения лизоцима была низкой по сравнению с раствором без полипептида даже при столь низкой концентрации, как 0,25% масс., что свидетельствует о способности к контролируемому высвобождению.

Таким образом, ясно, что комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению инкапсулирует и удерживает основной белок при нейтральном pH и обладает эффектом контролируемого высвобождения.

Пример 9. Измерение и анализ кругового дихроизма (CD)

Проводили измерения CD для подтверждения того, что комплекс типа сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образует структуру β-листа. В общем, если вещество имеет структуру β-листа, то наблюдаются такие характеристики длин волн, как положительное поглощение примерно при 197 нм и отрицательное поглощение примерно при 216 нм. Поэтому в настоящем изобретении обращали внимание именно на эти длины волн и исследовали влияние pH на структуру β-листа.

В сверхчистой воде растворяли C(diGlcNAc)-(RADA)₄, представляющий одно из воплощений настоящего изобретения, или (RADA)₄ в качестве контроля. Для доведения pH в каждый из этих водных растворов полипептидов добавляли водный раствор гидроксида натрия от 1 до 10 мМ и получали 100 мМ водные растворы полипептидов при pH 2 или pH 7. Эти водные растворы вносили в кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0,1 см. Затем снимали спектр CD на спектрополяриметре (J-805, Jasco) при длинах волн 185-260 нм по эллиптичности (в миллиградусах). Рассчитывали среднюю эллиптичность остатков θ по следующей формуле:

$$[\theta] = (\theta_{\text{obs}} / 10 \times l \times c) / r,$$

где θ_{obs} - эллиптичность в миллиградусах, l - толщина кюветы (см), c - концентрация (М) и R - количество аминокислотных остатков.

На фиг. 5 представлены результаты для (RADA)₄, а на фиг. 6 - для C(diGlcNAc)-(RADA)₄.

Как видно из фиг. 5 и 6, и (RADA)₄, и C(diGlcNAc)-(RADA)₄ проявляют высокую молярную эллиптичность при pH 2. С другой стороны, C(diGlcNAc)-(RADA)₄ проявляет высокую молярную эллиптичность при pH 7, однако у (RADA)₄ молярная эллиптичность значительно снижается. Таким образом, ясно, что (RADA)₄ почти не образует структуры β-листа при нейтральном pH, тогда как C(diGlcNAc)-(RADA)₄ образует структуру β-листа даже при нейтральном pH.

Полагаем, что такой результат обусловлен подавлением излишних связей между

полипептидами под действием сахаридных цепочек у C(diGlcNAc)-(RADA)₄ с сохранением структуры β-листа, тогда как у (RADA)₄ β-структура сокращается, поскольку при нейтральном pH чрезмерно усиливается ассоциация. Это согласуется с тем, что у (RADA)₄ при нейтральном pH наблюдается мутность/выпадение осадка при испытании на нагрузку стальным шариком и не образуется однородный и жесткий гидрогель (например, фиг. 1).

Вышеприведенные результаты подтверждают, что комплекс сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образует структуру β-листа при нейтральном pH.

Пример 10. Измерение и анализ кинетической вязкости

Наряду с проверкой прочности гидрогеля при испытании на нагрузку стальным шариком, проводили измерения кинетической вязкости с тем, чтобы проследить изменения прочности гидрогеля или стабильности гидрогеля по времени.

Для измерения кинетической вязкости использовали реометр (MCR302, Anton Paar GmbH), снабженный параллельными пластинами из нержавеющей стали диаметром 25 мм с зазором в 0,3 мм. В сверхчистой воде растворяли C(diGlcNAc)-(RADA)₄, представляющий одно из воплощений настоящего изобретения, или (RADA)₄ в качестве контроля. Для доведения pH в эти водные растворы полипептидов добавляли водный раствор гидроксида натрия до 5 мМ, получая 0,5% масс. гидрогели при pH 7. Затем эти гидрогели быстро переносили в реометр, установленный на 25°, и отслеживали угол сдвига фаз (tanδ) по времени (частота = 1 Гц, искажение = 10%).

