

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **032056**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.04.30**

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201390940**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.12.16**

---

### (54) КОНЬЮГАТ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА И ПРОИЗВОДНОГО ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА И ПРОИЗВОДНОГО ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ (ВАРИАНТЫ)

---

(31) **61/426,356**

(32) **2010.12.22**

(33) **US**

(43) **2014.04.30**

(86) **PCT/US2011/065591**

(87) **WO 2012/087838 2012.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД  
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (СН)**

(72) Изобретатель:  
**Зикманн Юрген, Шайнекер Рихард,  
Роттенштайнер Ханспетер, Турецек  
Петер (АТ)**

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

(56) **US-A1-2003069170**

**WO-A2-2005117984**

**EKRAMI H.M. ET AL.:** "Water-soluble fatty acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 371, 11 September 1995 (1995-09-11), pages 283-286, XP002244694, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/0014-5793(95)00910-2 abstract figure 1

**WO-A1-2011101277**

**WO-A2-2008025856**

(57) Изобретение относится к конъюгату терапевтического белка и производного жирной кислоты и способам получения такого конъюгата. Настоящее изобретение улучшает фармакодинамические и/или фармакокинетические свойства белка при сведении к минимуму затрат, связанных с различными реагентами, и рисков для здоровья пациентов-реципиентов.

**B1**

**032056**

**032056**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к материалам и способам конъюгирования водорастворимого производного жирной кислоты с белком.

### Уровень техники

Описаны различные молекулы и/или соединения для конъюгирования с терапевтическими белками с целью увеличения времени полужизни конъюгированных терапевтических белков после введения пациенту (Veronese F.M. and Mero A., *BioDrugs* 2008; 22:315-29; Gregoriadis G. et al., *Int J Pharm* 2005; 300:125-30 и Shechter Y. et al.; *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2007; vol 13:105-17).

Жирные кислоты (ЖК) можно конъюгировать с терапевтическими белками с целью образования производных с увеличенным временем действия. Указанный принцип увеличения времени полужизни белка или пептида основан на том, что ЖК могут связываться с сывороточным альбумином человека (HSA; ЖК также называют альбуминсвязывающими зондами). Связывание ЖК с сывороточным альбумином человека в крови может привести к существенному увеличению времени полужизни терапевтического белка, поскольку он будет перерабатываться совместно с альбумином посредством неонатального Fc-рецептора. ЖК и их производные (например, соответствующие метиловые эфиры) демонстрируют аналогичные альбуминсвязывающие свойства (Spector A.A., *J Lipid Res* 1975; 16:165-79).

Одним из ярких примеров указанного принципа увеличенного времени действия является инсулин детемир (левемир, Levemir®) от Novo Nordisk. В инсулине детемире карбоксильная группа ЖК ковалентно связана с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка лизина в составе белка инсулина (см., например, США №№ 5866538, 6011007 и 6869930). Аналогичные подходы описаны другими исследовательскими группами (Shechter Y. et al., *Bioconj Chem* 2005; 16:913-20 и Sasson K. et al., *J Control Release* 2010; 142:214-20). Например, указанными группами описана высвобождаемая FMOC-система, содержащая активный сложный эфир NHS для соединения с аминогруппами белков. Однако отличие заключается в том, что в указанной концепции ЖК связана с белком через функциональную группу в  $\omega$ -положении, что сохраняет карбоксильную группу в интактном состоянии. Таким образом, можно получить пролекарства с пролонгированным действием, связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, но диссоциирующие со временем по мере медленного гидролиза FMOC-системы в физиологических условиях (Sasson K. et al., *J Control Release* 2010; 142:214-20).

В дополнение к использованию жирных кислот можно получить конъюгаты путем образования ковалентной связи между водорастворимым полимером и терапевтическим белком с помощью различных химических способов. ПЭГилирование полипептидных лекарственных средств защищает их в кровотоке и улучшает их фармакодинамические и фармакокинетические профили (Harris and Chess, *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:214-21). В ходе ПЭГилирования к полипептидному лекарственному средству присоединяются повторяющиеся этиленгликолевые единицы (полиэтиленгликоль (ПЭГ)). Молекулы ПЭГ обладают большим гидродинамическим объемом (в 5-10 раз превышающим размер глобулярных белков), хорошо растворимы в воде, гидратированы, нетоксичны, неиммуногенны и быстро выводятся из организма. ПЭГилирование молекул может приводить к повышенной устойчивости препаратов к ферментативному разложению, повышенному времени полужизни *in vivo*, пониженной частоте приема, пониженной иммуногенности, повышенной физической и термической стабильности, повышенной растворимости, повышенной стабильности в жидкостях и пониженной агрегации. Первые ПЭГилированные лекарственные средства были одобрены FDA в начале 1990-х годов. С тех пор FDA одобрило несколько ПЭГилированных лекарственных средств для перорального введения, инъекций и местного применения.

Полисиаловая кислота (PSA), также известная как коломиновая кислота (CA), является природным полисахаридом. Она является гомополимером N-ацетилнейраминовой кислоты с  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 8)-кетозидными связями и содержит на невосстанавливаемом конце вицинальные диольные группы. Она отрицательно заряжена и является естественным компонентом организма человека. Ее легко получить из бактерий в больших количествах и с заранее заданными физическими характеристиками (патент США № 5846951). Поскольку PSA, продуцируемая бактериями, является химически и иммунологически идентичной PSA, продуцируемой в организме человека, бактериальная PSA не является иммуногенной, даже при соединении с белками. В отличие от некоторых полимеров PSA является биоразлагаемой. Показано, что ковалентное связывание коломиновой кислоты с каталазой и аспарагиназой повышало стабильность ферментов в присутствии протеолитических ферментов или плазмы крови. Сравнительные исследования полисиалилированной и немодифицированной аспарагиназы *in vivo* показали, что полисиалилирование увеличивало время полужизни фермента (Fernandes and Gregoriadis, *Int J Pharm.* 2001; 217:215-24).

Присоединение производных ПЭГ к пептидам или белкам рассмотрено в работе Roberts et al. (*Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:459-76). Одним подходом для сочетания водорастворимых полимеров с терапевтическими белками является конъюгирование полимеров через углеводные остатки белка. Вицинальные гидроксильные (OH) группы углеводов в составе белков можно легко окислить периодатом натрия (NaIO<sub>4</sub>) с образованием активных альдегидных групп (Rothfus and Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten and Ashwell, *J Biol Chem* 1971; 246:1889-94). Впоследствии к альдегидным группам углевода

можно присоединить полимер с использованием реагентов, содержащих, например, активную гидразидную группу (Wilchek M. and Bayer E.A., Methods Enzymol 1987; 138:429-42). Более поздней технологией является использование реагентов, содержащих аминоксигруппы, реагирующие с альдегидами с образованием оксимных связей (WO 96/40662, WO 2008/025856).

Дополнительные примеры, описывающие присоединение водорастворимого полимера к терапевтическому белку, описаны в WO 06/071801, в котором сообщается об окислении углеводных остатков в составе фактора Виллебранда и последующем присоединении к ПЭГ с использованием гидразидных реакций; патентной публикации США 2009/0076237, в которой сообщается об окислении rFVIII и последующем присоединении к ПЭГ и другим водорастворимым полимерам (например, PSA, гидроксиптикрахмалу, декстрану) с использованием гидразидных реакций; WO 2008/025856, в котором сообщается об окислении различных факторов свертывания, например rFIX, FVIII и FVIIa, и последующем присоединении, например, к ПЭГ с использованием аминоксигрупп путем образования оксимной связи; и патенте США № 5621039, в котором сообщается об окислении FIX и последующем присоединении к ПЭГ с использованием гидразидных реакций.

Независимо от вышеуказанных материалов и способов конъюгирования белков желательна разработка новых материалов и способов, например, обеспечивающих манипуляции и получение стабильных белковых конъюгатов. Хотя жирные кислоты могут обеспечивать преимущество связывания HSA, с жирными кислотами часто трудно работать в водной среде, и они могут высвободиться или отделиться от белкового партнера по связыванию с течением времени.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает материалы и способы конъюгирования полимеров и водорастворимых производных жирных кислот с белками, улучшающие фармакодинамические и/или фармакокинетические свойства белка при сведении к минимуму затрат, связанных с различными реагентами, и риски для здоровья пациентов-реципиентов, если реакция конъюгирования катализируется нуклеофильным катализатором. Настоящее изобретение обеспечивает материалы и способы конъюгирования водорастворимых производных жирных кислот с белками в водном растворе и получения за счет этого стабильных белковых конъюгатов, из которых не происходит высвобождения жирных кислот с течением времени.

Под объем притязаний настоящей заявки подпадают следующие объекты:

1. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты, содержащий водорастворимое производное жирной кислоты, включающее жирную кислоту или эфир жирной кислоты, присоединенные к водорастворимому линкеру, причем указанное производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку, где водорастворимый линкер включает полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ, по меньшей мере одну аминоксигруппу, присоединенную к терапевтическому белку, и вторую аминоксигруппу, присоединенную к жирной кислоте или эфиру жирной кислоты, где жирная кислота включает цепь длиной C10-C24.

2. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, который связывает сывороточный альбумин человека (HSA) *in vitro* или *in vivo*, обладает повышенным временем полужизни по сравнению с нативным терапевтическим белком, и в котором жирная кислота является насыщенной жирной кислотой или ненасыщенной жирной кислотой.

3. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.2, где жирная кислота является жирной кислотой с разветвленной цепью.

4. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

5. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота присоединена к водорастворимому линкеру по группе жирной кислоты, выбранной из группы, состоящей из концевой карбоксильной группы и  $\omega$ -группы, в которой  $\omega$ -группа выбрана из группы, состоящей из гидроксила, amino-, тио- и карбоксила.

6. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

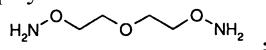
7. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где сложный эфир жирной кислоты выбран из группы, состоящей из метилового эфира и этилового эфира.

8. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.7, где сложный эфир жирной кислоты представляет собой метиловый эфир 16-гидроксигексадекановой кислоты.

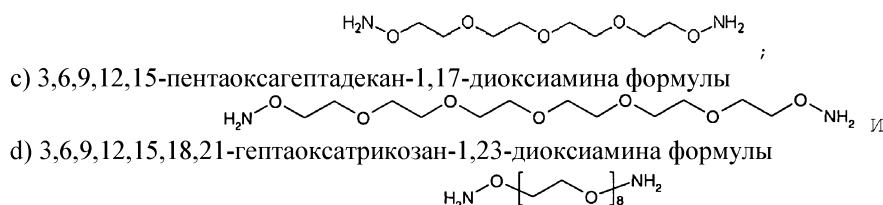
9. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

10. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.9, где водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

а) 3-оксапентан-1,5-диоксиамины формулы



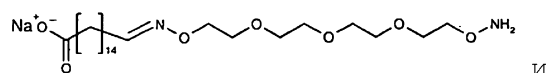
б) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



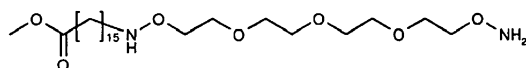
11. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку посредством оксимной связи, где оксимная связь образована между оксимной группой водорастворимого линкера и альдегидной группой окисленного углевода в составе терапевтического белка.

12. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где производное жирной кислоты выбрано из группы, состоящей из:

а) натриевой соли 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиимино)гексадекановой кислоты формулы



б) метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиимино)гексадекановой кислоты



13. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где терапевтический белок представляет собой гликопротеин или терапевтический белок, гликозилированный *in vitro*, и выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка С, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЕРО, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбопоэтина (ТРО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка 1A, рецептора костного морфогенетического белка 1B, рецептора костного морфогенетического белка 1I, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, cripto, cryptic, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2α, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2β, фактора роста эндотелиальных клеток β, эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8с, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора α1, рецептора глиального нейротрофического фактора α2, белка, связанного с ростом, белка α, связанного с ростом, белка β, связанного с ростом, белка γ, связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкозингибирующего фактора, рецептора α лейкозингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора

фактора роста нервов, нейропоэтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста АА, тромбоцитарного фактора роста АВ, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста ВВ, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1.2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 3, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 5, латентного трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопоэтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PUP), инсулина, лектина, рицина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбopoэтина, урокиназы, интегрин, тромбина, лептина, адалимумаба, деносумаба, этанерцепта, белка из таблицы.

14. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FVIIa.

15. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FVIII.

16. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FIX.

17. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий:

а) окисление  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты с получением альдегидной группы в составе жирной кислоты;

б) присоединение водорастворимого линкера, включающего (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминоксигруппу, к указанной альдегидной группе с образованием стабильной оксимной связи, таким образом получая производное жирной кислоты; и

с) конъюгирование производного жирной кислоты с окисленной углеводной группой терапевтического белка;

причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде; где  $\omega$ -гидроксигруппу окисляют окислителем, выбранным из группы, состоящей из периодинанового реагента Десса-Мартина, реагента Темпо, оксалилхлорида/ДМСО, тетрапропиламмонийперхлората (TPAP) и реагентов на основе хрома (VI) (реагента Коллинза, пиридинийхлорхромата (PCC) и бихромата пиридиния); где жирной кислотой является насыщенная жирная кислота или ненасыщенная жирная кислота.

18. Способ по п.17, в котором жирной кислотой является жирная кислота с разветвленной цепью.

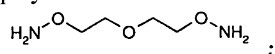
19. Способ по п.17, в котором жирная кислота включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

20. Способ по п.19, в котором жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

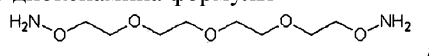
21. Способ по п.17, в котором ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

22. Способ по п.21, в котором водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

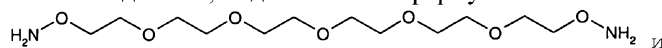
а) 3-оксапентан-1,5-диоксиамины формулы



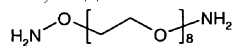
б) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



с) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



д) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



23. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий:

а) этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты с получением эфира жирной кислоты;

b) активацию  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты с получением мезильной группы в составе жирной кислоты со стадии а);

с) присоединение водорастворимого линкера, включающего (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминооксигруппу, путем замещения мезильной группы со стадии b) с образованием стабильной оксимиин-метиленовой связи, таким образом получая производное жирной кислоты; и

d) конъюгирование производного жирной кислоты с окисленной углеводной группой терапевтического белка;

причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде; где карбоксильную группу этерифицируют этерифицирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из ацетилхлорида, метанола в присутствии кислоты, этанола в присутствии кислоты, diazometана и метилиодида; где  $\omega$ -гидроксигруппу активируют активирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из мезилхлорида, тозилхлорида и нозилхлорида; и где жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту или ненасыщенную жирную кислоту.

24. Способ по п.23, в котором жирная кислота является жирной кислотой с разветвленной цепью.

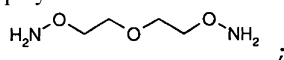
25. Способ по п.23, в котором жирная кислота включает цепь, выбранную из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

26. Способ по п.25, в котором жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

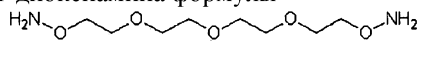
27. Способ по п.23, в котором ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

28. Способ по п.27, в котором водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

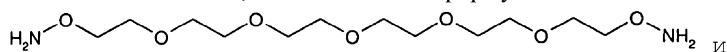
a) 3-оксапентан-1,5-диоксиамины формулы



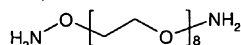
b) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



c) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



d) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



29. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий контакт окисленной углеводной группы терапевтического белка с производным жирной кислоты в условиях, обеспечивающих конъюгирование;

причем указанную углеводную группу окисляют путем инкубирования с буфером, включающим окислитель, выбранный из группы, состоящей из периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ), тетраацетата свинца ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ) и перрутеноата калия ( $\text{KRuO}_4$ );

где производное жирной кислоты включает жирную кислоту или эфир жирной кислоты, присоединенные к водорастворимому линкеру, включающему (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминооксигруппу;

где между окисленной углеводной группой и активной аминооксигруппой производного жирной кислоты образуется оксимная связь;

и где образование указанной оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, включающей анилин, о-аминобензойную кислоту, м-аминобензойную кислоту, п-аминобензойную кислоту, сульфаниловую кислоту, о-аминобензамид, о-толуидин, м-толуидин, п-толуидин, о-анизидин, м-анизидин и п-анизидин.

30. Способ по п.29, в котором терапевтический белок представляет собой гликопротеин или терапевтический белок, гликозилированный *in vitro*, и выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), EPO, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбопоэтина (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтин-подобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтин-подобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтин-подобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтин-подобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтин-подобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтин-подобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтин-подобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогене-

нина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка IА, рецептора костного морфогенетического белка IВ, рецептора костного морфогенетического белка II, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, *cirto*, *сиртис*, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\beta$ , фактора роста эндотелиальных клеток  $\beta$ , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 1, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 2, белка, связанного с ростом, белка  $\alpha$ , связанного с ростом, белка  $\beta$ , связанного с ростом, белка  $\gamma$ , связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкоз-ингибирующего фактора, рецептора  $\alpha$  лейкоз-ингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропозтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1.2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 3, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 5, латентного трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопозтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PUP), инсулина, лектина, рицина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, адалимумаба, деносуаба, энбрела этанерцепта, белка из таблицы.

31. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FVIIa.

32. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FVIII.

33. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FIX.

34. Способ по п.17, в котором окислителем является периодинан Десса-Мартина. Перечисленные выше объекты на практике могут иметь различные варианты осуществления, которые продемонстрированы ниже в рамках материалов настоящей заявки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено водорастворимое производное жирной кислоты, включающее жирную кислоту или эфир жирной кислоты, присоединенные к водорастворимому линкеру, причем указанное производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку. В еще одном варианте осуществления производное жирной кислоты связывает человеческий сывороточный альбумин (HSA) *in vitro* или *in vivo*. В еще одном варианте осуществления конъюгат "производное жирной кислоты терапевтический белок" обладает повышенным временем полужизни по сравнению с нативным терапевтическим белком. В еще одном варианте осуществления указанное выше производное жирной кислоты включает насыщенную жирную кислоту или ненасыщенную жирную кислоту. В родственном варианте осуществления жирной кислотой является насыщенная жирная кислота. В еще одном варианте осуществления жирной кислотой является жирная кислота с разветв-

ленной цепью.

Рассматриваются производные жирных кислот, содержащие жирные кислоты различной длины. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота включает цепь длиной от C10 до C24, включая синтетические жирные кислоты с нечетным количеством атомов углерода. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота включает цепь, выбранную из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C14, C16 и C18. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C13, C15 и C17.

В еще одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота присоединена к водорастворимому линкеру по группе в составе жирной кислоты, выбранной из группы, состоящей из концевой карбоксильной группы и  $\omega$ -группы. В еще одном варианте осуществления жирная кислота присоединена к водорастворимому линкеру по  $\omega$ -группе. В еще одном варианте осуществления  $\omega$ -группа выбрана из группы, состоящей из гидроксильной, amino-, тио- и карбоксильной групп.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

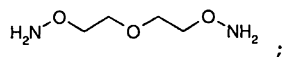
В еще одном варианте осуществления представлено производное жирной кислоты, в котором сложный эфир жирной кислоты выбран из группы, состоящей из метилового эфира и этилового эфира. В одном варианте осуществления сложный эфир жирной кислоты представляет собой метиловый эфир 16-гидроксигексадекановой кислоты.

В настоящем изобретении рассматриваются различные водорастворимые линкеры. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором водорастворимый линкер включает водорастворимый полимер и по меньшей мере одну функциональную группу, присоединенную к терапевтическому белку. В одном варианте осуществления функциональная группа, присоединенная к терапевтическому белку, обладает способностью придавать отрицательный или положительный заряд, тем самым обуславливая растворимость линкера в воде. В еще одном варианте осуществления функциональную группу выбирают из группы, состоящей из сульфогруппы, карбоксильной группы, гидроксильной группы, аминогруппы, амидогруппы, малеимидогруппы, аминоксигруппы и гидразидной группы. В одном варианте осуществления функциональная группа представляет собой аминоксигруппу.

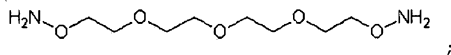
В настоящем изобретении рассматриваются различные водорастворимые полимеры. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором водорастворимый полимер, являющийся неотъемлемой частью линкера, выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветвленного ПЭГ, полисиаловой кислоты (PSA), гидроксиполисахарида (HAS), гидроксиполисахарида (HES), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена и ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола и ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформальдегида) (PHF) и 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфата (MPC). В еще одном варианте осуществления водорастворимый полимер является ПЭГ. В данном описании также рассматриваются водорастворимые полимеры различной длины. В одном варианте осуществления представлено производное жирной кислоты, в котором длина цепи водорастворимого полимера выбрана из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

В одном варианте осуществления представлено производное жирной кислоты, в котором водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из

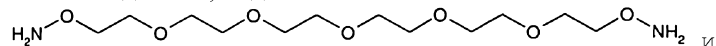
3-оксапентан-1,5-диоксиамина



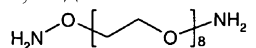
3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамина



3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамина



3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамина



В еще одном варианте осуществления изобретения представлено производное жирной кислоты, в котором производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку посредством

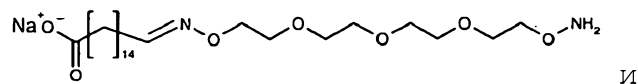


оксимной связи. В еще одном варианте осуществления оксимная связь образована между оксимной группой водорастворимого линкера и альдегидной группой окисленного углевода в составе терапевтического белка.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено производное жирной кислоты, в котором производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку посредством малеимидогруппы водорастворимого линкера и свободной сульфгидрильной группы в составе терапевтического белка. В еще одном варианте осуществления производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку посредством N-гидроксисукцинимидного эфира водорастворимого линкера и свободной аминогруппы терапевтического белка.

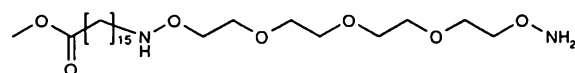
В одном варианте осуществления изобретения представлено производное жирной кислоты, в котором производное жирной кислоты выбрано из группы, состоящей из:

а) натриевой соли 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиимино)гексадекановой кислоты формулы



И

б) метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты



В настоящем изобретении рассматриваются различные терапевтические белки. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором терапевтический белок выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка С, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), EPO, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбopoэтина (TPO), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка 1A, рецептора костного морфогенетического белка 1B, рецептора костного морфогенетического белка 1I, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, crip1, crip2, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2α, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2β, фактора роста эндотелиальных клеток β, эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора α1, рецептора глиального нейротрофического фактора α2, белка, связанного с ростом, белка α, связанного с ростом, белка β, связанного с ростом, белка γ, связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкозингибирующего фактора, рецептора α лейкозингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейротрофина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных

клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста АА, тромбоцитарного фактора роста АВ, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста ВВ, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО $\alpha$ , ФНО $\beta$ , ФНО $\gamma$ , ФНО $\delta$ , трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1.2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 3, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 5, латентного трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопоэтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PLA $\alpha$ ), инсулина, лектина, рибина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрин, тромбина, лептина, хумиры (адалимумаб), Prolia (деносумаб), энбрела (этанерцепт), белка из таблицы или их биологически активного фрагмента, производного или варианта. В еще одном варианте осуществления терапевтическим белком является FVIIa. В еще одном варианте осуществления терапевтическим белком является FVIII. В еще одном варианте осуществления терапевтическим белком является FIX.

В данном описании также рассматриваются способы получения производных жирных кислот. В одном варианте осуществления представлен способ получения производного жирной кислоты, описанного в данном описании, включающий а) окисление  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты с целью получения альдегидной группы в составе жирной кислоты, и б) присоединение водорастворимого линкера, включающего активную аминооксигруппу, к альдегидной группе с образованием стабильной оксимной связи, причем производное жирной кислоты растворимо в воде. В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором  $\omega$ -гидроксигруппу окисляют окислителем, выбранным из группы, состоящей из периодина Десса-Мартина, реагента Темпо, окисления по Сверну оксалилхлоридом/ДМСО, тетрапропиламмонийперрутената (TPAP), реагентов на основе хрома (VI), например реагента Коллинза, пиридинийхлорхромата (PCC) и дихромата пиридиния. В еще одном варианте осуществления окислитель представляет собой периодинан Десса-Мартина.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту или ненасыщенную жирную кислоту. В еще одном варианте осуществления жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту.

В еще одном варианте осуществления изобретения представлен указанный выше способ, в котором жирная кислота представляет собой жирную кислоту с разветвленной цепью.

Согласно еще одному варианту осуществления также представлен указанный выше способ, в котором жирная кислота включает цепь длиной от C10 до C24, включая синтетические жирные кислоты с нечетным количеством атомов углерода. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота включает цепь, выбранную из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C14, C16 и C18. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C13, C15 и C17.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водорастворимый линкер включает водорастворимый полимер и по меньшей мере одну аминооксигруппу.

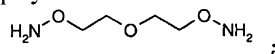
В настоящем изобретении для использования в указанном выше способе рассматриваются различные водорастворимые полимеры. В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водорастворимый полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветвленного ПЭГ, полисиаловой кислоты (PSA), гидроксиалкилкрахмала (HAS), гидроксиэтилкрахмала (HES), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена и ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола и ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформальдегида) (PHF) и 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфата (MPC). В одном варианте осуществления водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

Кроме того, рассматриваются водорастворимые полимеры различной длины. В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором длина цепи водорастворимого полимера выбрана из группы, состоящей из O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

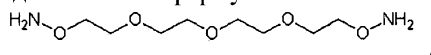
В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водораство-

римый линкер выбран из группы, состоящей из:

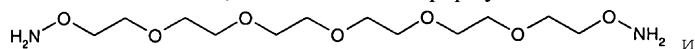
а) 3-оксапентан-1,5-диоксиамины формулы



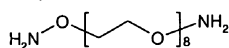
б) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



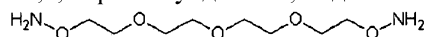
с) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



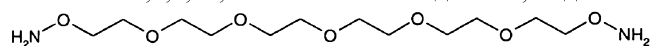
д) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водорастворимый линкер представляет собой 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамин формулы



В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водорастворимый линкер представляет собой 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамин формулы



В данном описании также рассматриваются другие способы получения производных жирных кислот. В одном варианте осуществления представлен способ получения указанного выше производного жирной кислоты, включающий а) этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты с целью получения сложного эфира жирной кислоты; б) активацию  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты путем внедрения мезильной группы в состав жирной кислоты на стадии а), и с) присоединение водорастворимого линкера, содержащего активную аминооксигруппу, путем замещения мезильной группы на стадии б), за счет чего образуется стабильная оксиамин-метиленовая связь; причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде.