Результаты этих измерений представлены на фиг. 7.

Как видно из фиг. 7, оказалось, что жесткий гидрогель образуется у гидрогеля, содержащего C(diGlcNAc)-(RADA)₄, поскольку фазовый угол быстро снижался с начала измерения. С другой стороны, гидрогель, содержащий (RADA)₄, имеет большой фазовый угол, свидетельствующий, что образуется хрупкий гидрогель или же образуется неоднородный гидрогель, лишь частично жесткий.

Это согласуется с тем, что у (RADA)₄ при нейтральном pH отмечается мутность/выпадение осадка при испытании на нагрузку стальным шариком и не образуется однородный и жесткий гидрогель (например, фиг. 1).

Вышеприведенные результаты подтверждают, что комплекс сахаридная цепочка-полипептид по настоящему изобретению образует жесткий гидрогель при нейтральном pH.

(57) Формула изобретения

1. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид, характеризующийся тем, что указанный полипептид представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из 8-34 аминокислотных остатков, в которой чередуются полярные и неполярные аминокислотные остатки,

с указанным полипептидом связана одна или несколько сахаридных цепочек,

где каждый из указанных полярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аспартата, остатка глутамата, остатка аргинина, остатка лизина, остатка гистидина, остатка тирозина, остатка серина, остатка треонина, остатка аспарагина, остатка глутамина и остатка цистеина,

где каждый из указанных неполярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аланина, остатка

валина, остатка лейцина, остатка изолейцина, остатка метионина, остатка фенилаланина, остатка триптофана, остатка пролина и остатка глицина, и

общее число сахаридных остатков, присутствующих в одной или нескольких сахаридных цепочках, связанных с указанным полипептидом, составляет 5 или больше.

2. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что указанный комплекс может образовывать гидрогель, включающий структуру β -листа, при самосборке в водном растворе при близких к нейтральным значениях pH.

3. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что каждый из указанных полярных аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из остатка аспартата, остатка глутамата, остатка аргинина и остатка треонина, а

каждый из указанных неполярных аминокислотных остатков представляет собой остаток аланина.

4. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что указанная аминокислотная последовательность представляет собой повторяющуюся последовательность "RADA" или повторяющуюся последовательность "RATARA EA".

5. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 4, характеризующийся тем, что указанная аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из RADARADARADARADA (SEQ ID NO. 1), RADARADARADARADARADA (SEQ ID NO. 2) и RATARA E ARATARA EA (SEQ ID NO. 3).

6. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что количество сахаридных цепочек, связанных с указанным полипептидом, составляет 1, 2 или 3.

7. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что сахаридные цепочки связаны с каждой аминокислотой вплоть до положения x, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, и каждой аминокислотой вплоть до положения y, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце (где x и y – целые числа, $x \geq 0$, $y \geq 0$, а $x + y$ есть общее количество сахаридных цепочек, связанных с полипептидом).

8. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 7, характеризующийся тем, что количество сахаридных цепочек, связанных с указанным полипептидом, составляет 1, 2 или 3, причем,

если количество сахаридных цепочек, связанных с указанным полипептидом, составляет 1, то указанная одна сахаридная цепочка связана с аминокислотным остатком, расположенным на N-конце данного полипептида, или с аминокислотным остатком, расположенным на C-конце,

если количество сахаридных цепочек, связанных с указанным полипептидом, составляет 2, то указанные две сахаридные цепочки связаны с аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-3 ниже:

(1) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида,

(2) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, и

(3) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, и аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, а

если количество сахаридных цепочек, связанных с указанным полипептидом, составляет 3, то указанные три сахаридные цепочки связаны с любыми

аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из пунктов 1-4 ниже:

(1) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида,

5 (2) первого, второго и третьего аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида,

(3) первого и второго аминокислотных остатков, считая от аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, а также от аминокислотного остатка, расположенного на C-конце данного полипептида, и

10 (4) аминокислотного остатка, расположенного на N-конце данного полипептида, а также аминокислотных остатков, расположенных в положениях 1 и 2, считая от C-конца данного полипептида.

9. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что указанная сахаридная цепочка представляет собой сахаридную цепочку с разветвлением.

15 10. Комплекс сахаридная цепочка-полипептид по п. 1, характеризующийся тем, что указанная сахаридная цепочка представляет собой сахаридную цепочку, выбранную из группы, состоящей из дисиалосахаридной цепочки, асиалосахаридной цепочки, diGlcNAc-сахаридной цепочки, диманнозосахаридной цепочки, GlcNAc-сахаридной цепочки, мальтотриозной сахаридной цепочки, мальтозной сахаридной цепочки, мальтотетраозной сахаридной цепочки, мальтогептаозной сахаридной цепочки, β -циклодекстрина и γ -циклодекстрина.

11. Композиция для применения в получении гидрогеля, содержащая комплекс сахаридная цепочка-полипептид по любому из пп. 1-10.

12. Гидрогель, полученный из композиции по п. 11.

13. Фармацевтическая композиция для применения в гемостазе, содержащая 25 композицию по п. 11 или гидрогель по п. 12.

14. Композиция носителя для контролируемого высвобождения, содержащая композицию по п. 11 или гидрогель по п. 12.

15. Композиция матрикса для культивирования, содержащая композицию по п. 11 или гидрогель по п. 12.

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GLYTECH, INC.

<120> SUGAR CHAIN - POLYPEPTIDE COMPLEX

<130> ОСКР1302F

<150> JP2013-075493

<151> 2013.03.30

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<400> 1

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<400> 2

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

Arg Ala Asp Ala
 20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<400> 3

Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

Страница 1

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Fmoc

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (2)..(2)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (4)..(4)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (6)..(6)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (8)..(8)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (10)..(10)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (12)..(12)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (14)..(14)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (16)..(16)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (17)..(17)
<223> Resin

<400> 4

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 5
<211> 17

Страница 2

<212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 5

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Disialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 6

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION

Страница 3

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> Asialo sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (17)..(17)

<400> 7

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (17)..(17)

<400> 8

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

Страница 4

<222> (1)..(1)
<223> DiMan sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 9

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> GlcNAC sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 10

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> Maltoheptaose sugar chain added

<220>

Страница 5

<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 11

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> beta-cyclodextrin sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 12

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> gamma-cyclodextrin sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 13

Страница 6

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala

<210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (2)..(2)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (6)..(6)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (8)..(8)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (10)..(10)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (12)..(12)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (14)..(14)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> OtBu

Страница 7

<220>
 <221> BINDING
 <222> (18)..(18)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (20)..(20)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (21)..(21)
 <223> Resin

<400> 14

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
 20

<210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (21)..(21)

<400> 15

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
 20

<210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)

Страница 8

<223> Disialo sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION
<222> (21)..(21)

<400> 16

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)

<223> Asialo sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION
<222> (21)..(21)

<400> 17

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)

<223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

Страница 9

<222> (21)..(21)

<400> 18

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> GlcNAc sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (21)..(21)

<400> 19

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> DiBn-Disialo sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (21)..(21)

<400> 20

Страница 10

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> PEG2000 added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (21)..(21)

<400> 21

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala
20

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Fmoc

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (2)..(2)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (4)..(4)
<223> tBu

Страница 11

<220>
 <221> BINDING
 <222> (6)..(6)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (8)..(8)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (10)..(10)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (12)..(12)
 <223> tBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (14)..(14)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (17)..(17)
 <223> Resin

<400> 22

Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Ala

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 23

Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Страница 12

Ala

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Asialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 24

Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Ala

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 25

Cys Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu Ala Arg Ala Thr Ala Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Ala

Страница 13

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (9)..(9)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (11)..(11)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (13)..(13)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (15)..(15)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> Resin

<400> 26
 Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 16

Страница 14

<212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 27

Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (3)..(3)
 <223> Asialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 28

Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (3)..(3)
 <223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>