В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором карбоксильную группу этерифицируют этерифицирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из ацетилхлорида, метанола в присутствии кислоты, этанола в присутствии кислоты, диазометана и метилиодида. В еще одном варианте осуществления этерифицирующий агент представляет собой ацетилхлорид.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором  $\omega$ -гидроксигруппу активируют активирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из мезилхлорида, тозилхлорида и нозилхлорида. В одном варианте осуществления активирующий агент представляет собой мезилхлорид.

Для использования в указанном выше способе рассматриваются различные жирные кислоты. В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором жирная кислота является насыщенной жирной кислотой или ненасыщенной жирной кислотой. В еще одном варианте осуществления жирная кислота является насыщенной жирной кислотой. В еще одном варианте осуществления жирная кислота представляет собой жирную кислоту с разветвленной цепью.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором жирная кислота включает цепь длиной от C10 до C24, включая синтетические жирные кислоты с нечетным количеством атомов углерода. В одном варианте осуществления представлено указанное выше производное жирной кислоты, в котором жирная кислота включает цепь, выбранную из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C20, C22 и C24. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C14, C16 и C18. В еще одном варианте осуществления длина цепи жирной кислоты выбрана из группы, состоящей из C13, C15 и C17.

Для использования в указанном выше способе также рассматриваются различные водорастворимые полимеры. В одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором водорастворимый линкер включает водорастворимый полимер и по меньшей мере одну аминооксигруппу. В еще одном варианте осуществления водорастворимый полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), разветвленного ПЭГ, полисиаловой кислоты (PSA), гидроксилалкилкрахмала (HAS), гидроксипропилкрахмала (HES), углевода, полисахаридов, пуллулана, хитозана, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, дерматансульфата, крахмала, декстрана, карбоксиметилдекстрана, полиалкиленоксида (ПАО), полиалкиленгликоля (ПАГ), полипропиленгликоля (ППГ), полиоксазолина, полиакрилоилморфолина, поливинилового спирта (ПВС), поликарбоксилата, поливинилпирролидона, полифосфазена, полиоксазолина, сополимера полиэтилена и ангидрида малеиновой кислоты, сополимера полистирола и ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформальдегида) (PHF) и 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфата (MPC). В еще одном варианте осуществления водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В еще одном варианте осуществления изобретения представлен указанный выше способ, в котором

длина цепи водорастворимого полимера выбрана из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15. В еще одном варианте осуществления водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из [0050]

В настоящем изобретении также рассматриваются способы получения конъюгированных белков. В одном варианте осуществления представлен способ получения конъюгированного терапевтического белка, включающий контакт окисленной углеводной группы терапевтического белка с указанной выше жирной кислотой (или водорастворимым полимером, как описано в данном описании) в условиях, обеспечивающих конъюгирование; углеводную группу окисляют путем инкубирования с буфером, включающим окислитель, выбранный из группы, состоящей из периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ), тетраацетата свинца ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ) и перрутената калия ( $\text{KRuO}_4$ ), где между окисленной углеводной группой и активной аминокислотной группой жирной кислоты образуется оксимная связь, и где образование оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, состоящей из о-аминобензойной кислоты, м-аминобензойной кислоты, п-аминобензойной кислоты, сульфаниловой кислоты, о-аминобензамида, о-толуидина, м-толуидина, п-толуидина, о-анизида, м-анизида и п-анизида.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором терапевтический белок выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЕРО, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбопоэтина (ТРО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопоэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопоэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопоэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопоэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопоэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопоэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка 1A, рецептора костного морфогенетического белка 1B, рецептора костного морфогенетического белка 1I, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, crip1, crip2, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\beta$ , фактора роста эндотелиальных клеток  $\beta$ , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпигрегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 1, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 2, белка, связанного с ростом, белка  $\alpha$ , связанного с ростом, белка  $\beta$ , связанного с ростом, белка  $\gamma$ , связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкозингибирующего фактора, рецептора  $\alpha$  лейкозингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропоэтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1.2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 3,

трансформирующего фактора роста  $\beta 5$ , латентного трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопоэтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PUP), инсулина, лектина, рицина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбopoэтина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, хумиры (адалimumаба), Prolia (деносумаба), энбрела (этанерцепта), белка из таблицы или их биологически активного фрагмента, производного или варианта.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором терапевтическим белком является FVIIa. В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором терапевтическим белком является FVIII. В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором терапевтическим белком является FIX.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором окислителем является периодат натрия ( $\text{NaIO}_4$ ). В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором нуклеофильный катализатор представляет собой м-толуидин.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, дополнительно включающий очистку конъюгированного терапевтического белка.

В еще одном варианте осуществления представлен указанный выше способ, в котором производное жирной кислоты получают согласно способу, описанному в данном описании.

В настоящем изобретении рассматриваются другие способы получения производных жирных кислот. В одном варианте осуществления представлен способ получения указанного выше производного жирной кислоты, включающий а) этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты с целью получения сложного эфира жирной кислоты; и b) присоединение водорастворимого линкера, включающего активную малеимидную группу, к свободной сульфгидрильной (SH) группе с образованием устойчивой тиоэфирной связи; причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде.

В еще одном варианте осуществления представлен способ получения указанного выше производного жирной кислоты, включающий а) этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты с целью получения сложного эфира жирной кислоты; b) взаимодействие жирной кислоты, полученной на стадии а), с азидным реагентом, в результате чего получают соответствующий азид жирной кислоты; c) гидрирование азид жирной кислоты, полученного на стадии b), с целью получения соответствующего амина жирной кислоты; и d) присоединение водорастворимого линкера, включающего активную NHS-группу, к свободной аминной группе, за счет чего образуется стабильная связь; причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде.

### Описание чертежа

На чертеже показан синтез водорастворимого линкера 3-оксапентан-1,5-диоксиамина.

### Подробное описание изобретения

Фармакологические и иммунологические свойства терапевтических белков можно улучшить путем химической модификации и конъюгирования с полимерными соединениями, например жирными кислотами и производными жирных кислот, в соответствии с настоящим изобретением.

Добавление водорастворимого производного жирной кислоты, как описано в данном описании, является одним из подходов к улучшению свойств терапевтических белков, например белков свертывания крови - фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF) или протеазы ADAMTS 13, а также других известных белков или их биологически/терапевтически активных фрагментов.

Терапевтические белки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вышеуказанные полипептиды и полинуклеотиды представлены следующими терапевтическими белками: ферментами, антигенами, антителами, рецепторами, белками свертывания крови, факторами роста, гормонами и лигандами. В некоторых вариантах осуществления терапевтическим белком является белок свертывания крови, например фактор IX (FIX), фактор VIII (FVIII), фактор VIIa (FVIIa), фактор Виллебранда (ФВ), фактор FV (FV), фактор X (FX), фактор XI (FXI), фактор XII (FXII), тромбин (FII), белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевый фактор (TF) или протеаза ADAMTS 13.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическим белком являются иммуноглобулины, цитокины, например IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующий фактор-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), EPO, интерферон-альфа (IFN-альфа), консенсусный интерферон, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-

31, IL-32-альфа, IL-33, тромбopoэтин (TPO), ангиопоэтины, например Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопоэтин-подобные полипептиды человека ANGPTL1-7, витронектин, фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенин, активин А, активин В, активин С, костный морфогенетический белок-1, костный морфогенетический белок-2, костный морфогенетический белок-3, костный морфогенетический белок-4, костный морфогенетический белок-5, костный морфогенетический белок-6, костный морфогенетический белок-7, костный морфогенетический белок-8, костный морфогенетический белок-9, костный морфогенетический белок-10, костный морфогенетический белок-11, костный морфогенетический белок-12, костный морфогенетический белок-13, костный морфогенетический белок-14, костный морфогенетический белок-15, рецептор костного морфогенетического белка IА, рецептор костного морфогенетического белка IВ, рецептор костного морфогенетического белка II, нейротрофический фактор головного мозга, кардиотрофин-1, цилиарный нейротрофический фактор, рецептор цилиарного нейротрофического фактора, *scirp*o, *scirp*is, цитокин-индуцируемый фактор хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемый фактор хемотаксиса нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемый фактор хемотаксиса нейтрофилов 2 $\beta$ , фактор роста эндотелиальных клеток  $\beta$ , эндотелин 1, эпидермальный фактор роста, эпиген, эпирегулин, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, фактор роста фибробластов 4, фактор роста фибробластов 5, фактор роста фибробластов 6, фактор роста фибробластов 7, фактор роста фибробластов 8, фактор роста фибробластов 8b, фактор роста фибробластов 8c, фактор роста фибробластов 9, фактор роста фибробластов 10, фактор роста фибробластов 11, фактор роста фибробластов 12, фактор роста фибробластов 13, фактор роста фибробластов 16, фактор роста фибробластов 17, фактор роста фибробластов 19, фактор роста фибробластов 20, фактор роста фибробластов 21, кислый фактор роста фибробластов, основной фактор роста фибробластов, рецептор глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 1, рецептор глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 2, белок, связанный с ростом, белок  $\alpha$ , связанный с ростом, белок  $\beta$ , связанный с ростом, белок  $\gamma$ , связанный с ростом, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, гепатомный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, лейкоз-ингибирующий фактор, рецептор  $\alpha$  лейкоз-ингибирующего фактора, фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейропозитин, нейротрофин-3, нейротрофин-4, онкостатин М (OSM), плацентарный фактор роста, плацентарный фактор роста 2, тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарный фактор роста, А-цепь тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарный фактор роста AA, тромбоцитарный фактор роста АВ, В-цепь тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарный фактор роста ВВ, рецептор  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептор  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактор, стимулирующий рост предшественников В-клеток, фактор стволовых клеток (SCF), рецептор фактора стволовых клеток, ФНО, включая ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующий фактор роста  $\alpha$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1.2, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 2, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 3, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 5, латентный трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1, белок I, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок II, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок III, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфopoэтин стромы тимуса (TSLP), рецептор I типа фактора некроза опухолей, рецептор II типа фактора некроза опухолей, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, фактор роста эндотелия сосудов и их химерные белки или биологически или иммунологически активные фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой альфа-, бета- и гамма-интерфероны, колониестимулирующие факторы, включая гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, факторы роста фибробластов, тромбоцитарные факторы роста, фосфолипаза-активирующий белок (PLA2), инсулин, растительные белки, например лектины и рицины, факторы некроза опухолей и родственные аллели, растворимые формы рецепторов факторов некроза опухолей, рецепторы интерлейкинов и растворимые формы рецепторов интерлейкинов, факторы роста, например тканевые факторы роста, например ТФР $\alpha$  или ТФР $\beta$ , и эпидермальные факторы роста, гормоны, соматомедины, пигментарные гормоны, рилизинг-факторы гипоталамуса, антидиуретические гормоны, пролактин, хориогонадотропин, фолликулостимулирующий гормон, тиреотропный гормон, тканевый активатор плазминогена и иммуноглобулины, например IgG, IgE, IgM, IgA и IgD, галактозидазу,  $\alpha$ -галактозидазу,  $\beta$ -галактозидазу, ДНКазу, фетuin, лютеинизирующий гормон, эстроген, кортикостероиды, инсулин, альбумин, липопротеины, фетопротеин, трансферрин, тромбopoэтин, урокиназу, ДНКазу, интегрин, тромбин, гемопоэтические факторы роста, лептин, гликозидазаит, химуру (адалимумаб), Prolia (деносумаб), энбрел (этанерцепт) и их фрагменты или любые гибридные белки, включающие любой из приведенных выше белков или из фрагментов. В дополнение к приведенным выше белкам в следующей таблице представлены терапевтические белки, рассматриваемые в настоящем изобретении.

Пептид, секретируемый фолликулярными дендритными клетками	Ангиотензин-превращающий фермент	Член 6 семейства интерлейкина-1	Херстатин
Дермокин	Антитромбин-III	Белок 2, экспрессируемый предстательной железой и яичками	Белок 28, содержащий повтор, богатый лейцином
Секретируемый белок 1, связанный с ожогами	Аполипопротеин В-100	Секреторная фосфолипаза А2 группы ХIIА	Белок с С-концевой последовательностью, подобной LRRN4
Эктодисплазин-А	Аполипопротеин D	Альфа-3 (V) цепь коллагена	Белок 2, содержащий Ly6/PLAUR-домен
Секретируемый белок 2, связанный с ожогами	Аполипопротеин E	Белок 1, подобный альфа-2-макроглобулину	Трансмембранный белок 81
Резистин	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 1	Дерматопонтин	Белок 3, подобный миелиновому белку zego
Остеопонтин	Костный морфогенетический белок 7	Белок, ассоциированный с хрящом	Гомолог белка нотума
Секретируемый белок 5, связанный с ожогами	Субъединица В компонента C1q	Белок - "эфиопский еж"	УДФ-глюкуронозилтрансфераза 3A2
Секретируемый белок 4, связанный с ожогами	Альфа-цепь C4b-связывающего белка	Белок 2 внеклеточного матрикса	Протокадгерин альфа-1
Секретируемый фосфопротеин 24	Кальретикулин	Внутренний фактор Касла	Фосфолипаза D4
Глипикан-6	Кортикостероид-связывающий глобулин	Интерлейкин-33	Ретинолдегидрогеназа 10
Секретируемый белок 3, связанный с ожогами	Карбоксипептидаза A1	Костный морфогенетический белок 2	Лектин 14, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту
Хемокин 4 с С-С-мотивом	Карбоксипептидаза A2	Костный морфогенетический белок 6	Трансмембранный белок 161A
Белок меланоцитов Pmel 17	Эотаксин	Неохарактеризованный белок KIAA0564	Трансмембранный белок 161B
Секретируемый Ly-6/uPAR-связанный белок 1	Хемокин 13 с С-С-мотивом	Cerberus	Трансмембранный белок 182
Бета-микросемипротеин	Хемокин 18 с С-С-мотивом	Карбогидратсульфотрансфераза 8	Белок FAM24B
Глипикан-4	Хемокин 20 с С-С-мотивом	Аналог 3 контактин-ассоциированного белка	Трансмембранный белок 52
Член 15 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Иницирующий рецептор 2, экспрессирующийся на миелоидных клетках	Белок, подобный секреторной фосфолипазе А2 группы ХIIВ	Белок 4, содержащий MFS-домен
Резистин-подобный белок бета	Хемокин 2 с С-С-мотивом	Кортиколиберин	УДФ-глюкуронозилтрансфераза 2A3
Член 12 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Белок ig-h3, индуцируемый трансформирующим фактором роста-бета	Белок 19, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок, ассоциированный с одонтогенными амелобластами
SPARC	Лиганд CD40	Белок UPF0556, C19orf10	Нейросекреторный белок VGF
Глипикан-5	Корнеодесмозин	Хемокин 3 с С-Х-С-мотивом	Секретируемый фосфопротеин 2, 24 кДа
Гомолог белка 2 переднего градиента	Фактор компонента D	Цистатин-М	Белок FAM150B
Гомолог 2 белка сапору	Хромогранин-А	Дефензин-5	Фактор роста/дифференцировки 9
Глипикан-1	Альфа-1 (I) -цепь коллагена	Дефензин-6	Кластерин-подобный белок 1
Белок 2, содержащий домен фактора Виллебранда А	Белок 18, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Белок 18, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок 2, содержащий трансмембранный и иммуноглобулиновый домен
Белок 1 WNT1-индуцируемого сигнального пути	Секреторный белок 1, богатый цистеином, содержащий LCCL-домен	Белок 3, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок UNQ5810/PRO19627, содержащий домен лектина С-типа
Хемокин 1 с С-С-мотивом	Альфа-4 (IV) -цепь коллагена	Dickkopf-родственный белок 4	Липокалин-10, специфический для эпидидимиса
SPARC-родственный модульный кальций-связывающий белок 2	Белок, ассоциированный с дифференцировкой кератиноцитов	Белок 5, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок 8, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином
Член А семейства 11 белков с доменом лектина С-типа	Компонент компонента C4-В	Белок 1, родственный эпндинину млекопитающих	Липокалин-8, специфический для эпидидимиса
Секретируемый Ly-6/uPAR-связанный белок 2	Альфа-2 (V) -цепь коллагена	Фибриллин-3	Основной богатый пролином пептид Р-Е
Глипикан-3	Компонент компонента C5	Фетуин-В	Предполагаемый неохарактеризованный белок C10orf99
Секретируемый и трансмембранный белок 1	Альфа-1 (VII) -цепь коллагена	Фактор роста фибробластов 6	Неохарактеризованный белок C17orf77
Белок последовательности 264, экспрессируемый яичками	Компонент компонента C7	Фактор роста кератиноцитов	Аналог 2 арилцетамиддеацетилазы
Глипикан-2	Бета-цепь компонента компонента C8	Фактор роста/дифференцировки 8	Липокалин-12, специфический для эпидидимиса

Сериновая протеаза 23	Гамма-цепь компонента комплемента C8	Желудочный ингибиторный полипептид	Антиген 2 В-меланомы
Митохондриальный 39S-рибосомный белок L55	Альфа-1 (XV) -цепь коллагена	Гликопротеиновый гормон бета-5	Антиген 3 В-меланомы
Гомолог 3А белка NipSnap	Альфа-1 (XVI) -цепь коллагена	Гранзим М	Гомолог 1 белка семенной плазмы крупного рогатого скота
Фибронектин	Альфа-1 (XVIII) -цепь коллагена	Гастрин-высвобождающий пептид	Белок 3, подобный компоненту C1q
Нейдезин	Альфа-1 (XIX) -цепь коллагена	Сериновая протеаза NTRA1	Белок UPF0565, C2orf69
Рецептор 2 фактора роста фибробластов	Олигомерный белок матрикса хряща	Интерферон альфа-4	Белок UPF0669, C6orf120
Карбоангидраза 6	С-реактивный белок	Интерферон альфа-5	Колипаза-подобный белок, C6orf127
Белок 1, делегированный в злокачественных опухолях головного мозга	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор	Интерферон альфа-7	Неохарактеризованный белок C7orf69
SPARC-родственный модульный кальций-связывающий белок 1	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор	Белок 7, содержащий мотивы дезинтегрина и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок, подобный рецептору тромбоцитарного фактора роста
Белок A4 бета-амилоида	Белок CYR61	Член 10 надсемейства иммуноглобулинов	Хондроадгерин-подобный белок
Член 6 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Белок, подобный рецептору 1 компонента комплемента	21-кДа белок, содержащий домен, ассоциированный с протеазой	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6490/PRO21339
Субъединица 1 рецептора типа В гамма-аминомасляной кислоты	Фактор роста стволовых клеток; лектин С-типа, секретируемый лимфоцитами	Белок FAM108A1, содержащий абгидролазный домен	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6493/PRO21345
Про-нейрегулин-1, мембранносвязанная изоформа	СМР-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Белок 9, содержащий мотивы дезинтегрина и металлопротеиназы с тромбоспондином	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ5815/PRO19632
Гликопротеиновый гормон альфа-2	Дипептидилпептидаза 4	Рецептор интерлейкина-9	Цистатин-А
Аналог 1 мембранной металлоэндопептидазы	Сиалофосфопроtein дентина	Интерлейкин-9	Ингибитор пептидазы R3NDML
Аналог А Fc-рецептора	Эндотелин-1	В-цепь бета-ингибина	Цистатин-9
Аналог хемокина 4 с С-С-мотивом	Эфрин-B1	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 2	Член 5 семейства белков с доменом DAN
Рецептор 1, содержащий домен эпителиального дискоидина	Белок, подобный эпидермис-специфической сериновой протеазе	ВМР-связывающий эндотелиальный регуляторный белок	Аналог 1 белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста
Муцин-1	Эмиллин-1	Белок 2, ассоциированный с кератиноцитами	Эпидидимальный белок 1, связывающий сперматозоиды
Фактор роста эндотелия сосудов А	Эндоплазмин	Субъединица альфа-1 ламинина	Элафин
Фибулин-1	Рецептор 3 эфрина типа А	Лейкоцитарный хемотаксин-2	Белок FAM55A
Рецептор пролактина	Рецептор 6 эфрина типа В	Желудочная триацилглицеринлипаза	Фактор роста/дифференцировки 6
Пропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 6	Белок 1, содержащий домен гликозилтрансферазы 1	Белок 3, содержащий богатый лейцином повтор и домен гомологии кальпонина	Белок 1, содержащий домен глюкоза/фруктоза-оксидоредуктазы
Антиген CD209	Фактор свертывания крови X	Белок 2, родственник панкреатической липазе	Эритропоэтин
Альфа-2 (XI) -цепь коллагена	Фактор свертывания крови VIII	Альфа-маннозидаза, специфическая для эпидидимиса	Глутатионпероксидаза 6
Альфа-субъединица рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора	Белок 7, родственник компоненту C1q и фактору некроза опухолей	Белок 7, содержащий домен фибронектина III типа	Неохарактеризованный белок UNQ511/PRO1026
Эластин	Фибриллин-2	Белок 5, ассоциированный с микрофибриллами	Бета-дефензин 128
Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-15	Альфа-2-HS-гликопротеин	Мюллеров ингибирующий фактор	Интерлейкин-31
Мидкин	Фактор роста фибробластов 10	Металлопротеиназа-21 матрикса	Интерлейкин-34
Интегрин альфа-7	Альфа-цепь фибриногена	Металлопротеиназа-17 матрикса	Белок 4, подобный плазматическому калликреину
Муцин-4	Бета-цепь фибриногена	Металлопротеиназа-20 матрикса	Липокалин-9, специфический для эпидидимиса
Альфа-амидирующая пептидилглициномонооксигеназа	Белок 1, ассоциированный с карциномой неба, легких и носового эпителия	Гамма-субъединица N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы	кДНК FLJ60957, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретиремым белком 4, связанным с ожогами
Аполипопротеин А-I	Гастрин	Мультимерин-2	Липаза М



Протеогликан 4	Альфа-цепь гликопротеиновых гормонов	Промотилин	CLECSF12
Член 25 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Альфа/бета-субъединицы N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы	Белок 3 внеклеточного матрикса, родственный FRAS1	Предполагаемая неактивная секреторная фосфолипаза A2 группы IIC
Аттрактин	Гранзим А	Белок NELL1, связывающий протеинкиназу C	Сериновая протеаза MPN2
Микросемипротейин, ассоциированный с предстательной железой	Белок, подобный фактору роста гепатоцитов	Белок NELL2, связывающий протеинкиназу C	Нетрин-5
Альфа-амилаза 1	Белок 1, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Нейротрипсин	Белок 3, содержащий NHL-повтор
Нейротрофический фактор головного мозга	Белок 2, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Нейросерпин	Ольфактомедин-подобный белок 2В
Член М семейства 4 белков с доменом лектина C-типа	Белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Нидоген-2	Овохимаза-2
Рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора	Член 10D надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Белок FAM108B1, содержащий абгидролазный домен	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ3029/PRO9830
Инсулиноподобный фактор роста II	Интерферон альфа-1/13	Нейротрофин-4	Овохимаза-1
Молекула клеточной адгезии 1, связанная с раковым эмбриональным антигеном	Белок 1, содержащий домен интерферон-индуцируемой хеликазы C	Секреторная глутатионпероксидаза эпидидимиса	Предполагаемый бета-1-гликопротеин 7, специфический для беременности
Член А семейства 7 белков с доменом лектина C-типа	Интерферон альфа-2	Секреторная фосфолипаза A2 группы 10	Гомолог 2 овостатина
Молекула 1, подобная CMRF35	Интерферон бета	Секреторная фосфолипаза A2 группы IID	Орексигенный нейропептид QRFP
Белок 4, подобный переносчику холина	Интерферон гамма	Лактопероксидаза	Лимфоцитарный антиген 6K
Белок A1, ассоциированный с сурфактантом легких	Инсулиноподобный фактор роста IB	Эффектор апоптоза p53, родственный PMP-22	Белок 1, экспрессируемый предстательной железой и яичками
Сперминоксидаза	Белок - "индийский еж"	Плацента-специфический белок 1	Аналог 1 предполагаемой фосфолипазы В
СМР-N-ацетилнейраминат-бета-1,4-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Белок, подобный молекуле L1 адгезии нервных клеток	Тубероинфундибулярный пептид из 39 остатков	Предполагаемый неохарактеризованный белок FLJ42147
Калликреин-8	Интерлейкин-13	Проларгин	Отогелин
Активатор плазминогена тканевого типа	Интерлейкин-2	Секретогранин-2	Рибонуклеаза 8
Пероксисомальная N(1)-ацетилспермин/спермидин оксидаза	Член 2A семейства химотрипсин-подобной эластазы	Белок 1, содержащий эндонуклеазный домен	Аналог 2 белка, взаимодействующего с комплексом ядерной поры
Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDNHC4	A-цепь ингибина бета	Семафорин-3В	Аналог 1 проактиваторного полипептида
Белок-переносчик эфиров холестерина	Панкреатический секреторный ингибитор трипсина	гивс (гормон, индуцирующий высвобождение соматотропина)	Гомолог 2 белка spinster
A-2 альфа-цепь антигена гистосовместимости HLA I класса	Член 21 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Аналог 2 члена 4 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Аналог белка 2, содержащего домен фактора Виллебранда C
Альфа-1 (II)-цепь коллагена	Тяжелая цепь H1 ингибитора интер-альфа-трипсина	Транскобаламин-1	Уротензин-2В
Предшественник интерлейкина-16	Тяжелая цепь H2 ингибитора интер-альфа-трипсина	Фактор "трилистника" 2	Тетраспанин-18
Рецептор лептина	Тяжелая цепь H3 ингибитора интер-альфа-трипсина	Тестикан-1	Мембранный белок FAM159A UPF0514
Декорин	Простатоспецифический антиген	Сывороточная параоксоназа/лактоназа 3	Латерин
Фактор клеток стромы 1	Калликреин-4	Tollloid-подобный белок 2	Белок 7В, подобный метилтрансферазе
Тенасцин	Плазматический калликреин	Трипсин-2	Белок TEX261
Белок 12, содержащий домен дезинтегрина и металлопротеиназы	Регулятор 4 кальций-активируемого хлоридного канала	Белок 1, содержащий RING-"палец" и домен SPRY	Гомолог 7 алкилированного белка репарации ДНК AlkB
Белок 13, содержащий мотивы дезинтегрина и металлопротеиназы с тромбоспондином	Аналог 1 белка, усиливающего бактерицидные свойства/проницаемость	Кальций-связывающий белок 1, содержащий суперспирализованный домен	Белок 6, содержащий трансмембранный домен emp24
Альфа-цепь гликопротеина CD8 поверхности Т-клеток	Лептин	Белок Wnt-2	XK-родственный белок 5
Белок, совместно амплифицируемый и сверхэкспрессируемый с EGFR	Белок 4, содержащий мотивы дезинтегрина и металлопротеиназы с тромбоспондином	Эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролаза 8	Предполагаемый белок 7, содержащий V-набор и иммуноглобулиновый домен