Страница 15

<221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 29

Arg Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (2)..(2)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (9)..(9)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (11)..(11)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (13)..(13)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (15)..(15)
 <223> OtBu

Страница 16

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> Resin

<400> 30

Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 31

Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (2)..(2)
 <223> Asialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 32

Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>

Страница 17

<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (2)..(2)
<223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (16)..(16)

<400> 33

Arg Cys Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Fmoc

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (3)..(3)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (5)..(5)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (7)..(7)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (9)..(9)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (11)..(11)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING

Страница 18

<222> (13)..(13)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (15)..(15)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> Resin

<400> 34

Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 35

Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Asialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 36

Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

Страница 19

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (16)..(16)

<400> 37

Cys Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (2)..(2)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (3)..(3)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (5)..(5)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (7)..(7)
 <223> Pbf

Страница 20

<220>
<221> BINDING
<222> (9)..(9)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (11)..(11)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (13)..(13)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (15)..(15)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (17)..(17)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (18)..(18)
<223> Resin

<400> 38

Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
1 5 10 15

Asp Ala

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> AMIDATION
<222> (18)..(18)

<400> 39

Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
1 5 10 15

Asp Ala

<210> 40
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (2)..(2)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (18)..(18)

<400> 40

Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Asp Ala

<210> 41
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Maltotriose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (2)..(2)
 <223> Maltotriose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (18)..(18)

<400> 41

Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Страница 22

Asp Ala

<210> 42
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Maltotetraose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (2)..(2)
 <223> Maltotetraose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (18)..(18)

<400> 42

Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Asp Ala

<210> 43
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (2)..(2)
 <223> Trt

<220>

Страница 23

<221> BINDING
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (4)..(4)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (6)..(6)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (8)..(8)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (10)..(10)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (12)..(12)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (14)..(14)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (18)..(18)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (19)..(19)
 <223> Resin

<400> 43

Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Asp Ala

<210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (19)..(19)

<400> 44

Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Asp Ala

<210> 45
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (2)..(2)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (3)..(3)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (19)..(19)

<400> 45

Cys Cys Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Asp Ala

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

Страница 25

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Fmoc

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (3)..(3)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (5)..(5)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (7)..(7)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (9)..(9)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (11)..(11)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (13)..(13)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (15)..(15)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (17)..(17)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (17)..(17)
<223> Resin

<400> 46
Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
1 5 10 15

Asp

<210> 47
<211> 17

<212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 47

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Asp

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (9)..(9)
 <223> Maltose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 48

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Asp

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION

Страница 27

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (9)..(9)

<223> Maltotriose sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (17)..(17)

<400> 49

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
1 5 10 15

Asp

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> ACETYLATION

<222> (1)..(1)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (9)..(9)

<223> Maltotetraose sugar chain added

<220>

<221> AMIDATION

<222> (17)..(17)

<400> 50

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Cys Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
1 5 10 15

Asp

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> chemically synthesized

<220>

<221> BINDING

<222> (1)..(1)

<223> Fmoc

<220>

Страница 28

<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (2)..(2)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (4)..(4)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (6)..(6)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (8)..(8)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (10)..(10)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (12)..(12)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (14)..(14)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (16)..(16)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (18)..(18)
<223> Trt

<220>
<221> BINDING
<222> (18)..(18)
<223> Resin

<400> 51

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Cys

<210> 52
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial sequence

Страница 29

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> AMIDATION
<222> (18)..(18)

<400> 52

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Cys

<210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> Maltose sugar chain added

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (18)..(18)
<223> Maltose sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (18)..(18)

<400> 53

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
1 5 10 15

Ala Cys

<210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

Страница 30

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Maltotriose sugar chain added

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (18)..(18)
 <223> Maltotriose sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (18)..(18)

<400> 54

Cys Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala Cys

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Fmoc

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(1)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (9)..(9)
 <223> Pbf

Страница 31

<220>
 <221> BINDING
 <222> (11)..(11)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (13)..(13)
 <223> Pbf

<220>
 <221> BINDING
 <222> (15)..(15)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (17)..(17)
 <223> Trt