Белок 16-1, связанный с аутофагией	Печеночная триацилглицеринлипаза	Белок Wnt-8B	Член 3 семейства инсулиноподобного фактора роста
Белок 3 устойчивости рака молочной железы к эстрогенам	Белок G6C комплексного локуса лимфоцитарного антигена 6	UDP-GlcNAc:betaGal-beta-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 4	Аналог 1 белка, взаимодействующего с комплексом ядерной поры
Кадгерин-23	Лизофосфолипаза эозинофилов	Белок 1, содержащий домен EMI	Секретируемый фосфоропротеин 1
Моноцитарный колониестимулирующий фактор 1	Бета-субъединица лютропина	Неохарактеризованный белок C6orf15	Альфа-5 (VI)-цепь коллагена
Альфа-рецептор фолата	Белок 1, ассоциированный с микрофибриллами	Коллектин-10	Антиген 5 В-меланомы
Белок 8, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности	Нейротрофический фактор астроцитов среднего мозга	Лигаза ACSBG2 длинноцепочечных жирных кислот - CoA	Белок 10A, содержащий коровий домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями
Убиквитинпротеинлигаза E3 LRSAM1	Белок Gla матрикса	Белок транскрипта 3, индуцируемого онкопротеином	Белок UPF0369, C6orf57
Молекула адгезии нервных клеток 1	72-кДа коллагеназа типа IV	Ингибитор 15 пептидаз	Предполагаемый неохарактеризованный белок C10orf31
Нейролитин-4, X-сцепленный	Стромелизин-1	Пролин-богатый кислый белок 1	Предполагаемый неохарактеризованный белок C11orf45
Нетрин-G1	Коллагеназа нейтрофилов	Урокортин	Неохарактеризованный белок C12orf28
Компонент PIG-T трансмидазы GPI	Мезотелин	Трипсин-X3 (EC 3.4.21.4)	Неохарактеризованный белок C17orf67
Лиганд KIT	Муцин-5AC	ННIP-подобный белок 2	Бета-дефензин 121
Белок, подобный Seizure 6	Муцин-6	Фракталкин	Бета-дефензин 130
Член 7 семейства SLAM	Норрин	Белок Wnt-11	Нуклеотид-связывающий белок 2 с гистидиновой триадой
Фактор некроза опухолей	Окситоцин-нейрофизин 1	Белок Wnt-7a	Апелин
Уромодулин	Фактор роста нервов-бета	Белок 1 с FCH и двойным SH3-доменами	Плацента-специфический белок 9
Член 13 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Член 18 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Белок 2, родственный гепатомному фактору роста	Белок TD26, ассоциированный с гепатоцеллюлярной карциномой
Белок CREG1	Нейротрофин-3	Альфа-субъединица интерлейкина-12	Персефин
Белок 8, содержащий ЭФР-подобный домен	Субъединица А тромбоцитарного фактора роста	Белок UPF0577 KIAA1324	Регулируемый эндокринно-специфический белок 18
Многофункциональный белок 1, взаимодействующий с комплексом аминоксил-тРНК-синтетазы	Фосфопантотеноилцистеиндекарбоксилаза	Белок 9, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей	Белок 8, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей
ADAMTS-подобный белок 4	Ингибитор активатора плазминогена 1	Муцин-17	Костный морфогенетический белок 8A
Фактор свертывания крови XI	Ингибитор активатора плазминогена 2	Лизосомальный белок NCU-G1	Белок WFDC13
Альфа-2-субъединица рецептора интерлейкина-22	Энхансер 1 проколлаген C-эндопептидазы	Альфа-3-субъединица пролил-4-гидроксилазы	Белок Wnt-8a
Гомолог деформированного эпидермального ауторегуляторного фактора 1	Белок 2, содержащий трансмембранный и убиквитиноподобный домен	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза SDCCAG10	Белок ENSP00000270642, содержащий Ig-подобный домен
Простагландин-H2-D-изомераза	Протеиндисульфидизомераза	Ингибитор 16 пептидаз	Белок 15, содержащий абгидролазный домен
Альфа-1-антитрипсин	Фактор пигментного эпителия	Белок 4, родственный рецептору полиовируса	Рибонуклеаза-подобный белок 9
Альфа-1-антихимотрипсин	Пепсин А	Член 15 семейства 22 переносчиков растворенных веществ	Неохарактеризованный белок C2orf66
Ацил-CoA-связывающий белок	Гастрексин	GPI-инозитдеацилаза	Неохарактеризованный белок C17orf99
Фактор комплемента В	Белок "sonic hedgehog"	Трансмембранный белок 43	Белок FAM150A
Бета-субъединица хориогонадотропина	Пептидогликан-распознающий белок I-альфа	Антиопэтин-связанный белок 2	Белок, подобный плацента-специфическому белку 1
Коровый белок верзикана	Бигликан	Антиопэтин-связанный белок 6	Неохарактеризованный белок C18orf20
Рецептор эпидермального фактора роста	Пролактин-индуцируемый белок	Арилсульфатаза К	Бета-дефензин 110
Дисульфид-тиоловый антипортер 2 Ecto-NOX	Тромбоцитарный фактор 4	Аугурин	Нейритин-подобный белок
Гиалуронидаза-1	Плазминоген	Сериновая протеаза 4, специфическая для головного мозга	Белок 1 с C-концом, богатым гистидином
Белок-антагонист рецептора интерлейкина-1	Сывороточная параоксоназа/арилэстераза 1	DBH-подобный монооксигеназный белок 1	Член А семейства 2 белков с доменом лектина C-типа

Бета-субъединица рецептора интерлейкина-6	Щелочная фосфатаза плацентарного типа	Неохарактеризованный белок C1orf56	Белок 70, содержащий повтор, богатый лейцином
Аналог 1 рецептора интерлейкина-1	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза B	Церебеллин-3	Серпин A13
Инсулин	Протеогликан костного мозга	Церебеллин-4	Белок 17, содержащий домен BTV/POZ
Гликоделин	Основной богатый пролином белок 1 слюны	Колипаза-подобный белок, C6orf126	Неохарактеризованный белок C12orf53
Белок, связанный с паратгормоном	Белок C, ассоциированный с сурфактантом легких	Неохарактеризованный белок C11orf83	Член A семейства 9 белков с доменом лектина C-типа
Нурип	Паратиреоидный гормон	Неохарактеризованный белок C16orf89	Белок 4, подобный компоненту C1q
Альфа-2-субъединица пролил-4-гидроксилазы	Сывороточный компонент Р амилоида	Карбоксипептидаза-подобный белок X2	Молекула 4, подобная SMRF35
Антиген CD276	Секретогранин-1	Цистатин-9-подобный белок	Белок FAM151B
Белок 1 с ЭФР-подобным доменом, богатый цистеином	Коровий белок протеогликана гепарансульфата, специфический для базальной мембраны	Член 13 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Белок FAM108A2/A3, содержащий абгидролазный домен
Белок 1, содержащий домен CUB и sushi	Антилейкопротеиназа	Бета-дефензин 123	Остеокрин
Фиколин-2	Стабилин-1	Бета-дефензин 132	Трансмембранная сериновая протеаза 11E2
Белок 5, подобный Fc-рецептору	Внеклеточная супероксиддисмутаза [Cu-Zn]	Цитокин-подобный белок 1	Трансмембранный белок 14E
Белок GPR89	Соматотропин	Dickkopf-родственный белок 2	Трансмембранный белок 207
Соединительная молекула адгезии A	Серпин B5	Dickkopf-подобный белок 1	ТОММ20-подобный белок 1
Белок 8A, содержащий богатый лейцином повтор	Спондин-1	Секреторный белок E3-бета эпидидимиса	Неохарактеризованный белок C3orf41
Фосфатаза множественных инозитфосфатов 1	Белок 3 поддержания структуры хромосом	Белок 3, содержащий ЭФР-подобный повтор и домен, подобный дискоидину I	Андроген-регулируемый белок 3A подчелюстной железы
Нейропилин-1	Синтаксин-1A	Белок FAM55D	Антиген 1 В-меланомы
Плексин-A4	Тетранектин	Фактор роста фибробластов 17	Неактивная карбоксилэстераза 4
Плексин-B1	Трансформирующий фактор роста бета-1	Фактор роста фибробластов 22	Белок 1, содержащий домен four-jointed box
Периостин	Тиреоглобулин	Белок 2, связывающий фактор роста фибробластов	Белок HSN2
Белок RIC-3	Ингибитор металлопротеиназ 1	Фактор роста/дифференцировки 3	Гуманин
SLIT и NTRK-подобный белок 2	Ингибитор металлопротеиназ 2	GLIPR1-подобный белок 1	Киелин/хордин-подобный белок
Фактор 1, модифицирующий сульфатазу	Ингибитор металлопротеиназ 3	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 6	Белок UPF0624, C6orf186
Фактор 2, модифицирующий сульфатазу	Активатор плазминогена урокиназного типа	Интерлейкин-17B	Предполагаемый нейروفибромин 1-подобный белок 4/6
Трансмембранная сериновая протеаза 6	Лактотрансферрин	Интерлейкин-17C	Пероксидазин-подобный белок
Лимфотоксин-альфа	Трипсин-1	Интерлейкин-17D	SCO-спондин
Член 10B надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Андроген-регулируемый белок 3B подчелюстной железы	Белок 3 связи гиалуронана и протеогликана	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ9165/PRO28630
Поверхностный рецептор урокиназного активатора плазминогена	Член 1A надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Гомолог белка 1 внешнего слоя желточной мембраны	Член 3 семейства регуляторов кальций-активируемого хлоридного канала
Ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий домен V-набора	Рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов	Вариант 1 бета-субъединицы хориогонадотропина	Вероятная сериновая протеаза UNQ9391/PRO34284
Глюкагон	Белок, связывающий витамин D	Лизоцим-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C4orf26
N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза	Витронектин	Металлопротеиназа-28 матрикса	Неохарактеризованный белок C4orf40
Сульфгидрилоксидаза 1	Фактор Виллебранда	Нефронектин	Неохарактеризованный белок C5orf55
Член 4 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Белок G5c комплексного локуса лимфоцитарного антигена 6	Белок 12, содержащий коровий домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	Предполагаемый макрофаг-стимулирующий белок MSTR9
Интерлейкин-18-связывающий белок	Цинк-альфа-2-гликопротеин	Ольфактомедин-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C15orf61
Аналог IRRF-подобного белка 2	Неохарактеризованный белок C14orf93	Ольфактомедин-подобный белок 2A	Химотрипсинаген B2
Миелоидный-ассоциированный маркер дифференцировки	Ретиносхинин	Сериновая протеаза 27	Бета-дефензин 108A
Хордин	Альфа-1,3-маннозилтрансфераза ALG2	Член 2 семейства 3A секретоглобина	Бета-дефензин 111
1-ацил-sn-глицерин-3-фосфатацитрансфераза гамма	Изоформа CRA b члена A семейства 11 белков с доменом лектина C-типа	Белок 2, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Предполагаемый белок 6, содержащий V-набор и иммуноглобулиновый домен

Рецептор, специфичный к конечным продуктам усиленного гликозилирования	Белок 7, содержащий MFS-домен	Белок 28, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Аналог 3 ингибитора сериновых протеаз типа Kazal 5
Белок 4 семейства NLR, содержащий CARD-домен	Трансмембранный белок нейронов 1, содержащий богатый лейцином повтор	Аналог 2 белка, усиливающего бактерицидные свойства/проницаемость	Предполагаемый аналог 2 ингибитора сериновых протеаз типа Kazal 5
Пронейрегулин-2, мембраносвязанная изоформа	Субъединица 11 подкомплекса митохондриальной NADH-дегидрогеназы [убихинон] 1 бета	Фосфодиэстераза 3b, подобная кислой сфингомиелиназе	Член 7C SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз
Антиген 11A, ассоциированный со спермой	Мембранный белок UPF0546, C1orf91	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 7	Бета-дефензин 131
Гомолог ооцит-секретируемого белка 1	Карбоангидраза-родственный белок 10	Нейрексофилин-4	Бета-дефензин 134
Сывороточный альбумин	Холецистокинин	Белок Wnt-9b	Бета-дефензин 136
Колин	Коданин-1	Гомолог В белка 16 зимогенных гранул	Бета-дефензин 116
Ингибитор плазматической протеазы C1	Неохарактеризованный белок C6orf89	Семафорин-3D	Белок FAM132A
Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-7	Хондроитинсульфат-глюкуроилтрансфераза	Аполипопротеин L4	Белок FAM132B
Тяжелая цепь H5 ингибитора интер-альфа-трипсина	Белок 1, содержащий домен хитиназы	Трансмембранная сериновая протеаза 11D	Бета-дефензин 115
Тромбоцитарный фактор роста D	Трансмембранный белок C9orf7	Скрепи-реактивный белок 1	Бета-дефензин 114
Белок S100-A7	Молекула 9, подобная CMRF35	Предполагаемый аннексин-A2-подобный белок	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 9
Лектин 10, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту	Цитохром P450 2S1	Костный морфогенетический белок 10	Липаза N
Аналог антигена тубулоинтерстициального нефрита	Гомолог 3 белка Crumbs	Секретогранин-3	Белок 3, родственный панкреатической липазе
Член 13B надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Член 7 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Белок 4, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей	Белок, экспрессируемый яйцками, предстательной железой и плацентой
Лигаза 5 длинноцепочечных жирных кислот - CoA	Белок ENED	Неохарактеризованный белок C1orf54	Нейромедин-S
Клаудин-14	Белок 4, родственный фактору комплемента H	Карбоксипептидаза A6	Нейропептид S
Белок 20, содержащий повтор, богатый лейцином	Член 3 LGI-семейства белков, содержащих повтор, богатый лейцином	Хемокин 19 с C-C-мотивом	Пентраксин-подобный белок нейронов, C16orf38
Член 7 семейства интерлейкина-1	Глиомедин	Хемокин 25 с C-C-мотивом	Отолин-1
Белок G5b комплексного локуса лимфоцитарного антигена 6	Белок 5, содержащий домен глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы	Член 2B семейства химотрипсин-подобной эластазы	Белок, подобный железу/цинксодержащей пурпурной кислой фосфатазе
Ацетилхолинэстераза	Вероятный рецептор 113, сопряженный с G-белком	Белок CEI	Гомолог 1 овостатина
Амелогенин, X-изоформа	Вероятный рецептор 114, сопряженный с G-белком	Неохарактеризованный белок C6orf1	Плазминоген-родственный белок A
Ангиогенин	Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 4	Неохарактеризованный белок C7orf34	Полисерара-3
Рецептор 2 сибирезавенного токсина	Гремлин-1	Белок 3, ассоциированный с кератиноцитами	Предполагаемый пептид YY-2
Аннексин A2	Член 17 подсемейства K калиевых каналов	Неохарактеризованный белок C9orf47	Предполагаемый пептид YY-3
Аполипопротеин C-III	Белок 2, содержащий KDEL-мотив	Альфа-1(VIII)-цепь коллагена	Рибонуклеаза-подобный белок 10
Аполипопротеин L1	Лайилин	Неохарактеризованный белок C18orf54	Рибонуклеаза-подобный белок 12
Субъединица A подкомплемента комплемента C1q	Белок 8B, содержащий богатый лейцином повтор	Аналог 1 цистатина	Рибонуклеаза-подобный белок 13
Субъединица C подкомплемента комплемента C1q	Белок 8D, содержащий богатый лейцином повтор	Белок 2, содержащий C2-домен	Серпин A11
Кальцитонин	Лектин 6, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту	DDRГK-доменсодержащий белок 1	Ингибитор 4 протеаз типа Куинитца
Нуклеотидаза 1, активируемая растворимым кальцием	Бета-1-гликопротеин 2, специфический для беременности	Белок FAM55C	Метеорин-подобный белок
Хемокин 15 с C-C-мотивом	Белок 1, содержащий Lu6/PLAUR-домен	Альфа-1(XXVI)-цепь коллагена	Предполагаемая сериновая протеаза 2 яичек
Антиген CD97	Белок 5, содержащий Lu6/PLAUR-домен	Белок FAM19A2	Бета-дефензин 112
Контактин-4	Гомолог N-концевого домена MLN64	Белок FAM5B	Неохарактеризованный белок FLJ37543
Комплемент C2	Фактор ингибирования миграции макрофагов	Фактор роста фибробластов 5	Белок FAM24A
Альфа-6(IV)-цепь коллагена	2-ацилглицерин-О-ацилтрансфераза 3	Вероятная сериновая протеаза HTRA3	Секретируемый белок 4, связанный с ожогами

Альфа-2 (VI)-цепь коллагена	Гомолог 1 митохондриального переносчика	Член 8 семейства интерлейкина-1	Белок 2, подобный комплекменту C1q
Альфа-1 (XI)-цепь коллагена	Аполипопротеин L6	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 4	Предполагаемый неохарактеризованный белок C1orf69
Гомолог 1 Crumbs	Протокадгерин альфа-6	Отоспиралин	Предполагаемый цистатин-13
Цистатин-С	Протокадгерин гамма-A12	Антимикробный пептид 2, экспрессируемый в печени	Бета-дефензин 109
Дефензин 1 нейтрофилов	Потенциалзависимый протонный канал 1	Гомолог 1 лизилоксидазы	Бета-дефензин 113
Эндотелин-3	Полностью транс-ретинол-13,14-редуктаза	Гомолог 2 лизилоксидазы	Бета-дефензин 135
Fc-рецептор эпсилон-иммуноглобулина с низким сродством	Регуляторный белок динамики микротрубочек 2	Белок 4, ассоциированный с карциномой неба, легких и носового эпителия	Белок LOC136242, содержащий домен пептидазы S1
Рецептор 3 фактора роста фибробластов	R-спондин-4	Лизосим g-подобный белок 2	Фактор роста/дифференцировки 7
Рецептор 4 фактора роста фибробластов	Транспортный белок длинноцепочечных жирных кислот 3	Эндомуцин	Гомолог IgA-индуцирующего белка
Белок 6, специфический для остановки роста	Белок транспорта везикул SEC22c	Нейропептид В	Предполагаемый липокалин-1-подобный белок 1
Рецептор гормона роста	Клаудин-1	Кинезин-подобный белок KIF7	Предполагаемая сериновая протеаза 29
Бифункциональная УДФ-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза/N-ацетилманнозаминкиназа	Белок 3, содержащий повторы, богатые лейцином, и иммуноглобулин-подобные домены	Лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулин-подобный рецептор 2	Предполагаемый белок LOC619207 фаточитарного рецептора, содержащий домен, богатый цистеином
Член 8 надсемейства иммуноглобулинов	Член 9 семейства SLAM	Кальций-зависимая фосфолипаза A2	Секретоглобин-подобный белок
Альфа-цепь рецептора интерлейкина-4	Транстиретин	Белок-адаптер проапоптотической каспазы	Предполагаемый стереоцилин-подобный белок
Калликреин-14	Серин/треониновая протеинкиназа 32B	Интегрин-бета-подобный белок 1	Член 2 семейства инсулиноподобного фактора роста
Калликреин-6	Субъединица В тромбоцитарного фактора роста	Tollid-подобный белок 1	KIR2DL4
Бета-3-субъединица ламинина	Ноггин	Ингибитор 3 протеаз типа Кунитца	Предполагаемый аналог 1 цинк-альфа-2-гликопротеина
Лейцилцистиниламинопептидаза	Триптаза альфа-1	Белок TMEM155	Член 4 семейства инсулиноподобного фактора роста
Сериновая протеаза 1 маннан-связывающего лектина	Белок 14, содержащий тридцатичетырехчленный повтор	Просальюзин	Неохарактеризованный белок C2orf72
Сериновая протеаза 2 маннан-связывающего лектина	Белок ХТР3-трансактивируемого гена В	Белок amnionless	Белок, подобный фактору инициации репликации
Липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов	Пальмитоилтрансфераза ZDNHC15	Белок WFDC10B	Белок 3, экспрессируемый предстательной железой и яичками
Нейропептид Y	Белок 3 вителлинового слоя, связывающий сперматозоиды	Белок 8, содержащий коровый домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	Антиген 4 В-меланомы
Коровый белок агрекана	Белок 39, содержащий повтор, богатый лейцином	Белок Wnt-5b	Предполагаемый неохарактеризованный белок C1orf191
Белок В, ассоциированный с сурфактантом легких	Панкреатическая триацилглицеринлипаза	Белок Wnt-7b	Аналог бета-дефензина 108В
Белок 1, родственный рецептору полиовируса	Трансмембранный белок 139	Белок 2, связывающий вителлиновый слой	Неохарактеризованный белок FLJ90687
Ренин	Фактор ингибирования лейкоза	Аналог белка 5, связывающего SH3-домен	Секретируемый белок 2, связанный с ожогами
Панкреатическая рибонуклеаза	Галектин-1	Молекула адгезии адипоцитов	Основной богатый пролином пептид IB-1
Семеногелин-1	Хемокин 21 с C-C-мотивом	Неохарактеризованный белок C12orf59	Фактор роста фибробластов 16
Сигнальная молекула активации лимфоцитов	Аналог антигена CD5	Аполипопротеин-AI-связывающий белок	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 8
Ингибитор пути тканевого фактора	Карбогидратсульфо-трансфераза 9	Клаудин-17	Неохарактеризованный белок KIAA0495
Ушерин	Липополисахарид-связывающий белок	Неактивная каспаза-12	Аналог 2 основного белка тромбоцитов
Фактор роста фибробластов 23	Белок двигательных нейронов 1, богатый цистеином	Неохарактеризованный белок C7orf58	Серпин Е3
Альфа-субъединица интерлейкина-23	Фактор роста соединительной ткани	Альфа-1 (XXVIII)-цепь коллагена	CR1-рецептор
Секреторный белок E1 эпидидимиса	Гомолог белка закрытых глаз	Белок 4 матрикса дентина	Секретируемый фосфоропроtein 1

ADAMTS-подобный белок 1	Муцин-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C16orf48	Стресс-индуцируемый секретрируемый белок 1
Хемокин-подобный фактор	Фактор роста фибробластов 19	Карбоксилэстераза 3	Белок Wnt
Белок 7, содержащий ЭФР-подобный домен	Фоллистатин-родственный белок 3	Белок FAM20B	Белок Wnt (фрагмент)
Тектоник-1	Белок, взаимодействующий с белками hedgehog	ГТФаза 3 с GPN-петлей	Предполагаемая сериновая протеаза LOC138652
Трансмембранный белок 25	Рецептор В интерлейкина-17	Белок 1B, содержащий GRAM домен	TOM1
UDP-GalNAc:бета-1,3-N-ацетилгалактозаминил-трансфераза 1	Регулятор ионного транспорта 5, содержащий FXFD-домен	Белок класса U биосинтеза якорного компонента фосфатидилинозит-гликана	Предполагаемый неохарактеризованный белок FLJ46089
Интерлейкин-15(IL-15)	Эндотелиальная липаза	Альфа-субъединица интерлейкина-27	Предполагаемый неохарактеризованный белок C1orf134
Белок 11, содержащий несколько ЭФР-подобных доменов	ЭФР-содержащий фибулин-подобный белок 2 внеклеточного матрикса	Пронейрегулин-4, мембранно-связанная изоформа	UDP-GlcNAc:betaGal-бета-1,3-N-ацетилгалактозаминил-трансфераза 9
Муцин- и кадгерин-подобный белок	Отораплин	Белок нейронов 3, содержащий богатый лейцином повтор	Неохарактеризованный белок C11orf44
Рибонуклеаза 4	Секреторная фосфолипаза A2 группы 3	Белок 2, регулируемый рецептором NMDA	Неохарактеризованный белок C12orf73
SH2-доменсодержащий белок 3C	Фосфолипаза A2 группы XV	NADH-цитохром b5-редуктаза 1	Предполагаемый аналог 2 цистатина-9
СМР-N-ацетилнейраминат-бета-галактозаминид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Член 14 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Белок 1, содержащий домен болезни Паркинсона 7	Предполагаемый белок FAM108A5, содержащий абгидролазный домен
Трансмембранный белок 9	Плексин-A2	FK506-связывающий белок 11	Бета-дефензин 133
Белок 2, содержащий коровий домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	Папилин	Член В семейства 12 белков с доменом лектина C-типа	Фиброзин-1
Рецептор аденозина A3	Прокинетицин-1	Член F5 семейства 35 переносчиков растворенных веществ	Вероятный дельта-рецептор фолата
Субъединица APN-1A гамма-секретазы	Рибонуклеаза 7	Лектин 12, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту	RPE-спондин
Базигин	Ингибитор 1 протеаз типа Кунитца	Белок FAM19A3	NP1P-подобный белок ENSP00000346774
Белок 7, содержащий IAP-повтор бакуловируса	Спондин-2	Белок 82, содержащий WD-повтор	Предполагаемый прионный белок, специфический для яиц
Калуменин	Тестикан-2	Белок 1, связывающий энхансер адипоцитов	Белок 1, богатый пролином
Альфа-S1-казеин	Неактивная сериновая протеаза PAMR1	ADAMTS-подобный белок 3	Предполагаемый неохарактеризованный белок FP248
Циклин-L1	Торсин-2A	Белок 80, содержащий суперспирализованный домен	Белок UPF0670, C8orf55
Фактор комплемента H	Вазогибин-1	Дисульфид-тиоловый антипортер 1 Ecto-NOX	Предполагаемый аналог 2 цинк-альфа-2-гликопротеина
Хорионический соматотропин	Вазорин	Регулятор роста нейронов 1	Белок SPARC
Рецептор вируса Коксаки и аденовируса	Ксилозилтрансфераза 1	Интерфоторецепторный матриксный протеогликан 1	Отпетрин-1
Член 2 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы	Член 6 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы	кДНК FLJ36603 fis, клон TRACH2015180, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретрируемым белком 2, связанным с ожогами	кДНК FLJ55667, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретрируемым кислым белком, богатым цистеином
ERO1-подобный белок альфа	Онкостатин-M	Липаза H	Липаза K
Фактор свертывания крови IX	Дерлин-1	Муцин-19 (MUC-19)	Член C семейства 18 белков с доменом лектина C-типа
Рецептор III-B Fc-области гамма-иммуноглобулина с низким сродством	Предшественник Env-полипротеина провируса HERV-FRD_6p24.1	Белок гена-кандидата 2 подверженности псориазу 1	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6125/PRO20090
Фиколин-3	Простагин	Интегральный мембранный белок 2A	Компонент комплемента C3
Белок 2, подобный Fc-рецептору	Трансмембранная сериновая протеаза 11E	Белок транспорта везикул SFT2B	Альфа-2(IV)-цепь коллагена
Трансмембранный белок FLRT3, содержащий богатый лейцином повтор	Альфа-цепь антигена гистосовместимости HLA I класса Cw-16	Белок 3A, содержащий домен фактора Виллебранда A	Неохарактеризованный белок UNQ6126/PRO20091
Гельсолин	WNT-ингибиторный фактор 1	Гомолог белка shisa-2	Серпин-подобный белок HMSD

Гранулизин	Натрийуретический пептид типа С	Субъединица 3 комплекса сигнальной пептидазы	Белок 4, экспрессируемый предстательной железой и яичками
Трансмембранный гликопротеин NMB	Ангиопозтин-2	Белок 2, подобный сиаломуцину CD164	Альфа-1 (XXII)-цепь коллагена
Гранулины	Дезоксирибонуклеаза гамма	Кадгерин-16	Предполагаемый неохарактеризованный белок C13orf28
Гепараназа	Карбоксипептидаза A5	Кадгерин-19	Цистатин-S
С-область мю-цепи Ig	Хемокин 14 с C-C-мотивом	Церебеллин-2	R-спондин-1
Интерлейкин-1 альфа	Интерлейкин-5	Трансмембранный белок C3orf1	C8orf2
Рецептор А интерлейкина-31	Интерлейкин-10	Белок 1 экваториального сегмента сперматозоида	Одорант-связывающий белок 2a
Соединительная молекула адгезии В	Хемокин 2 с C-X-C-мотивом	Неохарактеризованный белок C6orf72	Опиорфин
Липокалин-1	Хемокин 5 с C-X-C-мотивом	Неохарактеризованный белок C11orf24	Белок почек, регулируемый андрогенами
Рецептор 6, сопряженный с G-белком и содержащий повтор, богатый лейцином	Белок 6, содержащий мотивы дезинтегрина и металлопротеиназы с тромбоспондином	Член 2 семейства ацил-СоА-синтетазы (митохондриальный)	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ5830/PRO19650/PRO19816
Белок 1, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета	Полипептид N-ацетилгалактозамин-трансфераза 1	Вероятный белок-транспортер УДФ-углеводов SLC35A5	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6975/PRO21958
Матрилин-3	Фибулин-2	Член А семейства 1 белков с доменом лектина C-типа	Тахикинин-3
Белок 1, подобный миелиновому белку zero	Фиколин-1	Член А семейства 3 белков с доменом лектина C-типа	Секретируемый фосфоропроtein 1
Нейробичин-подобный белок 2	Цитокин SL	Член Е семейства 4 белков с доменом лектина C-типа	Склеростин
Никастрин	Фоллистатин	Член G семейства 4 белков с доменом лектина C-типа	ADAMTS-подобный белок 2
Митохондриальная АДФ-рибозопирофосфатаза	FRAS1-родственный белок 1 внеклеточного матрикса	Вероятная катион-транспортная АТФаза 13A4	Белок LOC284297 фагоцититарного рецептора, содержащий домен, богатый цистеином
Протокадгерин-15	Энамелин	Белок UPF0480, C15orf24	Триптаза бета-1
Фактор роста плаценты	Белок 1 связи гиалуронана и протеогликана	Белок 4 вителлинового слоя, связывающий сперматозоиды	Триптаза дельта
Протеин-О-связанная манноза-бета-1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 1	Член 3 подсемейства А иммуноглобулиноподобных рецепторов лейкоцитов	Резидентный белок эндоплазматического ретикулума ERp27	Предполагаемый белок 9 критической области синдрома кошачьего глаза
Вероятная гидролаза PNKD	Интерлейкин-17F	Трансмембранный белок C16orf54	Белок 1, содержащий домен плексина
Плейотропин	Аксессуарный белок рецептора интерлейкина-1	Цитохром P450 4F12	Гомолог MC51L-53L-54L (фрагмент)
Рецептор полиовируса	Ингибитор сериновых протеаз типа Kazal 5	Цитохром P450 4X1	COBW-подобный плацентарный белок (фрагмент)
Рецептор ретикулона-4	Калликреин-15	Цитохром P450 4Z1	Фактор 2, подобный рецептору цитокинов
Сывороточный белок А амилоида	Интерферон альфа-14	Белок CREG2	Бета-дефензин 103
Глобулин, связывающий половые гормоны	Бета-1-гликопротеин 4, специфический для беременности	Член 9 подсемейства В гомологов DnaJ	Бета-дефензин 106
Член 6 семейства SLAM	Коллагеназа 3	Дипептидаза 3	Гиалуронидаза-3
Белок, ассоциированный с мембраной сарколеммы	Металлопротеиназа-16 матрикса	Мембранный белок FAM174A	Альфа-цепь рецептора интерлейкина-28
Белок 1, содержащий домены sushi, фактора Виллебранда типа А, ЭФР и пентраксина	Полипептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза	Белок 15, содержащий домен тиоредоксина	Белок, содержащий домен гликозилтрансферазы 54
Тиоксин-связывающий глобулин	Прокинетицин-2	Белок FAM19A4	Хордин-подобный белок 1
Белок 1, содержащий трансмембранный и суперспирализованный домен	Белок 3, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета	Аденозинмонофосфатпрот еинтрансфераза FICD	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ9370/PRO34162
Трансмембранная сериновая протеаза 3	Соматолиберин	Аналог пренилцистеиноксидазы	Рецептор нетрина UNC5B
Член 10C надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Белок 1, содержащий домен тромбоспондина типа 1	Аналог белка, взаимодействующего с фитаноил-СоА-гидроксилазой	Белок секретируемой формы рецептора фактора роста фибробластов FGFR-1 (фрагмент)
Член 11B надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Ангиогенный фактор 1 с доменами G-patch и FNA	Регулятор ионного транспорта 4, содержащий FXFD-домен	Неохарактеризованный белок ENSP00000244321
Серотрансферрин	Рецептор ТФР-бета типа III	Фактор роста/дифференцировки 11	ECE2
Триптаза бета-2	Бета-субъединица тиреотропина	Церебральный нейротрофический фактор дофамина	ERA6

Белок YIPF5	Неохарактеризованный белок C19orf36	ГТФаза 2 с GPN-петлей	Предполагаемый растворимый рецептор 1 интерлейкина 18
Белок В/С, ассоциированный с мембранным белком, ассоциированным с везикулами	Белок 2, родственный комплексу C1q и фактору некроза опухолей	Трансмембранный белок, индуцируемый гормоном роста	Предполагаемый белок FAM108A6, содержащий абгидролазный домен
кДНК, FLJ96669, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретрируемым кислым белком, богатым цистеином (остеонектином) (SPARC) Homo sapiens, мРНК	Член 5 семейства эктонуклеотидпирифосфатазы/фосфодиэстеразы	Белок 2, содержащий домен глицерофосфодиэфир-фосфодиэстеразы	Предполагаемый белок ENSP00000303034, подобный белку, содержащему V-набор и иммуноглобулиновый домен
кДНК, FLJ77519, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретрируемым белком Homo sapiens, связанным с ожогами, мРНК	Белок 2, подобный полипептид-N-ацетилгалактозаминил-трансферазе	Белок 1, содержащий домены WAP, Kazal, иммуноглобулина, Кунитца и NTR	Вариант 4 транскрипта антигена созревания В-клеток (член 17 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей)
Антиген CD6 дифференцировки Т-клеток	Белок гомолога 1 Slit	Белок 1, содержащий KDELR-мотив	Белок UPF0672, C3orf58
Пикачурин	Вариант гормона роста	Адиополин	Метилтирибозо-1-фосфатизомераза
Фибриноген-подобный белок 1	Ангиопоэтин-связанный белок 3	Лактаза-подобный белок	17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 13
Интерлейкин-32	Ангиопоэтин-связанный белок 7	Хондромодулин-1	Аминопептидаза В
Матрили-4	Экто-АДФ-рибозилтрансфераза 5	Альфа-6 (VI) -цепь коллагена	Дермидин
Антиген 11В, ассоциированный со спермой	Карбоангидраза-родственный белок 11	Белок 33, содержащий повтор, богатый лейцином	Метеорин
Фактор свертывания крови XII	Вероятная рибонуклеаза 11	MANSC-доменсодержащий белок 1	Белок 7А, подобный метилтрансферазе
Гепсидин	Вероятная карбоксипептидаза X1	Липокалин-15	NL3
Клото	Белок FAM3D	Арилсульфатаза I	N-ацетилтрансфераза 15
Серглицин	Хемокин 14 с C-X-C-мотивом	Белок-кандидат 2 развития мезодермы	Эфрин-A4
Томорегулин-2	Бета-дефензин 127	Discorpf-родственный белок 1	Белок Plunc
Хордин-подобный белок 2	Бета-дефензин 129	Подокан	Калликреин-11
Член 6В надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Секреторный белок 2, богатый цистеином, содержащий LCCL-домен	Белок 1, содержащий домен фибронектина III типа	Вариант сплайсинга х секретрируемого белка 1, индуцируемого WNT1 (фрагмент)
Трансмембранный белок UPF0414, C20orf30	Фактор роста фибробластов 21	Нейротримин	Член 10 семейства интерлейкина-1
Член С семейства 4 белков с доменом лектина С-типа	Плазматическая альфа-L-фукозидаза	Обонятельный рецептор 10W1	PLA2G2D
Белок UPF0317, C14orf159, митохондриальный	Гастрокин-1	Белок PARM-1	Протеогликан 3
Нетрин-G2	Гастрокин-2	PDZ-доменсодержащий белок 2	Инсулиноподобный пептид INSL5
Металлоредуктаза STEAP2	Глутатионпероксидаза 7	Прозепирегулин	Ольфактомедин-подобный белок 3
Sushi-доменсодержащий белок 4	HNIP-подобный белок 1	Аналог 1 белка 1 поликистоза почек	Внеклеточный гликопротеин лакритин
Белок YIF1B	Интерферон каппа	WLP1514	Ретинолдегидрогеназа 13
Аполипопротеин М	Аполипопротеин С-I	Металлопротеиназа-26 матрикса	Дефензин 3 нейтрофилов
Бета-цепь C4b-связывающего белка	Энхансер 2 проколлаген С-эндопептидазы	RELТ-подобный белок 2	GLGQ5807
Бета-цепь гликопротеина CD8 поверхности Т-клеток	Фактор 1 определения левой и правой сторон	Член Е3 семейства 35 переносчиков растворенных веществ	TUFT1
Аналог 1 хемокина 3 с C-C-мотивом	Член 4 LGI-семейства белков, содержащих повтор, богатый лейцином	Транспортер цинка ZIP9	DRLV8200
Фактор роста фибробластов 8	AbraXas-субъединица комплекса BRCA1-A	Нозлин-2	IDLW5808
Коровый белок 24 сиаломуцина	Белок 2, содержащий домен лейциновой "молнии"	Seizure 6-подобный белок 2	UBAP2
Лиганд 2 фактора 1 запрограммированной гибели клеток	Нейрексофилин-3	Семафорин-3А	C1q/ФНО-родственный белок 8
Секретрируемый и трансмембранный белок 1	Остеомодулин	Семафорин-4С	KIR2DL4 (Фрагмент)
Белок 6, родственный комплексу C1q и фактору некроза опухолей	Белок 1, содержащий домен ингибитора сериновых протеаз типа Kazal	Белок 14А, содержащий абгидролазный домен	Вариант 2 транскрипта надсемейства 2 хемокин-подобных факторов
Аналог 3 рецептора мушиноподобного гормона, содержащего ЭФР-подобный модуль	Белок 3, ассоциированный с мембраной акросомы сперматозоида	Белок 36, содержащий домен ангиринового повтора	Трансмембранный белок 1, ассоциированный с кератиоцитами
Нозлин-3	Член 1 семейства 3А секретоглобина	Белок shisa-4	GKGM353
Одорант-связывающий белок 2b	Цукусин	Нейромедин-U	MATL2963



Уротензин-2	Клаудин-2 (SP82)	Гомолог noda1	NINP6167
Витрин	Белок 2, родственный фактору комплемента Н	Синаптогирин-2	Аналог POM121
Белок 3 сигнального пути, индуцируемого WNT1	Белок надсемейства иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор	Белок 2, подобный белку 2, ассоциированному с ингибитором 1 ангиогенеза, специфическим для головного мозга	RTFV9368 (фактор 1 SLE-зависимой стимуляции)
кДНК FLJ75759, характеризующаяся высокой степенью сходства с фоллистатин-подобным белком 3 (секретируемым гликопротеином) (FSTL3) Homo sapiens, мРНК	Белок 1, взаимодействующий с рецептором пого, содержащим богатый лейцином повтор и иммуноглобулиноподобный домен	Белок 104, содержащий суперспирализованный домен	Белок 4, взаимодействующий с рецептором пого, содержащим богатый лейцином повтор и иммуноглобулиноподобный домен
Антиотензинпревращающий фермент 2	Аналог IRRE-подобного белка 3	Член 20 семейства 4 L6 трансмембранных белков	KCNQ2
Адипонектин	Переносчик сигнала гемопоэтических клеток	Трансмембранный белок 107	ELCV5929
Антиопозтин-связанный белок 4	Бета-субъединица фоллитропина	Трансмембранный белок 143	KVVM3106
Аполипопротеин А-V	Белок 3 ингибиторной активности меланомы	Трансмембранный белок 178	ISPF6484
Аспорин	Белок 4, содержащий повтор, богатый лейцином	Трансмембранный белок 205	LKNP9428
Бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость клеточной мембраны	Транспортер цинка 5	Трансмембранный белок 41A	VNFT9373
CUB-доменсодержащий белок 1	Белок нейронов 1, содержащий богатый лейцином повтор	Трансмембранный белок 50A	ACAH3104
Белок 1 промежуточного слоя хряща	Апикальный эндосомный гликопротеин	Трансмембранный белок 50B	RVLA1944
Бета-Ala-His-дипептидаза	Белок сывороточного амилоида А-4	Интерлейкин-28B	Wper3002
Альфа-1 (V) -цепь коллагена	Пробетацеллуклин	Пентраксин-2 нейронов	ZDHC11
Альфа-1 (XV) -цепь коллагена	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 7	Коллектрин	AGLW2560
Эстрадиол-17-бета-дегидрогеназа 11	3-гидроксibuтиратдегидрогеназа 2 типа	Трансмембранный белок 92	TSSP3028
член 10 подсемейства C гомологов DnaJ	C1GALT1-специфичный шаперон 1	Трансмембранный белок 95	RFVG5814
Белок 6, содержащий ЭФР-подобный домен	Бета-казеин	Трансмембранный белок 9B	SHSS3124
Цепь А фактора свертывания крови XIII	Каппа-казеин	Вероятная карбоксипептидаза PM20D1	MMP19
Глюкозо-6-фосфатизомераза	Трансмембранный белок C2orf18	Тетраспанин-12	GSQS6193
Аппетит-регулирующий гормон	Каталитическая цепь карбоксипептидазы N	Тетраспанин-13	VGPW2523
Бета-субъединица интерлейкина-12	Антиген CD320	Тетраспанин-15	LMNE6487
Интерлейкин-22	Хондроитинсульфатсинтаза 1	Трансмембранный белок UPF0513	ALLA2487
Интеллектин-1	Хондроитинсульфатсинтаза 2	Митохондриальный разобщающий белок 4	GALI1870
Глиома-инактивируемый белок 1, богатый лейцином	Молекула 7, подобная CMRF35	Полисераза-2	FRSS1829
Лимфоцитарный антиген 96	Гомолог 3 белка сапору	Вероятная пальмитоилтрансфераза ZDHC24	MRSS6228
Матрилизин	Короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза 3	Белок 1 вителлинового слоя, связывающий сперматозоиды	GRPR5811
Муцин-20	Дельта-подобный белок 4	Белок 2 вителлинового слоя, связывающий сперматозоиды	AVLL5809
Пропотеинкиназа субтилизин/кексин типа 9	Рецептор, родственный эпидермальному фактору роста, подобный белкам дельта и Notch	Субъединица 7 консервативного олигомерного комплекса Гольджи	C-концевой экзон CR1 C3b/C4b рецептора SCR9 (или 16); SCR = короткий консенсусный повтор
Пептидогликан-распознающий белок	Долихолкиназа	Белок 2 рецептора адипонектина	PIKR2786
Интерферон-индуцируемый 17-кДа белок	Аналог 1 эндотелин-превращающего фермента	Бета C-цепь ингибина	Аналог 3 S100-кальций-связывающего белка A7
Белок Wnt-4	Интегральный мембранный белок 2B	Врорин	GTWW5826 (белок LP5085)
Аналог фактора воспаления аллотрансплантата 1	Белок 5, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Семафорин-3C	KTIS8219 (HCG2020043)
X-сцепленный белок 3, содержащий повтор atmadillo	Молекула адгезии, селективная для эндотелиальных клеток	Гепарансульфатглюкозамин-3-О-сульфотрансфераза 2	Белок 4 связи гиалуронана и протеогликана
Хондроитинсульфат-N-1-ацетилгалактозаминил-трансфераза	Белок 1, содержащий домены сигнального пептида, CUB и ЭФР-подобный домен	Аналог 1 перекрывающегося транскрипта рецептора лептина	Микроновел

Хитотриозидаза-1	Белок 3, родственный фактору комплемента Н	SPARC-подобный белок 1	SAMK3000
Белок 1, содержащий домен клаудина	Прорелаксин Н1	Фибулин-7	VFL3057
Эрлин-2	Фоллистатин-родственный белок 1	Гомолог 1 белка HEG	CVWG5837
Белок 8, содержащий домен гликозилтрансферазы 1	Глобозид-альфа-1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1	Белок 1, содержащий домен фибриногена С	VGSA5840
Белок 1 мембраны комплекса Гольджи	Гамма-глутамилгидролаза	Член А фосфолипазы А1	GHPS3125
Вероятный рецептор 125, сопряженный с G-белком	Кадгерин-24	Основной богатый пролином белок 2 слюны	GRTR3118
Альфа-цепь рецептора интерлейкина-20	Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза 3	Белок 6, ассоциированный со сперматогенезом	PAMP6501
Галектин-7	Рецептор 56, сопряженный с G-белком	Белок SRPX2, содержащий повтор sushi	LTLL9335
Лиганд 4 NKG2D	Гиалуронан-связывающий белок 2	Гомолог 1 белка переключенной гастрюляции	VCEW9374
Оксидаза L-аминокислот	Гепаринсвязывающий ЭФР-подобный фактор роста	Торсин-1В	AHPA9419
Пролил-3-гидроксилаза 1	Гликопротеин, богатый тистидином	Белок Wnt-5a	MDHV1887
GPI-этаноламинфосфаттрансфераза 2	Карбогидратсульфотрансфераза 14	Акрозин-связывающий белок	HSAL5836
GPI-этаноламинфосфаттрансфераза 3	Бета-цепь рецептора интерлейкина-20	Член В семейства 18 белков с доменом лектина С-типа	LHLC1946
Кальций-связывающий митохондриальный белок-переносчик SCaMC-2 (Малый кальций-связывающий митохондриальный белок-переносчик 2)	Член 3 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы	Трансмембранный белок 4A, ассоциированный с лизосомами	Белок 3, ассоциированный с карциномой неба, легких и носового эпителия (лиганд-связывающий белок RYA3)
Белок A2, ассоциированный с сурфактантом легких	Белок 7, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Семафорин-3Е	LPPA601
Фактор сплайсинга 16, богатый аргинином/серином	Каллистатин	Амелобластин	PINK1
Альфа-N-ацетилгалактозамин-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 6	Белок 3В, содержащий домен фибронектина III типа	Белок 5, содержащий MFS-домен	SERH2790
Рецептор, родственный IL-1 одиночного Ig	Рецептор ингибиторного фактора лейкоза	Антипоэтин-1	FLFF9364
Тектоник-3	Гомолог В Lin-7	Антипоэтин-4	Апелин
Член 11 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Трансмембранный белок 1, родственный тиоредоксину	Белок 9, содержащий несколько ЭФР-подобных доменов	GLSH6409
Член 19 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Белок 32, содержащий домен дезинтегрина и металлопротеиназы	Фосфодиэстераза 3a, подобная кислой синтомиелиназе	SFVP2550
Пальмитилтрансфераза 2DHC9	Белок 3, содержащий Ly6/PLAUR-домен	ADAMTS-подобный белок 5	RRLF9220
Фибулин-5	Член А семейства 14 белков с доменом лектина С-типа	Спексин	PTML5838
Белок Z-зависимый ингибитор протеаз	Гомолог белка cornichon	Предполагаемый трипсин-6	VLGN1945
Альфа-2-макроглобулин	Белок FAM151A	Белок-протоонкоген Wnt-1	AVPC1948
Агути-связанный белок	FK506-связывающий белок 14	Костный морфогенетический белок 3b	AWQG2491
Панкреатическая альфа-амилаза	Нейрофилин- и толлоид-подобный белок 2	Костный морфогенетический белок 5	PSVL6168
Натрийуретические пептиды В	Протокадгерин бета-13	Костный морфогенетический белок 8В	LCII3035
Предсердный натрийуретический фактор	Пренилцистеиноксидаза 1	Белок FAM26D	PPRR6495
Нейтральная церамидаза	Нефлин	C1q-родственный фактор	RLSC6348
Бета-2-микроглобулин	Аналог 1 пептидилпролил-цис-транс-изомеразы	Белок 1, содержащий коровий домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	CSRP2BP
Костный морфогенетический белок 4	Антиген стволовых клеток предстательной железы	Церебеллин-1	GLLV3061
Биотинидаза	Гомолог 2 белка patched	Карбоксипептидаза 0	GWSI6489
Белок M130 фагоцитарного рецептора, богатый цистеином, типа 1	Хитобиозилфосфодолихол-бета-маннозилтрансфераза	Белок 2, подобный миелиновому белку zero (эпителиальный V-подобный антиген 1)	кДНК FLJ53955, характеризующаяся высокой степенью сходства с секретиремым белком 4, связанным с ожогами
Карбоксипептидаза В2	Гомолог 1 белка SEL-1	Белок 1, подобный сериновой протеазе 1	PPIF