<220>
 <221> BINDING
 <222> (17)..(17)
 <223> Resin

<400> 55

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

Cys

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 56

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

Cys

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>

Страница 32

<223> chemically synthesized

<220>
<221> ACETYLATION
<222> (1)..(1)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (17)..(17)
<223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>
<221> AMIDATION
<222> (17)..(17)

<400> 57

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

Cys

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Fmoc

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (3)..(3)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (5)..(5)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (7)..(7)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (9)..(9)
<223> Pbf

<220>
<221> BINDING
<222> (11)..(11)
<223> OtBu

Страница 33

<220>
 <221> BINDING
 <222> (13)..(13)
 <223> PbF

<220>
 <221> BINDING
 <222> (15)..(15)
 <223> OtBu

<220>
 <221> BINDING
 <222> (16)..(16)
 <223> Resin

<400> 58

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> Asialo sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

<400> 59

Asn Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

Ala

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> chemically synthesized

<220>
 <221> ACETYLATION
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> CARBOHYD

Страница 34

<222> (1)..(1)
 <223> DiGlcNAc sugar chain added

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> (17)..(17)

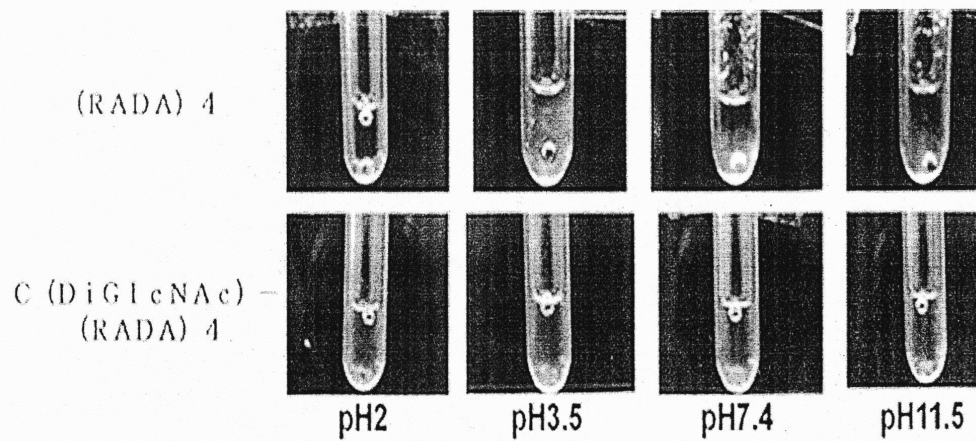
<400> 60

Asn Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala⁻ Asp Ala Arg Ala Asp
 1 5 10 15