Карбоксипептидаза Z	ProSAAS	Белок 70, содержащий суперспирализованный домен	VSSW1971
Хемокин 5 с C-C-мотивом	Лектин 9, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту	Хемокин 28 с C-C-мотивом	KLIA6249
Хемокин 7 с C-C-мотивом	SLIT и NTRK-подобный белок 1	Неохарактеризованный белок C4orf29	ALLW1950
Хемокин 8 с C-C-мотивом	Статгерин	CUB-доменсодержащий белок 2	GVEI466
Гликопротеин CD59	Тестизин	Белок Трем-подобного транскрипта 4	ESFI5812
Фактор комплемента I	Белок 5, подобный трансмембранному каналу	Неохарактеризованный белок C6orf58	GNNC2999
Кластерин	Трансмембранная сериновая протеаза 4	Хондроадгерин	AAGG6488
Альфа-2 (I) -цепь коллагена	Супрессор метастазов KISS-1	Белок 2 промежуточного слоя хряща	NHSL751
Альфа-1 (III) -цепь коллагена	Островковый амилоидный полипептид	Неохарактеризованный белок C10orf25	Бета-дефензин 108B
Альфа-1 (IV) -цепь коллагена	Белок Трем-подобного транскрипта 2	Истмин-1	Бета-дефензин 118
Альфа-3 (IV) -цепь коллагена	Белок 12, содержащий домен тиоредоксина	Цистатин-8	Бета-дефензин 124
Альфа-5 (IV) -цепь коллагена	Фактор роста эндотелия сосудов B	Кардиотрофин-1 (CT-1)	Бета-дефензин 125
Альфа-3 (VI) -цепь коллагена	Фактор роста эндотелия сосудов C	Химотрипсिनоген B	Бета-дефензин 126
Компонент комплемента C6	Ретикулокалбин-3	Хемокин 9 с C-X-C-мотивом	Аналог 2 дезоксирибонуклеазы 1
Альфа-1 (IX) -цепь коллагена	Фибриллин-1	Хемокин 13 с C-X-C-мотивом	Станниокальцин-2
Альфа-1 (X) -цепь коллагена	Белок FAM3A	Эмили-3	Молекула 1, специфическая для эндотелиальных клеток
Альфа-1 (XVII) -цепь коллагена	Белок G7c	Секретагогин	Карбоксилэстераза 7
Альфа-1 (XXI) -цепь коллагена	Нейрофилин- и толлоид-подобный белок 1	Секреторный белок E3-альфа эпидидимиса	Гомолог белка NOV
Альфа-субъединица коагомера	Бета-1-гликопротеин 11, специфический для беременности	Эпификан	Белок UPF0528, FAM172A
Рецептор комплемента 1 типа	Серпин B4	Белок FAM5C	Бета-субъединица интерлейкина-27
Цистатин-SN	ADAM DEC1	Фактор роста фибробластов 20	Белок FAM3C
Дезоксирибонуклеаза-1	АДФ-зависимая глюкокиназа	Белок 3, связывающий фактор роста фибробластов	Белок 1, подобный фактору 2 клеток стромы
Белок 1 внеклеточного матрикса	Альфа-амилаза 2B	Трансмембранный белок 204	Член A1 подсемейства 1 бутирофилина
Рецептор III-A Fc-области гамма-иммуноглобулина с низким сродством	UDP-GlcNAc:betaGal-бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 3	Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 4	Трансмембранный белок 2, ассоциированный с кератиноцитами
Альфа-фетопроtein	Пептид 2, связанный с геном кальцитонина	Фактор свертывания крови V	Fc-рецептор иммуноглобулина альфа
Гепаринсвязывающий фактор роста 2	Карбоксипептидаза E	Фактор свертывания VII	Эмили-2
Гамма-цепь фибриногена	Кардиотрофин-подобный фактор цитокина 1	Про-МСН	Рецептор 10 эфрина типа А
Фактор роста/дифференцировки 5	Альфа-2 (VIII) -цепь коллагена	Гамма-рецептор фолата	Аналог 2 экзостозина
Нейротрофический фактор линии глиальных клеток	Гомолог 2 crumbs	Муцин-7	Фоллистатин-родственный белок 4
Белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Кислый фосфопротеин 1 матрикса дентина	Галанин-подобный пептид	Фоллистатин-родственный белок 5
Инсулиноподобный фактор роста 1A	Молекула клеточной адгезии синдрома Дауна	Гемисцентин-1	Трансмембранный белок 66
Область С гамма-1-цепи иммуноглобулина	Член 1 надсемейства иммуноглобулинов	Интерлейкин-6	Фактор роста/дифференцировки 2
Область С гамма-2-цепи иммуноглобулина	Интерлейкин-4	Фактор 1 эмбрионального роста/дифференцировки	Рецептор альфа-4 семейства GDNF
Область С гамма-3-цепи иммуноглобулина	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-6	Интерлейкин-8	Область С гамма-4-цепи иммуноглобулина
Аналог 3 инсулина	Интерлейкин-24	Гремлин-2	Лимфоцитарный антиген 86
Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина	Ладинин-1	Стромелизин-2	Бета Е-цепь ингибина
Белок UPF0378, KIAA0100	Липаза I	Вероятный рецептор 171, сопряженный с G-белком	Белок 1C, содержащий GRAM домен
Кининоген-1	Белок 1, родственник панкреатической липазе	Паппализин-2	Интерферон альфа-10
Субъединица альфа-2 ламинина	Альфа-2-гликопротеин, богатый лейцином	Гликопротеин 4, ассоциированный с микрофибриллами	Интерферон альфа-16
Субъединица альфа-4 ламинина	Белок 5, ассоциированный с ремоделированием матрикса	Нейромедин-В	Интерферон альфа-6
Бета-1-субъединица ламинина	Нетрин-4	Мимекан	Член 21 надсемейства иммуноглобулинов
Протеинлизиноксидаза 6	Рецептор фактора роста гепатоцитов	Металлопротеиназа-19 матрикса	Агрин
Мультимерин-1	Хемокин 22 с C-C-мотивом	Интерлейкин-11	Пролактин

Вазопрессин-нейрофизин 2-копептин	Никталолин	Интерлейкин-17А	Келч-подобный белок 11
Нидоген-1	Остеокальцин	Интерлейкин-18	Белок Wnt-16
Фосфолипаза A2	Основной богатый пролином белок 3 слюны	Интерлейкин-26	Пропердин
Перфорин-1	Бета-1-гликопротеин 10, специфический для беременности	Интерлейкин-28А	Калликреин-13
Фосфатидилинозитглицан-специфическая фосфолипаза D	Трансмембранный белок FLRT2, содержащий богатый лейцином повтор	Белок 3, содержащий трансмембранный домен emp24	1-ацил-sn-глицерин-3-фосфатацилтрансфераза дельта
Фиброистин	R-спондин-3	Интерлейкин-29	Калликреин-9
Белок транспорта фосфолипидов	Сиалоадгезин	Инсулиноподобный пептид INSL6	Витамин K-зависимый белок S
Кислая фосфатаза предстательной железы	Трипсин-3	Белок Wnt-2b	Бутирофилин-подобный белок 8
Витамин K-зависимый белок Z	Дипептидаза 2	Бета-1-гликопротеин 1, специфический для беременности	Бета-4-субъединица ламинина
Кислый богатый пролином фосфопроtein 1/2 слюны	Белок 1, содержащий коллаген- и кальций-связывающий домен ЭФР	Белок 4, ассоциированный с мембраной акросомы сперматозоида	Рецептор гиалуроновой кислоты эндотелия лимфатических сосудов 1
Белок зоны беременности	Белок, подобный гену 1, специфическому для зародышевых клеток	Гамма-3-субъединица ламинина	Цистатин-SA
Прорелаксин H2	Белок 31, содержащий повтор, богатый лейцином	Гомолог 3 лизилоксидазы	Трансмембранный белок 59
Семафорин-4D	Аполипопротеин O	Нейротензин/нейромедин N	Аполипопротеин (a) - подобный белок 2
Белок гомолога 2 Slit	Дистроглицан	МAM доменсодержащий белок 2	Лизоцим-подобный белок 2
Альфа-текторин	Дефензин 4 нейтрофилов	Белок 2, ассоциированный с микрофибриллами	Лизоцим-подобный белок 4
Тенасцин-X	Амфотерин-индуцируемый белок 3	Белок 2 ингибиторной активности меланомы	Рилин
Фактор "трилистника" 3	Субъединица APN-1B гамма-секретазы	Металлопротеиназа-24 матрикса	Ретинол-связывающий белок 4
Белок 1 рецептора трансферрина	Аполипопротеин C-IV	Металлопротеиназа-25 матрикса	Карбоангидраза 14
Предшественник трансформирующего фактора роста альфа	Арилсульфатаза G	Нетрин-1	Антиген тубулоинтерстициального нефрита
Трансформирующий фактор роста бета-2	Фактор активации глии	Нетрин-3	Нейропептид W
Член 6 надсемейства лигандов фактора некроза опухолей	Белок 18, содержащий домен рекрутинга каспазы	Альфа-N-ацетилгалактозамин-альфа-2, 6-сиалилтрансфераза 1	Альфа-1, 3-маннозилгликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминил-трансфераза B
Член 1B надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Гепарансульфатглюкозамин-3-O-сульфотрансфераза 3A1	Альфа-N-ацетилгалактозамин-альфа-2, 6-сиалилтрансфераза 3	Белок 5, содержащий трансмембранный домен emp24
Член 5 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Эктофермент, разрушающий рилизинг-гормон тиреотропина	Белок-регулятор роста меланомного происхождения	Белок 3, родственный компоненту C1q и фактору некроза опухолей
Тромбопоэтин	Гуанилин	FMRГамид-родственные пептиды	Подокан-подобный белок 1
Пептиды VIP	Белок 3, подобный переносчику холина	Отоконин-90	Бета-1-гликопротеин 5, специфический для беременности
Кислая хитиназа млекопитающих	17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 14	Нейртулин	Кератокан
Секреторный белок 2, богатый цистеином	Полипептид 1, подобный иммуноглобулину лямбда	Нейрексофилин-1	Секреторная фосфолипаза A2 группы IIE
Гаптоглобин-родственный белок	Член 14 подсемейства B гомологов DnaJ	Нейрексофилин-2	Фактор 2 определения левой и правой сторон
Хемокин 26 с C-C-мотивом	Белок 8, содержащий только F-box	Вариант тромбоцитарного фактора 4	Лиганд 2 NKG2D
Коллектин-11	Фибролейкин	Ноцицептин	Металлоэстераза макрофагов
Белок 2 с ЭФР-подобным доменом, богатый цистеином	Метионин-R-сульфоксидредуктаза B3, митохондриальная	Белок 1, содержащий V-набор и трансмембранный домен	Иницирующий рецептор 1, экспрессирующийся на миелоидных клетках
Хемокин 16 с C-X-C-мотивом	Член 2 LIG-семейства белков, содержащих повтор, богатый лейцином	Белок 4, богатый пролином	Фактор 1, подобный рецептору цитокинов
Белок 1, связывающий фактор роста фибробластов	Белок транспорта везикул GOT1B	Рилизинг-пептид пролактина	Секретин
Член 5 семейства интерлейкина-1	Интегральный мембранный белок GPR177	Сериновая протеаза 33	Фактор клеток стромы 2
Член 9 семейства интерлейкина-1	Вероятный рецептор 78, сопряженный с G-белком	Бета-1-гликопротеин 8, специфический для беременности	Лизоцим-подобный белок 6
Калликреин-5	Член 2 семейства NEPACAM	Ретбиндин	Серпин A9
Матрилин-2	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-27	FMRГамид-родственные пептиды	Белок 1, содержащий домен склеростина
Рецептор 1 гликопротеина клеточной поверхности CD200	Проэнкефалин-A	Рибонуклеаза K6	Лизокардиофилинацил-трансфераза 1

Фосфатаза лизосомальной кислоты 6 типа	Интегрин альфа-10	Рибонуклеаза T2	Плазматическая глутаматкарбокси- пептидаза
Фактор обмена нуклеотидов SIII	КТЕL-мотивсодержащий белок 1	Репетин	Белок гомолога 3 Slit
Белок 4, содержащий домен тромбоспондина 1 типа	Член 5 подсемейства А иммуноглобулиноподобных рецепторов лейкоцитов	Белок, подобный субкомпоненту комплемента C1r	Белок 8, содержащий домен альфа-2- макроглобулина, подобного C3 и P2P
Белок 2 сигнального пути, индуцируемого WNT1	Белок 3, содержащий богатый лейцином повтор и домен фибронектина III типа	Неохарактеризованная гликозилтрансфераза AER61	Белок 2, реагирующий на рецептор ретиновой кислоты
Бромодоменсодержащий белок 9	Утероглобин	Семафорин-3G	Кислый белок 1 хряща
CD99 антиген-подобный белок 2	Лиганд нетрина-G1	Член 1 семейства 1C секретоглобина	Станниокальцин-1
Неохарактеризованный белок Clorf159	Паннексин-1	Член 1 семейства 1D секретоглобина	Бета-текторин
Карбогидратсульфотрансф ераза 12	Протокадгерин-12	Член 2 семейства 1D секретоглобина	Фактор 3 постприсоединения GPI к белкам
Вероятная серинкарбоксипептидаза CPVL	Протокадгерин альфа-10	Серпин A12	Белок гена 1, специфического для зародышевых клеток
Муцин-3А	Протокадгерин бета-10	Серпин I2	Рецептор интерлейкина- 21
Белок 1, содержащий аналог домена CUB и вителлинового слоя	Трансмембранный белок 1, ассоциированный с остеопетрозом	Белок, содержащий домены фактора Виллебранда C и ЭФР	Белок 4, содержащий V- набор и иммуноглобулиновый домен
Полипептид-N- ацетилгалактозамин- трансфераза 14	Бета-галактозид-альфа- 2, 6-сиалилтрансфераза 1	Белок 15, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок группы В фагоцититарных рецепторов, содержащих домен, богатый цистеином
Галектин-9	Компонент PIG-S GPI- трансамидазы	Бета-2-субъединица натриевого канала	Протиреолиберин
Белок 17, содержащий повтор, богатый лейцином	Трансмембранный белок 3, богатый пролином	Ингибитор металлопротеиназ 4	Семафорин-4А
Белок нейронов 2, содержащий богатый лейцином повтор	Сульфгидрилоксидаза 2	Т-клеточный иммуномодулирующий белок	
Бифункциональная гепарансульфат-N- деацетилаза/N- сульфотрансфераза 3	Белок 16, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок 10, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Член 27 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей
Туфтелин	SH2-доменсодержащий белок 3А	Лимфопэтин стромы тимуса	Toll-подобный рецептор 7
Митохондриальный белок- переносчик головного мозга	SHC-превращающий белок 4	Трансмембранный белок 130	
Белок 3, содержащий домены сигнального пептида, CUB и ЭФР- подобный домен	Белок 23, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Уникальный белок, ассоциированный с матриксом хряща	Белок 16, содержащий домен тиоредоксина
14-3-3 белок сигма	Трансдуцин бета-подобный белок 2	Урокортин-2	Альфа-2-антиплазмин
Альфа-1-кислый гликопротеин 1	Белок 10, содержащий домен tudor	Урокортин-3	Белок 3, содержащий коровый домен кислого белка молочной сыроватки с четырьмя дисульфидными связями
Альфа-1-кислый гликопротеин 2	Член 3 надсемейства 9 трансмембранных белков	Белок AMBP	Белок WFDC9
Белок 1, содержащий домен фактора Виллебранда А	Белок, содержащий домены фактора Виллебранда D и ЭФР	Аналог белка 9, родственного комплементу C1q и фактору некроза опухолей	Белок 14, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином
Белок 9, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Белок 17, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок 88, связанный с ингибированием роста и дифференцировкой	Белок, ассоциированный с плазматической мембраной адипоцитов
Ангиотензиноген	Белок 2, подобный трансмембранному каналу	Белок Wnt-10a	Гомолог пероксидазы
Аполипопротеин А-II (ApoA-II) (ApoA-II)	Бета-1-гликопротеин 3, специфический для беременности	Белок Wnt-3a	Гомолог белка прогрессирующего анкилоза
Аполипопротеин А-IV (ApoA-IV) (ApoA-IV)	Теномодулин	Белок-протоонкоген Wnt-3	Хитиназа-3-подобный белок 1
Аполипопротеин С-II (ApoC-II) (ApoC-II)	Тетраспанин-6	Белок Wnt-6	Белок UPF0672, CXorf36
Бета-2-гликопротеин 1	Белок 5, содержащий домен тиоредоксина	Белок Wnt-9a	Арилсульфатаза J
Апоптоз-связанный белок 3	Фактор роста эндотелия сосудов D	Цитокин SCM-1 бета	Кортистатин
Бета-секретаза 2	Бета-1-гликопротеин 9, специфический для беременности	Мембранный белок 16 зимогенных гранул	Церулоплазмин
Тканевая трансфераза системы групп крови АВО	Семафорин-3F	Белок 1, связывающий вителлиновый слой	Ангиопэтин-связанный белок 5
Катепсин L2	Белок 2, подобный кислой фосфатазе	Гомолог белка 3 переднего градиента	Белок 126, содержащий суперспирализованный домен
Хемокин 3 с C-C-мотивом	Аналог аполипопротеина 0	Амелотин	Антиген CD177

Член В семейства 1 белков с доменом лектина С-типа	Бета-дефензин 119	Неохарактеризованный белок C5orf46	Гомолог 4 белка сапору
Регулятор 1 кальций-активируемого хлоридного канала	Белок 12, содержащий мотивы дезинтегина и металлопротеиназы с тромбоспонином	Неохарактеризованная протейкиназа 1, содержащая aarF-домен	Белок C4orf31, содержащий домен фибронектина III типа
Химаза	Белок FAM131A	Драксин	Белок FAM180A
Альфа-1 (VI)-цепь коллагена	Белок FAM3B	Фактор роста фибробластов 18	Основной белок тромбоцитов
Альфа-цепь компонента комплемента C8	Бета-галактозидаза-1-подобный белок	Хемокин 11 с C-X-C-мотивом	Интерферон эписилон
Компонент комплемента C9	Лизоцим g-подобный белок 1	Белок 6, содержащий Ly6/PLAUR-домен	Интеллектин-2
Белок 2, содержащий домен глюкоза/фруктоза-оксидоредуктазы	Белок, подобный тяжелой цепи H5 ингибитора интер-альфа-трипсина	Член 1 семейства химотрипсин-подобной эластазы	Альфа-1,3-маннозил-гликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза A
Член 11 подсемейства В гомологов DnaJ	Белок 5, ассоциированный с акросомой сперматозоида	Рецептор эритропоэтина	Фосфогликопротеин внеклеточного матрикса
Член 7 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы	Белок 2, взаимодействующий с рецептором пого, содержащим богатый лейцином повтор и иммуноглобулиноподобный домен	Белок 2 гликозилфосфатидилинозитного якоря, содержащий MAM-домен	кДНК FLJ77863, характеризующаяся высокой степенью сходства с секреторируемым и трансмембранным белком 1 (SECTM1) Homo sapiens, mRNK
Аминопептидаза эндоплазматического ретикула 1	Белок 2, ассоциированный с сурфактантом	Металлопротеиназа-27 матрикса	Липокалин-6, специфический для эпидидимиса
Рецепторная тирозинпротеинкиназа erbB-3	Белок 1 рецептора адипонектина	Неактивная сериновая протеаза 35	Афафин
Резидентный белок эндоплазматического ретикула ERp44	Белок 6, содержащий несколько ЭФР-подобных доменов	Белок 134, содержащий суперспирализованный домен	Вероятная катион-транспортная АТФаза 13A5
IgGFC-связывающий белок	Нейроэндокринный белок 7B2	Супрабазин	Глутатионпероксидаза 3
Белок 1, родственник фактору комплемента Н	Альфа-1В-гликопротеин	Член 4 семейства 1D секретоглобина	Клаудин-18
Полипептид-N-ацетилгалактозаминтрансфераза 2	Белок 2, содержащий домены WAP, Kazal, иммуноглобулина, Кунитца и NTR	Белок 2A, содержащий V-набор и трансмембранный домен	Предполагаемый белок KIR3DP1, подобный иммуноглобулиноподобному у рецептору киллеров
Гемопексин	Аналог 1 арилацетамиддеацетилазы	ADM	Рецептор секреторной фосфолипазы A2
Активатор фактора роста гепатоцитов	Гистатин-3	Неохарактеризованный белок C2orf82	Гаптоглобин
Белок гена, родственного главному комплексу гистосовместимости I класса	Пронейрегулин-3, мембранносвязанная изоформа	Член 1 семейства инсулиноподобного фактора роста	Молекула клеточной адгезии 20, связанная с раковым эмбриональным антигеном
Белок 6, связывающий инсулиноподобный фактор роста	Агути-сигнальный белок	Кадгерин-подобный белок 29	Костный морфогенетический белок 3
Область С дельта-цепи иммуноглобулина	Клаудин-8	Костный морфогенетический белок 15	Антиген 2 стромы костного мозга
Интерлейкин-1 бета	Белок UPF0454, C12orf49	Плазматический ингибитор сериновых протеаз	Цитохром P450 20A1
Белок 10, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности	Белок 5B1, содержащий домен фактора Виллебранда A	Молекула клеточной адгезии 21, связанная с раковым эмбриональным антигеном	Аналог 3 белка, усиливающего бактерицидные свойства/проницаемость
Соединительная молекула адгезии С	Кадгерин-6	Альфа-лактальбумин	Гомолог 2 белка dpy-19
Неохарактеризованный белок KIAA0319	Антимикробный пептид кателицидин	Белок когезии сестринских хроматид RCC1	Секреторная фосфолипаза A2 группы IIF
Субъединица альфа-5 ламинина	Субъединица гамма-1 ламинина	Галектин-3-связывающий белок	Карбоксипептидаза В
Белок 4, содержащий домен фибронектина III типа	Член 7B SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Белок 1, содержащий домен тяжелой цепи динеина	Белок 8, содержащий домен гликозилтрансферазы 2
Липопротеинлипаза	Хемокин 16 с C-C-мотивом	Хемокин 17 с C-C-мотивом	Белок FAM19A1
Интерстициальная коллагеназа	Хемокин 24 с C-C-мотивом	Редуктаза 1 жирных ацил-CoA	Аналог альфа-рецептора семейства GDNF
Матриксная металлопротеиназа 9	Белок C7orf27, содержащий повтор HEAT	Гомолог фактора инициации зачатка передних конечностей	Вероятно, глутатионпероксидаза 8
Муцин-16	Альфа-2 (IX)-цепь коллагена	Рецептор полимерного иммуноглобулина	Цистатин-D
Муцин-2	Альфа-3 (IX)-цепь коллагена	Прион-подобный белок doppe1	Цистатин-F
Муцин-5B	Колипаза	Хемокин 6 с C-X-C-мотивом	Ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов
Миоцилин	Альфа-1 (XXVII)-цепь коллагена	Хемокин 10 с C-X-C-мотивом	Белок плазмы А, ассоциированный с беременностью

Рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности 1	Субъединица 2 карбоксипептидазы N	Бета-дефензин 1	Член 12 семейства 22 переносчиков растворенных веществ
Белок гена 1, сверхэкспрессируемого в опухоли предстательной железы	Трансмембранный белок нейронов 4, содержащий богатый лейцином повтор	Белок 2 связи гиалуронана и протеогликана	Аналог 1 хорионического соматомаммотропина
Серин/треониновая протеинкиназа 2, взаимодействующая с рецептором	Белок 1, содержащий повтор тройной спирали коллагена	Белок 30, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Регуляторный белок динамики микротрубочек 3
Равновесный транспортер нуклеозидов 3	Эндотелин-2	Супрессор гомолога fused	Ретинолдегидрогеназа 14
Селенопротеин P	Фибромодулин	Рецептор бета фолата	Галанин
Белок D, ассоциированный с сурфактантом легких	Аналог B Fc-рецептора	Внеклеточная сульфатаза Sulf-2	Транскабаламин-2
Гомолог белка гена 6, стимулируемого ретиновой кислотой	Белок Clorf124, содержащий домен цинкового пальца RAD18	Член 14 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	Белок 1, содержащий домен катехол-О-метилтрансферазы
Фактор "трилистника" 1	Фактор роста/дифференцировки 15	Артемин	Трипептидилпептидаза 1
Ингибитор 2 пути тканевого фактора	Глиальный нексин	Альфа-1 (XII)-цепь коллагена	Белок Trem-подобного транскрипта 1
Протромбин	Прогоннадолиберин-1	Альфа-1 (XIV)-цепь коллагена	Активатор 2B гуанилатциклазы
Toll-подобный рецептор 9	Гранзим K	Бета-дефензин 2	Индукционный T-клеточный костимулятор
Молекула межклеточной адгезии 4	Интерферон альфа-17	Интерлейкин-21	
Интерлейкин-19	Интерферон альфа-21	Интерлейкин-3	
Истмин-2	Интерферон альфа-8	Интерлейкин-7	Белок, подобный N-концевому домену гомолога 2 Notch
Аналог IRRE-подобного белка 1	Интерферон омега-1	Альфа-цепь ингибина	Субъединица бета-2 ламинина
Калликреин-10	Ранний инсулиноподобный пептид плаценты	Субъединица альфа-3 ламинина	Нейропиплин-2
Белок 4, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета	Белок 1, содержащий домены ЭФР, латрофилина и семь трансмембранных доменов	Член SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз на X-хромосоме	ЭФР-содержащий фибулин-подобный белок 1 внеклеточного матрикса
Парный иммуноглобулиноподобный рецептор альфа 2 типа	Белок 1, содержащий домены фибронектина 3 типа и анкиринового повтора	Регулятор ионного транспорта 6, содержащий FXYD-домен	Рецепторная тирозинпротеинфосфатаза каппа
Белок 3 альфа регенерирующих островков	Гомолог 4 лизилоксидазы	Фактор 2 встраивания серина	Белок 4 регенерирующих островков
E3-убиквитинпротеинлигаза RNF5	Люмикан	Стромелизин-3	Тахикинин-4
Протахикинин-1	Адропин	Секретируемый фосфорпротеин 1	Металлопротеиназа-23 матрикса
Секретируемый белок 1, связанный с ожогами, изоформа CRA_a	Трансмембранный белок FLRT1, содержащий богатый лейцином повтор	Белок LACTB, подобный серин-бета-лактаме, митохондриальный	Белок 5, родственник комплексу C1q и фактору некроза опухолей
Белок B, родственник плазминогену	Нуклеобиндин-2	Галектин-3	Оптицин
Вероятная пальмитилтрансфераза ZDHHC16	Фосфолипаза A2	Прогормон поджелудочной железы	Предшественник малого/секретируемого гликопротеина
Ангиопоэтин-связанный белок 1	Прозенкефалин-B	Бета-1-гликопротеин 6, специфический для беременности	Пентраксин-родственный белок RTX3
Белок UPF0510, C19orf63	Пептидогликан-распознающий белок I-бета	Dickkopf-родственный белок 3	Карбоксилэстераза 8
Белок M160 фагоцитарного рецептора, богатый цистеином, типа 1	Белок 2 надсемейства иммуноглобулинов, содержащий богатый лейцином повтор	Член 11 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз	Трансмембранный белок 4, родственник тиоредоксину
Аналог 2 альфа-маннозидазы, усиливающей разложение ER	Белок 2, содержащий V-набор и иммуноглобулиновый домен	Белок 3 гамма регенерирующих островков	Белок 2, содержащий MFS-домен
Бета-галактозидаза-1-подобный белок 2	Пептид YY	Белок 43, содержащий домен RING-"палец"	Калликреин-12
Рецептор E интерлейкина-17	Ретинол-связывающий белок 3	Семеногелин-2	Коровий белок бревикана
Интерлейкин-20	Атерин	Муцин-15	Поримин
Интерлейкин-25	Гомолог белка транслокации SEC63	Сиалопротеин 2 костей	Торсин-1A
PDZ-доменсодержащий белок 11	Трансформирующий фактор роста бета-3	Лимфотактин	Хемокин 23 с C-C-мотивом
Релаксин-3	Белок Wnt-10B	Рост-регулирующий белок альфа	Тестикан-3
Ретиноид-индуцируемая серинкарбоксипептидаза	Реналаза	R-спондин-2	Основной богатый пролином белок 4 слюны
Белок 2, ассоциированный с карциномой неба, легких и носового эпителия	Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин 4 типа	Белок 3, содержащий трансмембранный и суперспирализованный домен	Член 18 надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей

Белок 5, содержащий коровый домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	Карбоксипептидаза A4	Хемокин 1, совместно регулируемый с ФРЭС	Белок "брат CDO"
Тромбоцитарный фактор роста C	Ольфактомедин-4	ADM2	Бета-1,4-галактозилтрансфераза 4
Белок 33, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	Кислая лабильная цепь комплекса белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста	Белок 1, подобный гидроксистероид-11-бета-дегидрогеназе	Член 9 SDR-семейства дегидрогеназ/редуктаз
BSD-доменсодержащий белок 1	Амелогенин, Y-изоформа	Дельта-подобный белок 1	Эппин
Молекула клеточной адгезии 3	Арилсульфатаза F	Эфрин-A1	Отоанкорин
CDC45-родственный белок	Вариант 2 бета-субъединицы хориогонадотропина	Аналог 1 рецептора фактора роста фибробластов	Тенасцин-R
Хондролектин	Бета-дефензин 104	Рецептор альфа-3 семейства GDNF	Фактор роста
Диацилглицерин-0-ацилтрансфераза 2	Бета-дефензин 105	Рецепторов тромбоцитов Gi24	Белок TSPEAR
3-кетостероидредуктаза	Бета-дефензин 107	Прогонадолиберин-2	Гефестин
Рецептор C интерлейкина-17	Белок WFDC11	Калликреин-7	Бутирофилин-подобный белок 3
Рецептор D интерлейкина-17	Белок 6, содержащий коровый домен кислого белка молочной сыворотки с четырьмя дисульфидными связями	Аполипопротеин F	Бутирофилин-подобный белок 9
Субъединица 1 комплекса интегратора	Эпиген	Белок CASC4	Субъединица гамма-2 ламинина
Аналог соединительной молекулы адгезии E3-убиквитинпротеинлигаза LNX	Белок FAM19A5	VIP36-подобный белок	Белок LMBR1L
Трансмембранный белок нейронов 3, содержащий богатый лейцином повтор	Клаудин-6	Белок-транспортёр магния 1	Муцин-21
Бета-субъединица метионинаденозилтрансферазы 2	Молекула клеточной адгезии 19, связанная с раковым эмбриональным антигеном	Амилорид-чувствительная аминоксидаза [медьсодержащая]	Маннозилитогосахарид-1,2-альфа-маннозидаза эндоплазматического ретикулула
Подоксаликсин-подобный белок 2	Белок 1, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Белок-модулятор аутофагии 2, регулируемый повреждением ДНК	Основной гликопротеин GP2 мембраны секреторных гранул поджелудочной железы
Проминин-2	Белок COQ10 A, митохондриальный	Трансмембранный белок C17orf87	Семафорин-4B
Белок 2, содержащий домен плексина	Неохарактеризованный белок C19orf41	Белок 5, родственный фактору комплемента H	Семафорин-5B
Гомолог 4 roundabout	Неохарактеризованный белок C21orf63	FK506-связывающий белок 7	Эпсилон-саркогликан
Лактозилцерамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Гомолог 2 белка дельта	Фактор 1 встраивания серина	Гуанилат-связывающий белок 5
Член 2 семейства SID1 трансмембранных белков	Белок транскрипта, регулируемого кокаином и амфетамином	Белок 1, содержащий трансмембранный и убиквитиноподобный домен	Эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 6
Sushi-доменсодержащий белок 1	Белок 1, подобный партнеру по связыванию липомы HMGIC	Аналог белка ERGIC-53	Серпин B3
Серин/треонин-протеинкиназа TAO2	Белок 18, содержащий повтор, богатый лейцином	Toll-подобный рецептор 10	Гомолог B белка RMD5
Трансмембранная сериновая протеаза 2	Белок 25, содержащий повтор, богатый лейцином	Toll-подобный рецептор 8	Член 5 класса A фагоцитарных рецепторов
Декарбоксилаза 1 УДФ-глюкуроновой кислоты	Белок 3B, содержащий богатый лейцином повтор	Селенопротеин T	Семафорин-6B
Неохарактеризованный белок C10orf58	Белок 3, содержащий повтор, богатый лейцином	Лектин 11, подобный Ig, связывающему сиаловую кислоту	Трансмембранный белок 108
Трансмембранный белок 2, родственный тиоредоксину	Белок 4, содержащий Yu6/PLAUR-домен	Сортирующий нексин-24	Sushi-доменсодержащий белок 3
СMP-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза	Субъединица 1 комплекса витамин K-эпоксидредуктазы	Белок 1, родственный комплементу C1q и фактору некроза опухолей	Белок 2, связывающий латентный трансформирующий фактор роста бета
Предполагаемый неохарактеризованный белок ENSP00000380674	Белок 20, содержащий мотивы дезинтегрин и металлопротеиназы с тромбоспондином	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6494/PRO21346	Предполагаемый неохарактеризованный белок UNQ6190/PRO20217
Трансмембранный белок 119	Предполагаемый неохарактеризованный белок ENSP00000381830	Вариант предшественника секреторируемого и трансмембранного белка 1	Вариант предшественника секреторируемого и трансмембранного белка 1
Трансмембранный белок 98	Белок 1 критической области синдрома кошачьего глаза	Член A семейства 18 белков с доменом лектина C-типа	Альфа-1 (XX) -цепь коллагена
Предшественник белка 3 В-лимфоцитов	Белок 101, экспрессируемый яйцками	Секреторный белок 3, богатый цистеином	Рецептор нетрина UNC5D
Предполагаемый неохарактеризованный белок C14orf144	Ксилозилтрансфераза 2	Комплемент C4-A	Муцин-13
Мембраносвязанная протеаза сайта-1 фактора транскрипции	Белок FAM20A	Предполагаемый неохарактеризованный белок PRO2829	АТФ-зависимая металлопротеаза YME1L1
	Белок 1, содержащий трансмембранный и иммуноглобулиновый домен	Регулятор 2 кальций-активируемого хлоридного канала	Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин 5 типа



Фиколин (содержащий домен коллагена/фибриногена) 3 (антиген Nakata) (NL3) (Фиколин (содержащий домен коллагена/фибриногена) 3 (антиген Nakata), изоформа CRA b)	Предполагаемый белок KIR3DX1, подобный иммуноглобулиноподобному рецептору киллеров (член 12 кластера лейкоцитарных рецепторов)	Супрессоров туморогенности нейробластомы 1	
---	--	--	--

Не следует считать, что терапевтические белки, представленные в данном описании, являются единственно возможными. Напротив, как видно из представленного в данном описании описания, способы по изобретению применимы к любому белку, присоединение к которому водорастворимого производного жирной кислоты в соответствии с изобретением является желательным. Например, терапевтические белки описаны в US 2007/0026485, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки.

Белки свертывания крови.

В одном аспекте исходным материалом по настоящему изобретению является белок свертывания крови, который может происходить из плазмы человека или продуцироваться с помощью технологии рекомбинантной инженерии, как описано в патентах США №№ 4757006; 733873; 5198349, 5250421, 5919766 и EP 306968.

Терапевтические полипептиды, например белки свертывания крови, в том числе фактор IX (FIX), фактор VIII (FVIII), фактор VIIa (FVIIa), фактор Виллебранда (ФВ), фактор FV (FV), фактор X (FX), фактор XI (FXI), фактор XII (FXII), тромбин (FII), белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор (TF) и протеаза ADAMTS 13, быстро разрушаются протеолитическими ферментами и нейтрализуются антителами. Это снижает время их полужизни и время циркуляции, тем самым ограничивая их терапевтическую эффективность. Для достижения и поддержания желаемого терапевтического или профилактического эффекта указанных белков свертывания необходимы относительно высокие дозы и частое введение. Как следствие, затрудненность адекватного регулирования дозы и необходимость частого внутривенного введения накладывают ограничения на образ жизни пациента.

Как описано в данном описании, белки свертывания крови включают фактор IX (FIX), фактор VIII (FVIII), фактор VIIa (FVIIa), фактор Виллебранда (ФВ), фактор FV (FV), фактор X (FX), фактор XI, фактор XII (FXII), тромбин (FII), белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор (TF) и протеазу ADAMTS 13, рассматриваемые изобретением, но не ограничиваются ими. Как используется в данном описании, термин "белок свертывания крови" относится к любому белку из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF) и протеазы ADAMTS 13, который проявляет биологическую активность, связанную с определенным нативным белком свертывания крови.

Каскад свертывания крови разделен на три сегмента: внутренний, внешний и общий пути (Schenone et al., Curr Opin Hematol. 2004; 11:272-7). Каскад включает ряд ферментов (зимогенос) сериновых протеаз и кофакторы белков. При необходимости неактивный предшественник-зимоген преобразуется в активную форму, которая затем преобразует следующий фермент в каскаде.

Внутренний путь требует факторов свертывания крови VIII, IX, X, XI и XII. Инициирование внутреннего пути происходит, когда прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, фактор XI (FXI) и фактор XII (FXII) подвергаются воздействию отрицательно заряженной поверхности. Также необходимы ионы кальция и фосфолипиды, выделяющиеся из тромбоцитов.

Внешний путь иницируется при повреждении просвета кровеносных сосудов. Мембранный гликопротеин - тканевый фактор высвобождается и затем связывается с циркулирующим фактором VII (FVII), а также небольшими существующими количествами его активированной формы FVIIa. Это связывание облегчает полное преобразование FVII в FVIIa, и затем в присутствии кальция и фосфолипидов преобразование фактора IX (FIX) в фактор IXa (FIXa) и фактора X (FX) в фактор Xa (FXa). Связывание FVIIa с тканевым фактором повышает протеолитическую активность, сближая сайты связывания фактора FVII для субстрата (FIX и FX) и вызывая конформационные изменения, что повышает ферментативную активность FVIIa.

Активация FX является общей точкой двух указанных путей. Наряду с фосфолипидом и кальцием факторы Va (FVa) и Xa преобразуют протромбин в тромбин (протромбиназный комплекс), который затем расщепляет фибриноген с образованием мономеров фибрина. Указанные мономеры полимеризуются с образованием нитей фибрина. Фактор XIIIa (FXIIIa) ковалентно связывает указанные нити друг с другом, образуя жесткую сеть.

Преобразование FVII в FVIIa также катализируется рядом протеаз, включая тромбин, FIXa, FXa, фактор XIa (FXIa) и фактор XIIa (FXIIa). При ингибировании ранней фазы каскада мишенью ингибитора пути тканевого фактора является комплекс FVIIa/тканевого фактора/продукта FXa.

Фактор VIIa.

FVII (также известный как стабильный фактор или проконвертин) представляет собой витамин K-зависимый сериновый протеазный гликопротеин с ключевой ролью в гемостазе и свертывании (Eigenbrot, Curr Protein Pept Sci. 2002; 3:287-99).

FVII синтезируется в печени и секретируется в виде одноцепочечного гликопротеина массой 48 кДа. FVII обладает общей со всеми витамин К-зависимыми сериновыми протеазными гликопротеинами структурой белковых доменов, состоящей из N-концевого домена гамма-карбоксиглутаминовой кислоты (Gla), содержащего 9-12 остатков, ответственных за взаимодействие белка с липидными мембранами, С-концевого домена сериновой протеазы (каталитического домена) и двух ЭФР-подобных доменов, содержащих сайт связывания ионов кальция, обеспечивающий взаимодействие с тканевым фактором. Гамма-глутамилкарбоксилаза катализирует карбоксилирование остатков Gla в N-концевой части молекулы. Действие указанной карбоксилазы зависит от восстановленной формы витамина К, которая окисляется до эпоксидной формы. Для преобразования эпоксидной формы витамина К обратно в восстановленную форму требуется витамин К-эпоксидредуктаза.

Основная часть FVII циркулирует в плазме в форме зимогена, и активация этой формы приводит к расщеплению пептидной связи между аргинином 152 и изолейцином 153. Полученный активированный FVIIa состоит из  $\text{NH}_2$ -производной легкой цепи (20 кДа) и полученной из  $\text{COOH}$ -конца тяжелой цепи (30 кДа), соединенных одиночной дисульфидной связью (от Cys 135 к Cys 262). Легкая цепь содержит мембранно-связанный Gla-домен, в то время как тяжелая цепь содержит каталитический домен.

Концентрация FVII в плазме определяется генетическими и экологическими факторами и составляет приблизительно 0,5 мг/мл (Pinotti et al., Blood. 2000; 95:3423-8). Различные генотипы FVII могут привести к различающимся в несколько раз средним уровням фактора FVII. Уровни FVII в плазме повышены во время беременности у здоровых женщин, а также увеличиваются с возрастом и повышены у женщин и у лиц с гипертриглицеридемией. FVII обладает самым коротким временем полужизни среди всех факторов свертывания (3-6 ч). Средняя концентрация FVIIa в плазме составляет 3,6 нг/мл у здоровых людей, и время полужизни FVIIa в кровотоке является относительно длительным (2,5 ч) по сравнению с другими факторами свертывания.

Наследственная недостаточность фактора FVII является редким аутосомно-рецессивным расстройством свертываемости с оцениваемой частотой 1 случай на 500000 лиц в общей популяции (Acharya et al., J Thromb Haemost. 2004; 2248-56). Приобретенная недостаточность фактора FVII за счет ингибиторов также встречается очень редко. Сообщается о случаях недостаточности, возникающих в связи с лекарственными препаратами, например цефалоспоридами, пенициллинами и пероральными антикоагулянтами. Кроме того, сообщается о приобретенной недостаточности FVII, возникающей спонтанно или в сочетании с другими состояниями, например миеломой, сепсисом, апластической анемией, интерлейкином-2 и антигемоцититарной глобулиновой терапией.

Эталонные полинуклеотидные и полипептидные последовательности включают, например, последовательности номер доступа J02933 для геномной последовательности, M13232 для кДНК (Hagen и др., PNAS, 1986, 83: 2412-6) и P08709 для полипептидной последовательности (полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Описаны различные полиморфизмы FVII, например, см. Sabater-Lleal et al. (Hum Genet. 2006; 118:741-51) (полностью включены в настоящее описание посредством ссылки).

#### Фактор IX.

FIX представляет собой витамин К-зависимый белок плазмы, участвующий во внутреннем пути свертывания крови путем преобразования FX в его активную форму в присутствии ионов кальция, фосфолипидов и FVIIIa. Преобладающей каталитической способностью FIX является способность выступать в качестве сериновой протеазы со специфичностью к определенной связи аргинин-изолейцин в составе FX. Активация FIX происходит за счет FXIa, вызывающего удаление активационного пептида из FIX с получением активированной молекулы FIX, включающей две цепи, удерживаемые одной или более дисульфидными связями. Дефекты в FIX являются причиной рецессивной X-сцепленной гемофилии В.

Гемофилия А и В являются наследственными заболеваниями, характеризующимися недостаточностью полипептидов FVIII и FIX соответственно. Основная причина недостаточности часто обусловлена мутациями в генах FVIII и FIX, оба из которых расположены на X-хромосоме. Традиционная терапия гемофилии часто включает внутривенное введение объединенной плазмы или частично очищенных белков свертывания здоровых людей. Указанные препараты могут быть загрязнены патогенными агентами или вирусами, например инфекционными прионами, ВИЧ, парвовирусом, гепатитом А и гепатитом С. Таким образом, существует настоятельная необходимость в терапевтических средствах, не требующих использования сыворотки человека.

Уровень снижения активности FIX прямо пропорционален степени тяжести гемофилии В. Современное лечение гемофилии В состоит из замещения отсутствующего белка плазматическим или рекомбинантным FIX (так называемое замещение FIX, или заместительное лечение, или терапия).

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности FIX находятся, например, в UniProtKB/Swiss-Prot, номер доступа P00740, и в патенте США № 6531298.

#### Фактор VIII.

Фактор свертывания крови VIII (FVIII) циркулирует в плазме в очень низкой концентрации и нековалентно связан с фактором Виллебранда (ФВ). Во время гемостаза FVIII отделяется от ФВ и действует как кофактор активации FX, опосредованной активированным фактором IX (FIXa), увеличивая скорость

активации в присутствии кальция и фосфолипидов или клеточных мембран.

FVIII синтезируется в виде одноцепочечного предшественника массой приблизительно 270-330 кДа с доменной структурой A1-A2-B-A3-C1-C2. При выделении из плазмы (например, "полученный из плазмы" или "плазматический") фактор FVIII состоит из тяжелой цепи (A1-A2-B) и легкой цепи (A3-C1-C2). Молекулярная масса легкой цепи 80 кДа, в то время как в связи с протеолизом в пределах домена В масса тяжелой цепи находится в диапазоне 90-220 кДа.

FVIII также синтезируют в виде рекомбинантного белка для терапевтического применения при расстройствах свертываемости. Разработаны различные анализы *in vitro* для определения потенциальной эффективности рекомбинантного фактора FVIII (rFVIII) в качестве терапевтического средства. Указанные анализы имитируют действие эндогенного FVIII *in vivo*. Обработка фактора FVIII тромбином *in vitro* приводит к быстрому возрастанию и последующему снижению его прокоагулянтной активности согласно анализам *in vitro*. Указанная активация и инактивация совпадает со специфическим ограниченным протеолизом как тяжелой, так и легкой цепи, изменяющим доступность различных связывающих эпитопов фактора FVIII, например, позволяющим фактору FVIII диссоциировать от ФВ и связываться с поверхностью фосфолипидов, или изменяющим связывающую способность по отношению к определенным моноклональным антителам.

Отсутствие или дисфункция фактора FVIII связаны с наиболее частым расстройством свертываемости - гемофилией А. Предпочтительным способом лечения гемофилии А является заместительная терапия производными плазмы или концентратами rFVIII. Больные с тяжелой формой гемофилии А с уровнем фактора FVIII ниже 1%, как правило, подвергаются профилактической терапии с целью сохранения уровня фактора FVIII выше 1% между получением доз. Принимая во внимание среднее время полужизни различных продуктов фактора FVIII в кровотоке, этот результат обычно может достигаться путем введения FVIII 2-3 раза в неделю.

Эталонные полинуклеотидные и полипептидные последовательности включают, например, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8\_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, *Nature*, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar G.H. et al., Structure of human Factor VIII, *Nature*, 312 (5992) :337-42 (1984); Thompson A.R. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost*, 2003; 29:11-29 (2002).

Фактор Виллебранда.

Фактор Виллебранда (ФВ) является гликопротеином, циркулирующим в плазме в виде набора мультимеров, размер которых варьирует приблизительно от 500 до 20000 кДа. Мультимерные формы ФВ состоят из 250-кДа полипептидных субъединиц, соединенных дисульфидными связями. ФВ опосредует начальную адгезии тромбоцитов к субэндотелию поврежденной стенки сосуда. Только крупные мультимеры проявляют гемостатическую активность. Предполагается, что эндотелиальные клетки секретируют крупные полимерные формы ФВ, и формы ФВ, обладающие низкой молекулярной массой (низкомолекулярный ФВ), возникают в результате протеолитического расщепления. Мультимеры, обладающие большой молекулярной массой, хранятся в тельцах Вейбела-Паллада эндотелиальных клеток и высвобождаются после стимуляции.

ФВ синтезируется эндотелиальными клетками и мегакариоцитами в виде препро-ФВ, в значительной степени состоящего из повторяющихся доменов. После отщепления сигнального пептида про-ФВ димеризуется за счет дисульфидных связей в С-концевой области. Димеры служат протомерами для мультимеризации, обуславливаемой дисульфидными связями между свободными концами. После сборки мультимеров следует протеолитическое удаление пропептидной последовательности (Leyte et al., *Biochem. J.* 274 (1991), 257-261).

Первичный продукт трансляции, предсказанный на основе клонированной кДНК ФВ, является полипептидом-предшественником из 2813 остатков (препро-ФВ). Препро-ФВ состоит из 22-аминокислотного сигнального пептида и 741-аминокислотного пропептида, а зрелый ФВ включает 2050 аминокислот (Ruggeri Z.A. and Ware J., *FASEB J.*, 308-316 (1993)).

Дефекты в ФВ являются причиной болезни Виллебранда (БВ), характеризующейся более или менее выраженными кровотечениями. БВ 3 типа является наиболее тяжелой формой, при которой ФВ полностью отсутствует, а БВ 1 типа относится к количественной потере ФВ, и ее фенотип может быть очень мягким. БВ 2 типа относится к качественным дефектам ФВ и может являться столь же тяжелой, как и БВ 3 типа. БВ 2 типа имеет множество субформ, причем некоторые из них связаны с утратой или снижением уровня высокомолекулярных мультимеров. Болезнь Виллебранда типа 2а (БВ-2А) характеризуется утратой как промежуточных, так и крупных мультимеров. БВ-2В характеризуется утратой высокомолекулярных мультимеров. В данной области техники известны другие заболевания и расстройства, связанные с ФВ.

Полинуклеотидные и аминокислотные последовательности препро-ФВ доступны в GenBank под номерами доступа NM\_000552 и NP\_000543 соответственно.

В данной области техники, например, в Mann K.G., *Thromb Haemost*, 1999; 82:165-74, описаны другие белки свертывания крови согласно настоящему изобретению.

А. Полипептиды.

В одном аспекте исходным материалом по настоящему изобретению является белок или полипептид. Как описано в данном описании, термин "терапевтический белок" относится к любой молекуле терапевтического белка, проявляющей биологическую активность, ассоциированную с терапевтическим белком. В одном варианте осуществления изобретения молекулы терапевтического белка представляют собой полноразмерный белок.

Рассматриваются молекулы терапевтического белка, включающие полноразмерные белки, предшественники полноразмерных белков, биологически активные субъединицы или фрагменты полноразмерных белков, а также биологически активные производные и варианты любой из указанных форм терапевтических белков. Таким образом, терапевтические белки включают белки, которые (1) обладают аминокислотной последовательностью, характеризующейся более приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% или большей идентичностью аминокислотной последовательности в области, содержащей по меньшей мере приблизительно 25, приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400 или более аминокислот, полипептиду, кодируемому эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, описанной в данном описании, и/или (2) специфически связываются с антителами, например поликлональными или моноклональными антителами, полученными против иммуногена, включающего эталонную аминокислотную последовательность, описанную в данном описании, его иммуногенного фрагмента и/или его консервативно модифицированного варианта.

В соответствии с настоящим изобретением термин "рекомбинантный терапевтический белок" включает любой терапевтический белок, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления указанный термин охватывает белки, описанные в данном описании.

Как используется в данном описании, "эндогенный терапевтический белок" включает терапевтический белок, происходящий от млекопитающего, предположительно являющегося получателем лечения. Указанный термин также включает терапевтический белок, транскрибируемый с трансгена или любой другой чужеродной ДНК, присутствующей в организме указанного млекопитающего. Как используется в данном описании, "экзогенный терапевтический белок" включает белок свертывания крови, не происходящий от млекопитающего, предположительно являющегося получателем лечения.

Как используется в данном описании, "белок свертывания крови плазматического происхождения" или "плазматический" включает все формы белка крови, полученные из млекопитающих, обладающие свойством участвовать в пути свертывания крови.

Как используется в данном описании, "биологически активное производное" или "биологически активный вариант" включает любое производное или вариант молекулы, обладающий практически такими же функциональными и/или биологическими свойствами, как и указанная молекула, например связывающимися свойствами, и/или структурной основой, например пептидным каркасом или простейшей единицей полимера.

"Аналог", "вариант" или "производное" является соединением, в значительной степени аналогичным по структуре и аналогичным по биологической активности, хотя и в некоторых случаях до определенной степени отличающимся от природной молекулы. Например, вариант полипептида относится к полипептиду, обладающему общей в значительной степени аналогичной структурой и аналогичной биологической активностью по сравнению с эталонным полипептидом. Варианты или аналоги отличаются по составу аминокислотных последовательностей от природного полипептида, производным которого является аналог, за счет одной или более мутаций, включающих (1) делецию одного или более аминокислотных остатков на одном или более концах полипептида и/или в одной или более внутренних областях последовательности природного полипептида (например, фрагментах), (2) инсерцию или добавление одной или более аминокислот на одном или более концах (обычно "добавление" или "слияние") полипептида и/или в одной или нескольких внутренних областях (обычно "инсерция") последовательности природного полипептида или (3) замены одной или более аминокислот другими аминокислотами в последовательности природного полипептида. Например, "производное" относится к полипептиду, обладающему аналогичной или, по существу, аналогичной структурой по сравнению с эталонным полипептидом, который модифицировали, например, химически.

В различных вариантах осуществления сконструированы аналоги, варианты и производные с целью обеспечения, например, конъюгирования другой молекулы с аналогом, вариантом или производным белка, за счет чего образуется конъюгированный белок согласно настоящему изобретению.