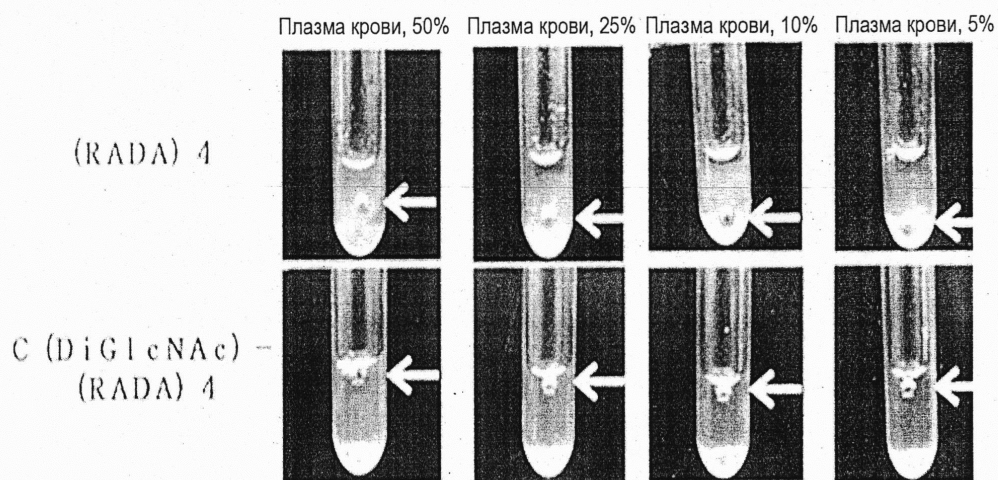
Ala

1/4

Фиг. 1

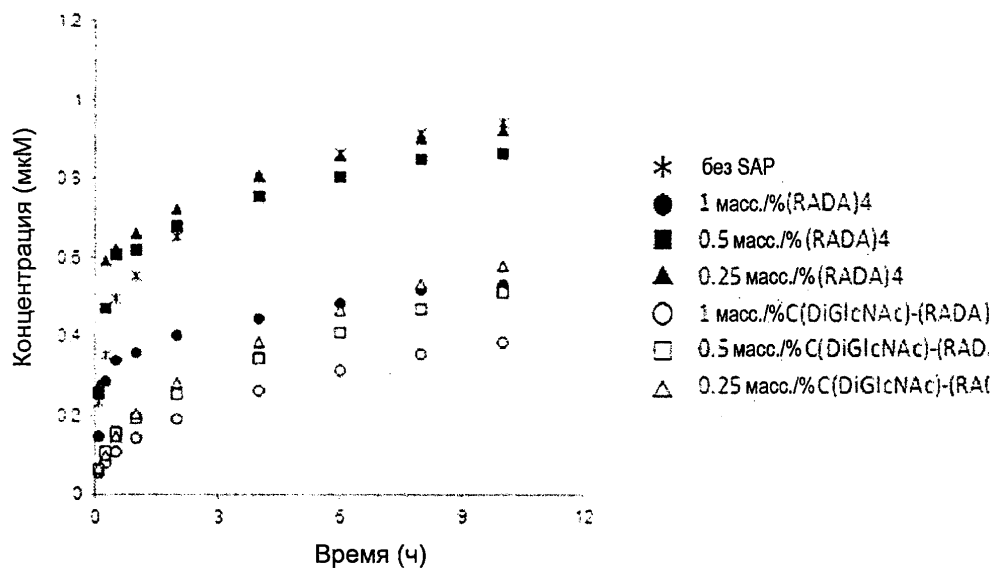


Фиг. 2

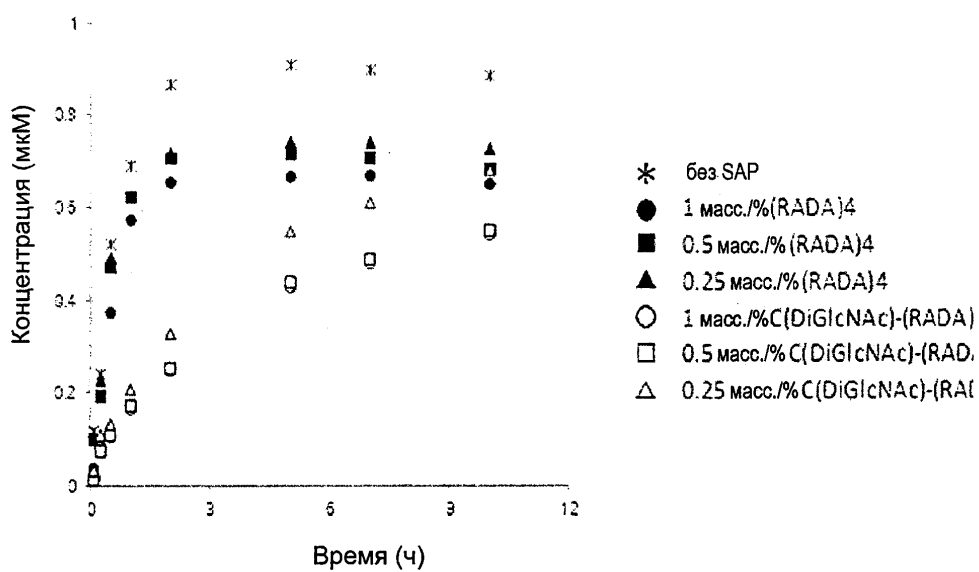


2/4