Варианты или аналоги полипептидов включают варианты инсерций, в которых к аминокислотной последовательности терапевтического белка по изобретению добавляют один или более аминокислотных остатков. Инсерции могут располагаться на любом или обоих концах белка и/или во внутренних областях аминокислотной последовательности терапевтического белка. Варианты инсерции, содержащие дополнительные остатки на одном или обоих концах, включают, например, гибридные белки и белки, со-

державшие аминокислотные маркеры или другие аминокислотные метки. В одном аспекте молекула белка свертывания крови необязательно содержит N-концевой Met, особенно если указанная молекула рекомбинантно экспрессируется в бактериальной клетке, например *E. coli*.

В вариантах делеций удаляют один или более аминокислотных остатков из полипептида терапевтического белка, как описано в данном описании. Делеции могут иметь место на одном или обоих концах полипептида терапевтического белка и/или сопровождаться удалением одного или более остатков в пределах аминокислотной последовательности терапевтического белка. Варианты делеций, таким образом, включают фрагменты полипептидной последовательности терапевтического белка.

В вариантах замен один или более аминокислотных остатков полипептида терапевтического белка удаляют и заменяют альтернативными остатками. В одном аспекте указанные замены являются консервативными по природе, и консервативные замены этого типа хорошо известны в данной области техники. Альтернативно, изобретение также охватывает замены, являющиеся неконсервативными. Примеры консервативных замен описаны в Lehninger [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77] и непосредственно приведены ниже.

#### Консервативные замены I

ХАРАКТЕРИСТИКИ БОКОВОЙ ЦЕПИ	АМИНОКИСЛОТА
Неполярные (гидрофобные):	
А. Алифатические	A L I V P
В. Ароматические	F W
С. Серосодержащие	M
Д. Пограничные	G
Незаряженные полярные:	
А. Гидроксильные	S T Y
В. Амиды	N Q
С. Сульфгидрильные	C
Д. Пограничные	G
Положительно заряженные (основные)	K R H
Отрицательно заряженные (кислые)	D E

Альтернативно, иллюстративными консервативными заменами являются непосредственно приведенные ниже.

#### Консервативные замены II

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

#### В. Полинуклеотиды.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтический белок по изобретению, включают, но без ограничения, например, гены, пре-мРНК, мРНК, кДНК, полиморфные варианты, аллели, синтетические и природные мутанты.

Полинуклеотиды, кодирующие терапевтический белок по настоящему изобретению также включа-

ют, но без ограничения, полинуклеотиды, которые (1) специфически гибридизуются в жестких условиях гибридизации с нуклеиновой кислотой, кодирующей эталонную аминокислотную последовательность, как описано в данном описании, и ее консервативно модифицированные варианты; (2) характеризуются нуклеотидной последовательностью, обладающей более чем приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более высокой идентичностью нуклеотидной последовательности в области, содержащей по меньшей мере приблизительно 25, приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 150, приблизительно 200, приблизительно 250, приблизительно 500, приблизительно 1000 или более нуклеотидов (вплоть до полноразмерной последовательности зрелого белка из 1218 нуклеотидов), эталонной нуклеотидной последовательности, как описано в данном описании. Примеры "жестких условий гибридизации" включают гибридизацию при 42°C в 50% формамиде, 5X SSC, 20 mM Na-PO<sub>4</sub>, pH 6,8 и отмывку в 1X SSC при 55°C в течение 30 мин. Следует понимать, что в зависимости от длины и содержания GC-нуклеотидов в гибридизуемых последовательностях можно модифицировать указанные примеры условий. Формулы, стандартно используемые в данной области техники, подходят для определения соответствующих условий гибридизации (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) §§ 9.47-9.51).

"Природные" полинуклеотидные или полипептидные последовательности, как правило, получены от млекопитающего, включая примата, например человека; грызуна, например крысы, мыши, хомяка; коровы, свиньи, лошади, овцы или любого млекопитающего, но, не ограничиваясь ими. Нуклеиновые кислоты и белки по настоящему изобретению могут являться рекомбинантными молекулами (например, гетерологичными и кодирующими последовательность дикого типа или ее вариант или являться не встречающимися в природе).

#### С. Получение терапевтических белков.

Получение терапевтического белка включает любой способ, известный в данной области техники для (1) получения рекомбинантной ДНК с помощью генной инженерии, (2) внедрения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки, например, но без ограничений, трансфекцию, электропорацию или микроинъекцию, (3) культивирования указанных трансформированных клеток, (4) экспрессии терапевтического белка, например, конститутивно или при индукции, и (5) выделения указанного белка свертывания крови, например, из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток, с целью получения очищенного терапевтического белка.

В других аспектах терапевтический белок получают путем экспрессии в подходящей прокариотической или эукариотической системе-хозяине, характеризующейся продукцией фармакологически приемлемой молекулы белка свертывания крови. Примерами эукариотических клеток являются клетки млекопитающих, например CHO, COS, HEK293, BHK, SK-Nep и HepG2.

Для получения терапевтического белка используют широкое разнообразие векторов, выбранных из эукариотических и прокариотических экспрессирующих векторов. Примеры векторов для экспрессии в прокариотах включают плазмиды, например, но без ограничения, pRSET, pET и pBAD, где промоторы, используемые в прокариотических экспрессирующих векторах, включают один или более, но без ограничения, lac, trc, trp, gcsA или araBAD. Примеры векторов для экспрессии в эукариотах включают (1) для экспрессии в дрожжах - такие векторы, как, но без ограничения, pAO, pPIC, pYES или pMET, использующие такие промоторы, как, но без ограничения, AOX1, GAP, GAL1 или AUG1; (2) для экспрессии в клетках насекомых - такие векторы, как, но без ограничения, pMT, pAc5, pIB, pMIB или pBAC, использующие такие промоторы, как, но без ограничения, PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 или polh, и (3) для экспрессии в клетках млекопитающих - такие векторы, как, но без ограничения, pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3 или pBPV, и векторы, происходящие в одном аспекте от вирусных систем, например, но без ограничения, вируса осповакцины, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса или ретровирусов, использующие такие промоторы, как, но без ограничения, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и промотор β-актина.

В различных вариантах осуществления изобретения терапевтические белки модифицируют путем конъюгирования водорастворимых производных жирных кислот и водорастворимых линкеров с одним или более углеводов в составе терапевтического белка. Таким образом, в одном варианте осуществления терапевтическим белком является гликопротеин и выделен из клетки-хозяина, обеспечивающей гликозилирование (т.е. белок гликозилирован *in vivo*, а затем выделен в виде гликопротеина). В различных вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой или нет гликопротеин и является гликозилированным *in vitro* после выделения из клетки-хозяина. Способы гликозилирования *in vitro* хорошо известны в данной области техники (см., например, Meynial-Salles I and Combes D, *Journal of Biotechnology* 1996, 46:1-14; Sola R.J. and Griebenow K., *BioDrugs* 2010, 24:9-21). Конечно, специалист в данной области техники может (1) очистить терапевтический белок, (2) модифицировать терапевтический белок с целью обеспечения, необязательно, сайт-специфического гликозилирования *in vitro* (например, путем делеции/инсерции/замены аминокислот), а также (3) гликозилировать модифицированный белок *in vitro* в соответствии с методиками, известными в данной области техники.

#### D. Введение

В одном варианте осуществления конъюгированный терапевтический белок по настоящему изобретению можно вводить путем инъекции, например внутривенной, внутримышечной или внутривнутрибрюшинной инъекции.

Для введения композиций, содержащих конъюгированный терапевтический белок по настоящему изобретению, человеку или экспериментальным животным композиции в одном аспекте содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей. Термины "фармацевтически" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным структурам и композициям, которые являются стабильными, ингибируют разрушение белков, такое как агрегация и расщепление продуктов, и, кроме того, не вызывают аллергических или других побочных реакций при введении посредством путей, хорошо известных в данной области техники, как описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые клинически пригодные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., включая агенты, описанные выше.

Как используется в данном описании, термин "эффективное количество" включает дозы, пригодные для лечения заболевания или расстройства, или облегчения симптомов заболевания или расстройства. В одном варианте осуществления "эффективное количество" включает дозу, пригодную для лечения млекопитающего, страдающего нарушением свертываемости крови, как описано в данном описании.

Композиции можно вводить перорально, местно, трансдермально, парентерально, путем ингаляции, вагинально, ректально или путем внутричерепной инъекции. Термин "парентеральный", как используется в данном описании, включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интракостальную инъекцию или методики вливания. Наряду с этим рассматривается введение путем внутривенной, внутримышечной, внутримышечной, интрамаммарной, внутривнутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутривнутрибрюшной инъекции и/или хирургической имплантации в определенной области. Как правило, композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

Однократное или многократные введения композиций можно осуществлять, используя уровень дозы и схемы, выбираемые лечащим врачом. Дозировка, соответствующая профилактике или лечению заболевания, зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, как описано выше, тяжести и течения заболевания, введения лекарственного средства в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и его реакции на лекарственное средство и решения лечащего врача.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество конъюгированного терапевтического белка, как определено в данном описании. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, соль, буфер или эксципиент. Фармацевтическую композицию можно использовать для лечения определенных выше расстройств свертываемости крови. Фармацевтическая композиция по изобретению может представлять собой раствор или лиофилизированный продукт. Растворы фармацевтической композиции можно подвергать любому подходящему процессу лиофилизации. В дополнительном аспекте изобретение включает наборы, включающие композицию по изобретению, упакованную таким образом, который облегчает ее использование для введения субъектам. В одном варианте осуществления такой набор включает соединение или композицию, описанную в данном описании (например, композицию, содержащую конъюгированный терапевтический белок), упакованную в контейнер, например герметичную бутылку или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенной в упаковку, описывающей применение соединения или композиции при практической реализации способа. В одном варианте осуществления набор содержит первый контейнер, содержащий композицию, содержащую конъюгированный терапевтический белок, и второй контейнер, содержащий физиологически приемлемый раствор для восстановления композиции, содержащейся в первом контейнере. В одном аспекте соединение или композиция упакована в виде дозированной формы. Указанный набор может дополнительно включать устройство, пригодное для введения композиции в соответствии с определенным способом введения. Предпочтительно набор содержит этикетку, описывающую использование композиции терапевтического белка или пептида.

Жирные кислоты, производные жирных кислот и конъюгаты белок-производное жирной кислоты.

В одном аспекте молекула-производное терапевтического белка (т.е. конъюгированный терапевтический белок), представленная в данном описании, связана с водорастворимым производным жирной кислоты. Как используется в данном описании, "водорастворимое производное жирной кислоты" включает жирную кислоту (т.е. карбоновую кислоту), конъюгированную с водорастворимым линкером (например, аминоксиллинкером), как описано в данном описании. Такие производные жирных кислот согласно изобретению являются стабильными (т.е. не отсоединяются от белка), водорастворимыми и способными связываться с сывороточным альбумином человека.

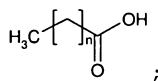
#### A. Жирные кислоты.

Жирные кислоты (т.е. ЖК) включают насыщенные жирные кислоты, ненасыщенные жирные кисло-

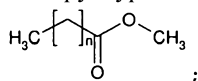
ты, жирные кислоты с разветвленной цепью (Mukheriji et al., Prog Lipid Res 2003; 42:359-76) и их производные, способные связывать сывороточный альбумин человека в соответствии с настоящим изобретением, но не ограничиваются ими.

В качестве примера жирные кислоты имеют следующую общую структуру:

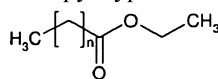
насыщенные ЖК: общая структура



метиловый эфир насыщенной ЖК: общая структура



этиловый эфир насыщенной ЖК: общая структура



Жирные кислоты в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения также включают различные альтернативные структуры (например, метиловый или этиловый эфиры) или другие структуры, например структуры, содержащие концевые группы в ω-положении (например, гидроксильные, amino-, тио- и карбоксильные группы).

В одном варианте осуществления жирная кислота является природной жирной кислотой. В различных вариантах осуществления жирной кислотой является короткоцепочечная жирная кислота (например, содержащая менее шести атомов углерода), среднецепочечная жирная кислота (например, содержащая 6-12 атомов углерода), длинноцепочечная жирная кислота (например, содержащая более 12 атомов углерода) или жирная кислота с очень длинной цепью (например, содержащая более 22 атомов углерода). В еще одном варианте осуществления жирная кислота содержит от 4 до 28 атомов углерода. В одном варианте осуществления жирная кислота находится в цис-конфигурации. В еще одном варианте осуществления жирная кислота находится в трансконфигурации.

В одном варианте осуществления жирной кислотой является насыщенная жирная кислота длиной от 12 до 20 атомов углерода. В данной области техники известны такие жирные кислоты, например C12 (додекановая кислота, лауриновая кислота), C14 (тетрадекановая кислота, миристиновая кислота), C16 (гексадекановая кислота, пальмитиновая кислота), C18 (октадекановая кислота, стеариновая кислота) и C20 (эйкозановая кислота, арахидиновая кислота). Примерами ненасыщенных жирных кислот являются миристолеиновая кислота (C14:1), пальмитолеиновая кислота (C16:1), олеиновая кислота (C18:1), линолевая кислота (C18:2) и арахидоновая кислота (C20:4). Большинство жирных кислот коммерчески доступны и могут быть получены с помощью различных химических способов (Recent Developments in the Synthesis of Fatty Acid Derivatives, Editors: Knothe G. and Derksen J.T.B., AOCS Press 1999, ISBN 1-893997-00-6).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения жирная кислота включает 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 или 50 атомов углерода.

В. Производные жирных кислот.

Настоящее изобретение обеспечивает получение нового класса активированных производных жирных кислот (производных ЖК), способных связывать сывороточный альбумин человека. Производные ЖК содержат водорастворимый спейсер или линкер, обеспечивающий манипуляции с производными ЖК в водном растворе (т.е. производные жирных кислот согласно настоящему изобретению являются водорастворимыми, в отличие от соответствующих жирных кислот, от которых они происходят). В одном варианте осуществления производные ЖК содержат активную аминоксигруппу, обеспечивающую присоединение производного ЖК к окисленной углеводной группе (преимущественно N-гликанам) терапевтических белков с образованием стабильных оксимных связей. Как используется в данном описании, "стабильная" связь означает, что образуется ковалентная связь, являющаяся "неотсоединяемой" или негидролизуемой.

Химическая модификация через углеводы может являться предпочтительным вариантом для коагулирующих белков, например FVIII, FIX и FVIIa, с целью образования конъюгатов с высокой остаточной активностью.

Например, но без ограничения, следующая стратегия представляет собой один вариант осуществления согласно настоящему изобретению для получения водорастворимого производного ЖК, содержащего активную аминоксигруппу.

Стратегия 1.

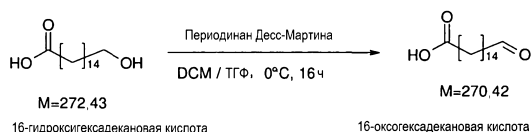
ω-Гидроксигруппу производного ЖК (например, 16-гидроксигексадекановой кислоты) подвергают окислению периодином Десса-Мартина с целью получения альдегидной группы. На следующей стадии к указанной альдегидной группе присоединяют диаминооксилинкер, содержащий цепь водорастворимого ПЭГ (например, 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диокиамин), с образованием стабильной оксимной



связи. Следующая схема представляет собой один пример согласно стратегии 1:

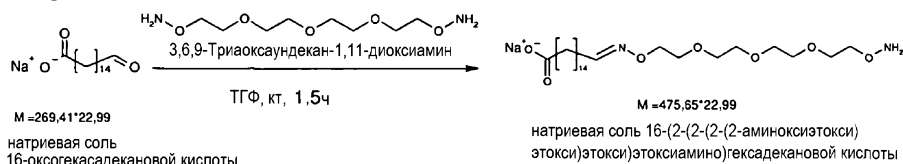
Стадия 1.

16-гидроксистеариновую кислоту селективно окисляют реагентом Десса-Мартина с получением 16-окстеариновой кислоты. Неочищенный продукт очищают хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента



## Стадия 2.

16-оксогруппу натриевой соли 16-оксостеариновой кислоты подвергают взаимодействию с 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамином. Неочищенный продукт очищают хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента



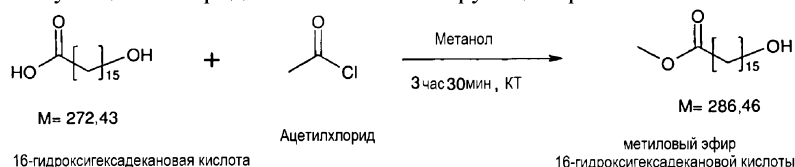
В качестве еще одного альтернативного варианта осуществления используют следующую стратегию для получения водорастворимых производных ЖК, содержащих активную аминооксогруппу.

### Стратегия 2.

Карбоксильную группу  $\omega$ -гидроксижирной кислоты (например, 16-гидроксигексадекановой кислоты) этерифицируют ацетилхлоридом.  $\omega$ -гидроксигруппу указанного метилэфирного производного активируют мезилхлоридом с целью внедрения лучшей уходящей группы. Затем указанную мезимную группу подвергают взаимодействию с диаминооксилинкером, содержащим цепь водорастворимого ПЭГ (например, 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксамин), с образованием стабильной аминоксиметиленовой связи. Необязательно указанный метиловый эфир можно гидролизовать в щелочном растворе с образованием свободной карбоксильной группы. Следующая схема представляет собой один пример согласно стратегии 2:

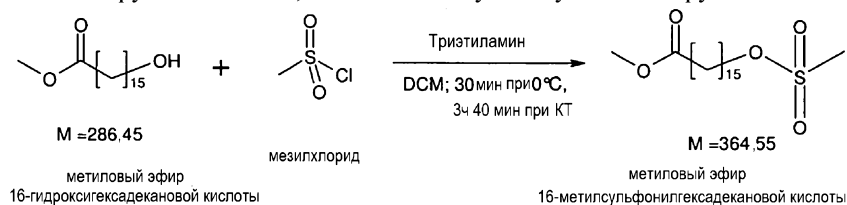
Стадия 1.

Карбоксильную группу 16-гидроксигексадекановой кислоты блокируют путем образования метилового эфира, используя ацетилхлорид в качестве метилирующего реагента



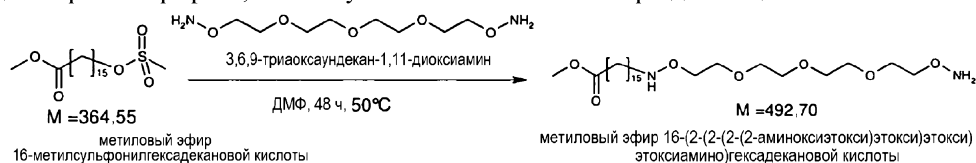
## Стадия 2.

16-гидроксигруппу метилового эфира 16-гидроксигексадекановой кислоты активируют путем замещения гидроксильной группы мезилом, являющимся лучшей уходящей группой



### Стадия 3.

16-мезильную группу метилового эфира 16-метилсульфонилгексадекановой кислоты замещают одной аминоксигруппой бифункционального 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамин. Неочищенный продукт очищают хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента



Настоящее изобретение также рассматривает дополнительные стратегии. Настоящее изобретение, например, не ограничивается аминоксимицией для присоединения к альдегидным группам окисленных углеводных остатков. Как описано в данном описании, также рассматривается использование других химических способов, включающих гидразиды для присоединения к альдегидным группам, NHS-эфиры

для присоединения к аминогруппам и малеимиды для присоединения к свободным SH-группам терапевтических белков, но, не ограничиваясь ими.

Например, метиловый эфир жирной кислоты, полученный, как описано выше, подвергают взаимодействию с коммерчески доступной MAL-ПЭГ-COOH (mal-ПЭГ(12)-COOH/IRIS Biotech GmbH, Марктредвиц, Германия), как описано в данном описании. В рамках еще одного примера сложный эфир жирной кислоты с реакционноспособной аминогруппой подвергают взаимодействию с коммерчески доступным NHS-ПЭГ-NHS (NHS-dPEG(4)-NHS/IRIS Biotech GmbH, Марктредвиц, Германия), как описано в данном описании.

Водорастворимые линкеры включают водорастворимые полимеры (например, ПЭГ), но не ограничиваются ими. Линкер может состоять из любой химической структуры, содержащей одну или более функциональных групп, повышающих его растворимость в воде. Указанные функциональные группы могут обладать способностью образовывать отрицательный или положительный заряд, тем самым придавая линкеру растворимость в воде. В одном варианте осуществления указанная функциональная группа включает сульфо- или карбоксильную группу, но не ограничивается ими. Кроме того, можно использовать любую полярную функциональную группу, повышающую растворимость линкера в воде. Примерами являются гидроксильная, амино-, амидо-, малеимидо-, аминокси- и гидразидная группы, а также сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS) и сульфо-NHS-эфиры.

В различных вариантах осуществления водорастворимый полимер включает полиэтиленгликоль (ПЭГ), разветвленный ПЭГ, полисиаловую кислоту (PSA), гидроксиалкилкрахмал (HAS), гидроксиэтилкрахмал (HES), углевод, полисахариды, пуллулан, хитозан, гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфат, дерматансульфат, крахмал, декстран, карбоксиметилдекстран, полиалкиленоксид (ПАО), полиалкиленгликоль (ПАГ), полипропиленгликоль (ППГ), полиоксазолин, полиакрилоилморфолин, поливиниловый спирт (ПВС), поликарбоксилат, поливинилпирролидон, полифосфазен, полиоксазолин, сополимер полиэтилена и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер полистирола и ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформальдегид) (PHF) и 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмонийфосфат (MPC), но не ограничивается ими.

В одном варианте осуществления водорастворимым полимером является ПЭГ. В различных вариантах осуществления изобретения водорастворимый полимер включает цепь длиной приблизительно от 3 до 25 атомов кислорода. Например, в различных вариантах осуществления согласно настоящему изобретению водорастворимый полимер включает 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 или 25 атомов кислорода.

#### С. Конъюгаты белок-производные жирных кислот.

Системы аминоксидлинкеров (т.е. системы, в которых водорастворимое производное жирной кислоты содержит аминоксидлинкер) рассматриваются в настоящем изобретении. Например, в одном варианте осуществления изобретения для получения белковых конъюгатов используют взаимодействие гидроксилamina или производных гидроксилamina с альдегидами (например, в составе углеводной группы после окисления периодатом натрия) с целью образования оксимной группы. Например, гликопротеин (например, терапевтический белок в соответствии с настоящим изобретением) сначала окисляют окислителем, например периодатом натрия ( $\text{NaIO}_4$ ) (Rothfus J.A. et Smith E.L., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; и Van Lenten L and Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). Окисление гликопротеинов периодатом основано на классической реакции Malaprade, описанной в 1928 г., окислении вицинальных диолов периодатом с образованием активной альдегидной группы (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). Дополнительными примерами таких окислителей являются тетраацетат свинца ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ), ацетат марганца ( $\text{MnO}(\text{Ac})_3$ ), ацетат кобальта ( $\text{Co}(\text{OAc})_2$ ), ацетат таллия ( $\text{TlOAc}$ ), сульфат церия ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) (США № 4367309) или перрутеноат калия ( $\text{KRuO}_4$ ) (Marko et al., J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2). Под термином "окислитель" подразумевают слабое окисляющее соединение, способное окислять вицинальные диолы в углеводах, тем самым образуя активные альдегидные группы в условиях физиологической реакции.

Второй стадией является присоединение полимера (например, производного жирной кислоты), содержащего аминоксидгруппу, к окисленной углеводной группе с образованием оксимной связи. В одном варианте осуществления изобретения данную стадию можно осуществить в присутствии каталитических количеств нуклеофильного катализатора анилина или производного анилина (Dirksen A. et Dawson P.E., Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y. et al., Nature Methods 2009; 6:207-9). Анилиновый катализ значительно ускоряет лигирование оксима, позволяя использовать очень низкие концентрации реагентов. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения оксимную связь стабилизируют восстановлением с  $\text{NaCNBH}_3$  с образованием алкоксиаминной связи. Дополнительные катализаторы описаны ниже. В еще одном варианте осуществления данную стадию осуществляют в присутствии м-толуидина.

В одном варианте осуществления изобретения стадии реакций с целью присоединения водорастворимого линкера (например, производного жирной кислоты) к белку осуществляют отдельно и последовательно (т.е. исходные материалы (например, терапевтические белки, водорастворимый линкер и т.д.), реагенты (например, окислители, анилин и т.д.) и продукты реакции (например, окисленный углевод в составе терапевтического белка, активированный водорастворимый аминоксидлинкер и т.д.) разделяют

между отдельными стадиями реакции). В еще одном варианте осуществления исходные материалы и реагенты, необходимые для завершения реакции конъюгирования по настоящему изобретению, осуществляют в одном сосуде. В одном варианте осуществления нативный белок смешивают с аминоксиполимерным реагентом. Затем добавляют окислитель и выполняют реакцию конъюгирования.

Дополнительную информацию об аминоксипотехнологии можно найти в следующих ссылках, каждая из которых полностью включена: EP 1681303 A1 (HAS илированный эритропротейн); WO 2005/014024 (конъюгаты полимера и белка, соединенные оксимной линкерной группой); WO 96/40662 (аминоксисодержащие линкерные соединения и их применение в конъюгатах); WO 2008/025856 (модифицированные белки); Peri F. et al., *Tetrahedron* 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J. and Pozsgay V., *J Org Chem* 2005, 70, 6887-90; Lees A. et al., *Vaccine* 2006, 24(6), 716-29 и Heredia K.L. et al., *Macromolecules* 2007, 40(14), 4772-9.

Присоединение водорастворимого линкера можно осуществить путем непосредственного присоединения к белку, например, через свободную сульфгидрильную группу или свободную аминогруппу в составе белка или через линкерную молекулу, описанную в данном описании. В одном аспекте конъюгирование выполняют путем прямого присоединения (или присоединение с помощью линкерных систем) водорастворимого линкера к терапевтическому белку с образованием стабильных связей.