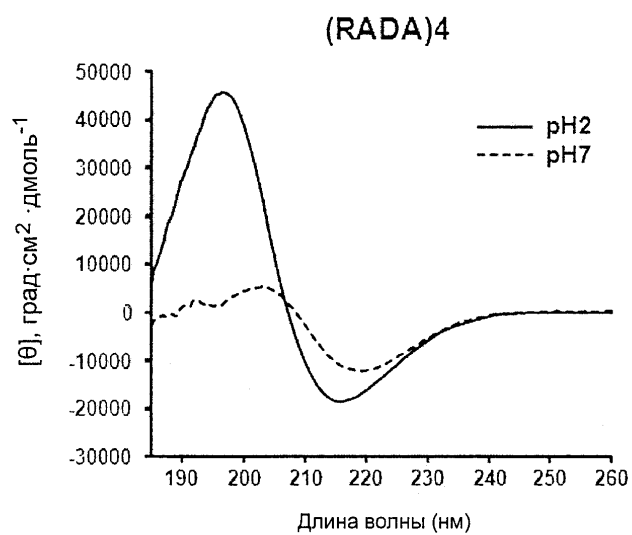
Фиг. 3



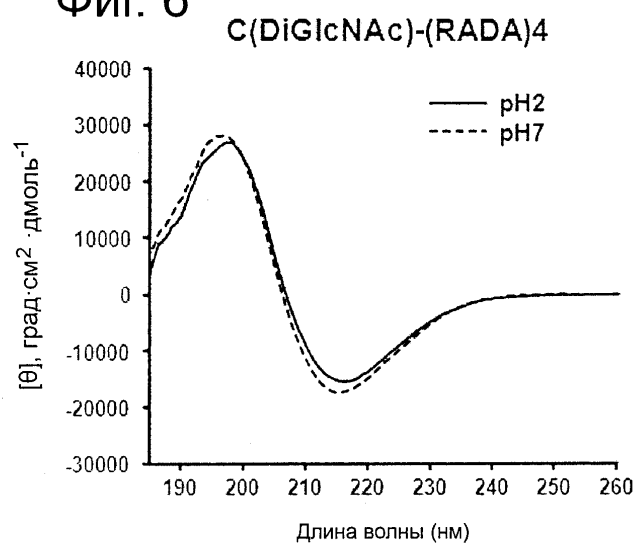
Фиг. 4



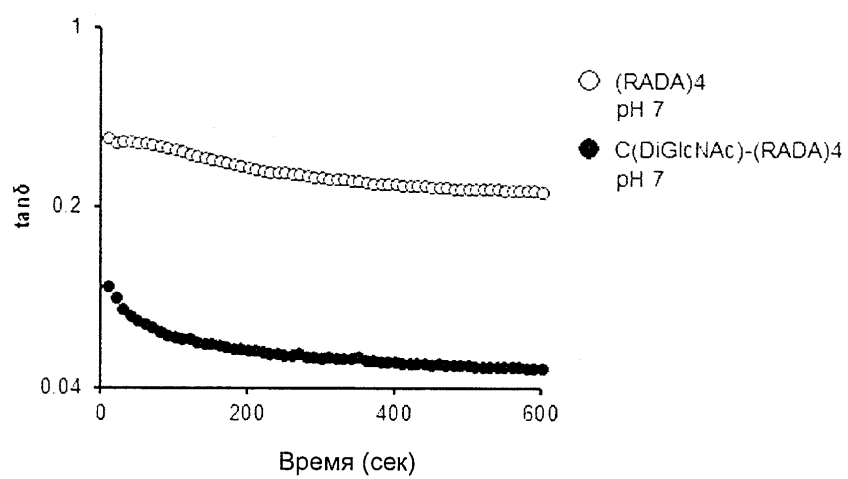
Фиг. 5



Фиг. 6



4/4



Фиг. 7