Так в различных вариантах осуществления изобретения разработаны производные жирных кислот, описанные в данном описании, с целью обеспечения конъюгирования с терапевтическим белком. Например, разработаны производные жирных кислот, включающие различные концевые реакционноспособные группы, как описано в данном описании.

В некоторых аспектах терапевтический белок конъюгируют с водорастворимым производным жирной кислоты с помощью любого из разнообразных химических способов (Roberts J.M. et al., *Advan Drug Delivery Rev* 2002; 54:459-76). Например, в одном варианте осуществления терапевтический белок модифицируют путем конъюгирования производных жирных кислот со свободными аминогруппами белка с использованием сложных эфиров N-гидроксисукцинимиды (NHS). В еще одном варианте осуществления водорастворимое производное жирной кислоты присоединяют к свободным SH-группам, используя химические способы на основе малеимида. В еще одном варианте осуществления водорастворимое производное жирной кислоты присоединяют путем использования взаимодействия с гидразидом или аминоксигруппой к углеводным группам терапевтического белка после предварительного окисления.

В одном варианте осуществления изобретения терапевтический белок модифицируют по остаткам лизина путем использования водорастворимых производных жирных кислот, содержащих активный сложный эфир N-гидроксисукцинимиды (NHS). Указанное производное подвергают взаимодействию с остатками лизина терапевтического белка в мягких условиях, образуя стабильную амидную связь.

В еще одном варианте осуществления изобретения рассматривается присоединение через пептидную связь между карбоксильной группой в составе белка или производного жирной кислоты и аминогруппой белка или производного жирной кислоты или сложноэфирную связь между карбоксильной группой белка или производного жирной кислоты и гидроксильной группой терапевтического белка или производного жирной кислоты. Еще одна связь, с помощью которой терапевтический белок ковалентно связывается с производным жирной кислоты, является связь через основание Шиффа, например между свободной аминогруппой в составе белка, подвергаемой взаимодействию с альдегидной группой, образованной на конце жирной кислоты. Полученное основание Шиффа в одном аспекте стабилизируют путем специфического восстановления с помощью  $\text{NaCNBH}_3$  с образованием вторичного амина. Альтернативным подходом является создание концевых свободных аминогрупп в составе производного жирной кислоты путем восстановительного аминирования с помощью  $\text{NH}_4\text{Cl}$  после предварительного окисления. Для соединения двух аминогрупп или двух гидроксильных групп можно использовать бифункциональные реагенты. Например, производное жирной кислоты, содержащее аминогруппу, присоединяют к аминогруппам белков с помощью таких реагентов, как BS3 (бис-(сульфосукцинимидил)суберат/Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс, США). Кроме того, используют гетеробифункциональные перекрестно сшивающие реагенты, например сульфо-EMCS (N-ε-малеимидкапроилокси)сульфосукцинимидный эфир/Pierce), например, для связи аминных и тиольных групп.

В рамках еще одного подхода получают производное жирной кислоты с активной гидразидной группой и присоединяют его к углеводной группе белка после предварительного окисления и получения альдегидных функциональных групп.

Как описано выше, свободная аминогруппа терапевтического белка вступает во взаимодействие с 1-карбоксильной группой производного жирной кислоты с образованием пептидной связи, или между 1-карбоксильной группой и гидроксильной или другой подходящей активной группой в составе белка образуется сложноэфирная связь.

В различных вариантах осуществления терапевтический белок связан или ассоциирован с производным жирной кислоты в стехиометрических количествах (например, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 и т.д.). В различных вариантах осуществления к белку присоединены 1-6, 7-12 или 13-20 производных жирных кислот. В других вариантах осуществления к белку присоединены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более производных жирных кислот.

В различных вариантах осуществления терапевтический белок модифицирован с целью внедрения сайтов гликозилирования (т.е. сайтов, отличающихся от нативных сайтов гликозилирования). Такую модификацию можно осуществить, используя стандартные молекулярно-биологические методики, известные в данной области техники. Кроме того, терапевтические белки до конъюгирования с водорастворимым линкером через один или более углеводных остатков можно гликозировать *in vivo* или *in vitro*. Указанные сайты гликозилирования могут служить в качестве мишеней для конъюгирования белков с водорастворимыми линкерами (патентные заявки США №№ 20090028822, 2009/0093399, 2009/0081188, 2007/0254836, 2006/0111279 и DeFrees S. et al., *Glycobiology*, 2006, 16, 9, 833-43).

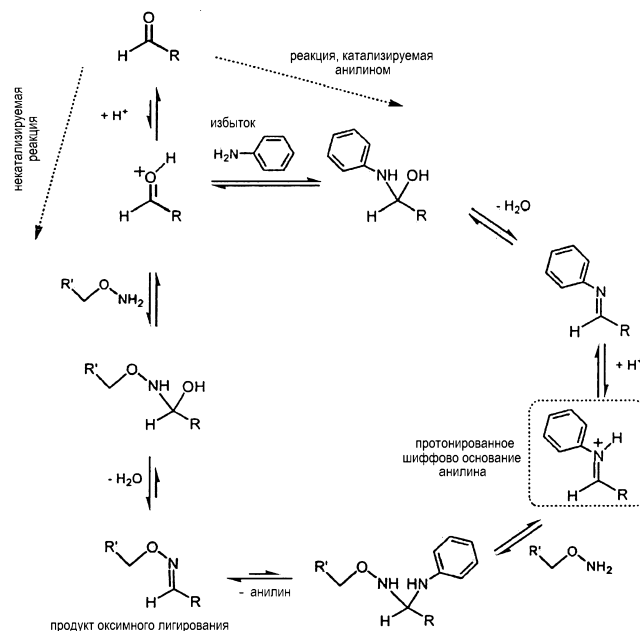
В одном варианте осуществления конъюгированный белок сохраняет полную функциональную активность нативных терапевтических белковых продуктов и обеспечивает увеличенное время полужизни *in vivo* по сравнению с нативными терапевтическими белковыми продуктами. В еще одном варианте осуществления конъюгированный белок сохраняет по меньшей мере 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140 или 150% биологической активности по сравнению с нативным белком.

В родственном аспекте биологическую активность конъюгированного белка и нативного белка свертывания крови определяют по соотношениям хромогенной активности и антигенного значения фактора свертывания крови (фактор свертывания крови:Chг:фактор свертывания крови:Ag).

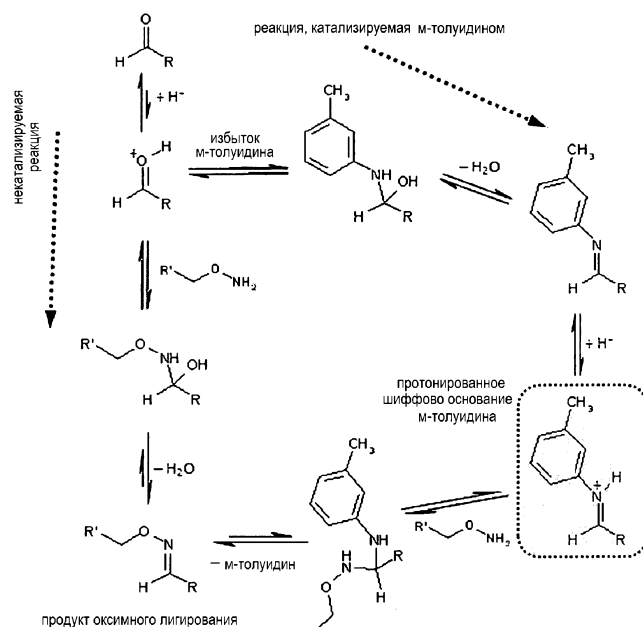
В еще одном варианте осуществления изобретения время полужизни конъюгированного белка уменьшается или увеличивается в 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению со временем полужизни нативного терапевтического белка *in vivo*.

Нуклеофильные катализаторы.

Как описано в данном описании, конъюгирование водорастворимых производных жирных кислот с терапевтическими белками можно катализировать анилином. Анилин является сильным катализатором водных реакций альдегидов и кетонов с аминами с образованием стабильных иминов, например гидразонов и оксимов. На следующей диаграмме приведено сравнение некатализируемой и анилин-катализируемой реакции оксимного лигирования (по материалам Kohler J.J., *ChemBioChem* 2009; 10:2147-50):



В то же время, учитывая многочисленные риски для здоровья, связанные с анилином, желательны альтернативные катализаторы. Настоящее изобретение обеспечивает производные анилина в качестве альтернативных катализаторов оксимного лигирования. Такие производные анилина включают о-аминобензойную кислоту, м-аминобензойную кислоту, п-аминобензойную кислоту, сульфаниловую кислоту, о-аминобензамид, о-толуидин, м-толуидин, п-толуидин, о-анизидин, м-анизидин и п-анизидин, но, не ограничиваясь ими. На следующей диаграмме приведено сравнение некатализируемой и м-толуидин-катализируемой реакции оксимного лигирования (PCT/US 2011/45873):



В одном варианте осуществления изобретения для катализа реакций конъюгирования, описанных в данном описании, используют м-толуидин (также известный как метатолуидин, метаметиланилин, 3-метиланилин или 3-амино-1-метилбензол). М-толуидин и анилин обладают сходными физическими свойствами и, по существу, одинаковым значением рКа (м-толуидин: рКа 4,73, анилин: рКа 4,63).

Нуклеофильные катализаторы по изобретению можно использовать для оксимного лигирования (например, используя аминоксисвязь) или образования гидрозона (например, используя гидразидные реакции). В различных вариантах осуществления изобретения нуклеофильный катализатор вводят в реакцию конъюгирования в концентрации 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мМ. В одном варианте осуществления нуклеофильный катализатор представлен в концентрации от 1 до 10 мМ. В различных вариантах осуществления изобретения диапазон рН реакции конъюгирования составляет от 4,0 до 7,0, от 4,5 до 7,0, от 5,0 до 6,5, от 5,0 до 6,5. В различных вариантах осуществления рН реакции конъюгирования составляет 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 и 7,5. В одном варианте осуществления рН составляет от 5,5 до 6,5.

Очистка конъюгированных белков.

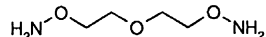
В различных вариантах осуществления желательна очистка белков, инкубированных с окислителем, и/или терапевтического белка, конъюгированного с водорастворимым производным жирной кислоты согласно изобретению. В данной области техники известны многочисленные методики очистки, включающие, но без ограничения, хроматографические способы, способы фильтрации и способы осаждения (см., например, Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology, vol 463 (edited by Burgess R.R. and Deutscher M.P.), 2nd edition, Academic Press 2009).

Следующие примеры не предназначены для ограничения и являются только примерами конкретных вариантов осуществления изобретения.

### Примеры

Пример 1. Получение гомобифункционального линкера  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$ .

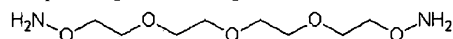
Гомобифункциональный линкер  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$



3-Оксапентан-1,5-диоксиамин, содержащий две активные аминоксигруппы, синтезировали в соответствии с Boturn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) в двухстадийной органической реакции, используя модифицированный синтез первичных аминов по Gabriel (фиг. 1). На первой стадии одну молекулу 2,2-дихлордиэтилового эфира подвергали взаимодействию с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в ДМФ. Желаемый гомобифункциональный продукт получали из полученного промежуточного соединения путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 2. Получение гомобифункционального линкера  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$ .

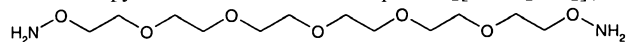
Гомобифункциональный линкер  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_6\text{ONH}_2$



3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамин, содержащий две активные аминоксигруппы, синтезировали в соответствии с Boturn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) в двухстадийной органической реакции, используя модифицированный синтез первичных аминов по Gabriel. На первой стадии одну молекулу дихлорида гексаэтиленгликоля подвергали взаимодействию с двумя молекулами эндо-N-

гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в ДМФ. Желаемый гомобифункциональный продукт получали из полученного промежуточного соединения путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 3 Получение гомобифункционального линкера  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$

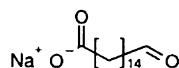


Гомобифункциональный линкер  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$  (3,6,9-триоксаундекан-1,11-диооксиамин), содержащий две активные аминооксигруппы, синтезировали в соответствии с Boturyn et al. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) в двустадийной органической реакции, используя модифицированный синтез первичных аминов по Gabriel: На первой стадии одну молекулу бис-(2-(2-хлорэтокс)этилового) эфира подвергали взаимодействию с двумя молекулами эндо-N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида в ДМФ. Конечный гомобифункциональный продукт получали из полученного промежуточного соединения путем гидразинолиза в этаноле.

Пример 4. Получение натриевой соли 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокс)этокс)этокс)этоксимино)-гексадекановой кислоты.

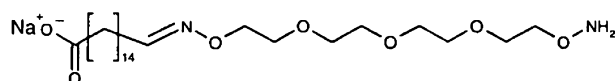
Жирно-кислотный аминоксидлинкер натриевую соль 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокс)этокс)этокс)этоксимино)гексадекановой кислоты синтезировали в соответствии с Halligan and Nair (Arkivoc 2006 (ii) 101-106) и Hubbs and Heathcock (J Am Chem Soc, 2003; 125:12836-43) в двустадийной реакции.

Промежуточное соединение 1. Натриевая соль 16-оксогексадекановой кислоты



К охлажденному раствору (0°C) 16-гидроксигексадекановой кислоты (800 мг, 2,9 ммоль) в дихлорметане (10 мл) и тетрагидрофуране (20 мл) добавляли периодинан Десса-Мартина (1636 мг, 3,7 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали в течение 3,5 ч при температуре 0°C и 2,5 ч при комнатной температуре в атмосфере  $\text{Ar}$ . Затем добавляли 15%-ный раствор тиосульфата натрия в насыщенном растворе бикарбоната натрия, смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Промежуточное соединение 1 экстрагировали диэтиловым эфиром, после сушки над сульфатом натрия органический слой выпаривали досуха и очищали колоночной хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента и смесь растворителей толуол/этилацетат. Выход: 34% (белое твердое вещество).

Продукт: натриевая соль 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокс)этокс)этокс)этоксимино)-гексадекановой кислоты



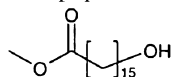
К раствору 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамина (146 мг, 0,65 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (3 мл) добавляли промежуточное соединение 1 (19,1 мг, 0,07 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре в атмосфере  $\text{Ar}$ . Затем смесь выпаривали досуха и очищали колоночной хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента и смесь растворителей дихлорметан/метанол/основание Хунига. Выход: 71% (белое твердое вещество).

Масс-спектрометрия (ESI):  $m/z=477,3529$  для  $[\text{M}+2\text{H}]^+$

Пример 5. Получение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокс)этокс)этокс)этоксимино)гексадекановой кислоты.

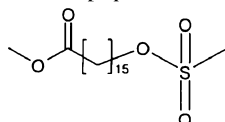
Аминоксидлинкер на основе метилового эфира жирной кислоты 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокс)этокс)этокс)этоксимино)гексадекановой кислоты синтезировали в соответствии с Hang et al. (J Am Chem Soc 2007; 129:2744-5) в трехстадийной реакции.

Промежуточное соединение 1. Метилвый эфир 16-гидроксигексадекановой кислоты



К охлажденному (0°C) раствору 16-гидроксигексадекановой кислоты (3000 мг, 10,79 ммоль) в безводном метаноле (27 мл) по каплям добавляли ацетилхлорид (3,837 мл, 53,96 ммоль) при 0°C в течение 2 мин, затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 ч в атмосфере  $\text{Ar}$ . Затем смесь выпаривали досуха, остаток растворяли в дихлорметане (100 мл), промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (1×50 мл). После сушки над сульфатом натрия собранный органический слой выпаривали досуха и сушили в вакууме при комнатной температуре. Выход: 92% (белое твердое вещество).

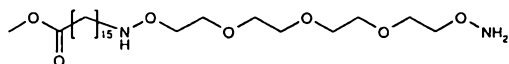
Промежуточное соединение 2. Метилвый эфир 16-метилсульфонилгексадекановой кислоты



К охлажденному раствору (0°C) промежуточного соединения 1 (2807 мг, 9,80 ммоль) в дихлорметане (40 мл) добавляли триэтиламин (1,502 мл, 10,78 ммоль), затем по каплям добавляли предварительно

охлажденный раствор (0°C) мезилхлорида (0,834 мл, 10,78 ммоль) в дихлорметане (5 мл) в течение 10 мин при 0°C. Смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C и в течение 2,75 ч при комнатной температуре. Затем смесь разбавляли дихлорметаном (150 мл), промывали водой (1×100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×100 мл) и насыщенным раствором NaCl (1×100 мл). После сушки над сульфатом натрия собранный органический слой выпаривали досуха и сушили в вакууме при комнатной температуре. Выход: 95% (бело-бледно-желтое твердое вещество).

Продукт: метиловый эфир 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты



К раствору 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диомина (517 мг, 2,30 ммоль) в безводном N,N-диметилформамиде (22 мл) по каплям добавляли раствор промежуточного соединения 2 (70 мг, 0,19 ммоль) в безводном N,N-диметилформамиде (7 мл) в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере Ar; смесь перемешивали в течение 2 дней при различных температурах (комнатной температуре, 50°C, 80°C) до завершения реакции. Затем смесь выпаривали досуха, неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией, используя силикагель в качестве разделяющего агента и смесь растворителей дихлорметан/метанол. Выход: 31% (бесцветное частично затвердевшее белое масло).

Масс-спектрометрия (ESI):  $m/z=493,3824$  для  $[M+H]^+$ .

Пример 6. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания VIII.

ЖК-rFVIII получали, используя двустадийную методику. На первой стадии rFVIII окисляли  $NaIO_4$  и очищали анионообменной хроматографией (АОХ). Затем окисленный rFVIII модифицировали ЖК-аминоксиреагентом.

rFVIII (45 мг исходного материала) окисляли  $NaIO_4$  (конечная концентрация 200 мкМ). После инкубирования в течение 30 мин (22°C) реакцию окисления останавливали добавлением 1М водного раствора L-цистеина (конечная концентрация: 10 мМ). Окисленный rFVIII очищали анионообменной хроматографией на EMD TMAE(M). Затем 25 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты (полученного в соответствии с примером 3) в ДМСО добавляли к элюату (концентрация белка 2 мг/мл) и осуществляли реакцию сочетания в течение 18 ч при 4°C. Затем конъюгат ЖК-rFVIII дополнительно очищали гидрофобной хроматографией на фенилсефарозе 4 FF. Наконец, элюат концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией, используя 30-кДа мембрану (MILLIPORE).

Пример 7. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания IX.

10 мг rFIX растворяли в реакционном буфере (20 мМ L-гистидина, 5 мМ  $CaCl_2$ , 150 мМ NaCl, pH 6,0) до конечной концентрации 2,5 мг/мл. К полученному раствору добавляли 5 мМ водный раствор  $NaIO_4$  с получением конечной концентрации 100 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 4°C при осторожном перемешивании в темноте. Затем смесь загружали в предварительно уравновешенные колонки для обессоливания PD-10 для удаления избытка  $NaIO_4$ . К указанной смеси добавляли 8 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты (полученного согласно примеру 3) в ДМСО и осуществляли реакцию сочетания при pH 6,0 в течение 18 ч при 4°C. Затем конъюгат дополнительно очищали ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Наконец, элюат концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией, используя устройства Vivaspin.

Пример 8. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания VIIa.

10 мг rFVIIa растворяли в реакционном буфере ((50 мМ Hepes, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) с получением конечной концентрации 2,0 мг/мл. К полученному раствору добавляли 5 мМ водный раствор  $NaIO_4$  с получением конечной концентрации 50 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 4°C при осторожном перемешивании в темноте. Затем смесь загружали в предварительно уравновешенные колонки для обессоливания PD-10 для удаления избытка  $NaIO_4$ . К указанной смеси добавляли 8 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты (полученного согласно примеру 3) в ДМСО и осуществляли реакцию сочетания при pH 6,0 в течение 18 ч при 4°C. Затем конъюгат дополнительно очищали ионообменной хроматографией на Q-сефарозе FF. Наконец, элюат концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией, используя устройства Vivaspin.

Пример 9. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания VIII.

10 мг rFVIII растворяли в Hepes-буфере (50 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) с получением концентрации белка 2 мг/мл. Затем к раствору FVIII добавляли 10 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой ки-

слоты (полученного в соответствии с примером 3) в ДМСО. Затем получали водный раствор нуклеофильного катализатора м-толуидина (50 мМ) и добавляли его к смеси в течение 15 мин с получением конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляли 40 мМ водный раствор периодата натрия с получением концентрации 400 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин в темноте при температуре 22°C при осторожном перемешивании.

Затем реакцию останавливали добавлением водного раствора L- цистеина (1М) с получением конечной концентрации в реакционной смеси 10 мМ и инкубированием в течение 60 мин. Затем реакционную смесь загружали в ионообменную колонку, заполненную Q-сефарозой FF (1,6×8 см). Колонку промывали уравнивающим буфером (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) в количестве 20 об. колонки и элюировали конъюгат ЖК-rFVIII буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,5М NaCl, pH 7,4). Наконец, продукт подвергали ультрафильтрации/диафильтрации на устройствах Vivaspin, используя Hepes-буфер, 7,4 (20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) в качестве буфера для диафильтрации.

Пример 10. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксизтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания IX.

7 мг rFIX растворяли в His-буфере (20 мМ His, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,0) с получением концентрации белка 2 мг/мл. Затем к раствору FIX добавляли 7 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксизтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)гексадекановой кислоты (полученного в соответствии с примером 3) в ДМСО. Затем получали водный раствор нуклеофильного катализатора м-толуидина (50 мМ) и добавляли его к смеси в течение 15 мин с получением конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляли 40 мМ водный раствор периодата натрия с получением концентрации 250 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин в темноте при температуре 22°C при осторожном перемешивании. Затем реакцию останавливали добавлением L-цистеина (конечная концентрация: 5 мМ) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Конъюгат ЖК-rFIX очищали анионнообменной хроматографией. Реакционную смесь разбавляли 10 мл буфера А (50 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) и наносили на 5-мл колонку HiTrap Q FF (GE Healthcare, Фэрфилд, штат Коннектикут, США), уравниваемую буфером А. Колонку промывали, используя этот же буфер в количестве 5 об. колонки. Затем колонку элюировали буфером В (50 мМ Hepes, 1М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Фракции, содержавшие конъюгат, концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией, используя 10-кДа мембрану из регенерированной целлюлозы. Конечную стадию диафильтрации выполняли против 20 мМ Hepes-буфера, pH 7,2, содержавшего 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Пример 11. Присоединение метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксизтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)гексадекановой кислоты к углеводной группе фактора свертывания VIIa.

10 мг rFVIIa растворяли в Hepes-буфере ((50 мМ Hepes, 150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0). Затем к раствору FVIIa добавляли 10 мкл 10% (мас./об.) раствора метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксизтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)гексадекановой кислоты (полученного в соответствии с примером 3) в ДМСО. Затем получали водный раствор нуклеофильного катализатора м-толуидина (50 мМ) и добавляли его к смеси в течение 15 мин с получением конечной концентрации 10 мМ. Наконец, добавляли 40 мМ водный раствор периодата натрия с получением концентрации 250 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин в темноте при температуре 22°C при осторожном перемешивании. Затем реакцию останавливали добавлением L-цистеина (конечная концентрация: 5 мМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Конъюгат ЖК-rFVIIa очищали анионнообменной хроматографией. Реакционную смесь разбавляли 10 мл буфера А (50 мМ Hepes, pH 7,4) и наносили на 5-мл колонку HiTrap Q FF (GE Healthcare, Фэрфилд, штат Коннектикут, США), уравниваемую буфером А. Колонку промывали, используя этот же буфер в количестве 5 об. колонки. Затем колонку элюировали буфером В (50 мМ Hepes, 1М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Фракции, содержавшие конъюгат, концентрировали ультрафильтрацией/диафильтрацией, используя 10-кДа мембрану из регенерированной целлюлозы. Конечную стадию диафильтрации выполняли против 20 мМ Hepes-буфера, pH 7,2, содержавшего 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Пример 12. Присоединение производного ЖК, содержащего активную аминоксигруппу, к окисленной углеводной группе в присутствии нуклеофильного катализатора.

Настоящее изобретение также обеспечивает присоединение производного ЖК, содержащего активную аминоксигруппу, к окисленному терапевтическому белку (например, белкам, изложенным в таблице в данном описании).

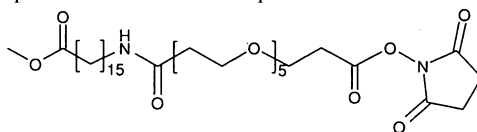
Для сочетания производного ЖК, содержащего аминоксигруппу, углеводные группы (преимущественно N-гликаны) терапевтического белка (например, ЕРО, Г-КСФ или инсулина; см. табл., концентрация: 0,5-3 мг/мл) сначала окисляли NaIO<sub>4</sub> (концентрация: 200 мкМ). Затем реакцию останавливали добавлением L-цистеина (конечная концентрация: 5 мМ), и разделяли реагенты ультрафильтрацией/диафильтрацией. После диафильтрации добавляли ЖК-аминоксид-реагент (т.е. производное ЖК) в 25-М избытке, и осуществляли реакцию сочетания при pH 6,0 в течение 1 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании в присутствии нуклеофильного катализатора м-толуидина (концентрация: 10 мМ). Затем реакционную смесь загружали в ионообменную (IEX) колонку. Колонку промывали





Метилловый эфир 16-азидгексадекановой кислоты подвергали каталитическому гидрированию в присутствии палладия/активированного угля в метаноле при 3 бар в течение трех часов с получением соответствующего амина (Zinic et al., Positionally Isomeric Organic Gelators: Structure-Gelation Study, Racemic versus Enantiomeric Gelators, and Solvation Effects, Chem. Eur. J. 2010; 16:3066-82).

Стадия 4. Получение линкера на основе NHS-жирной кислоты



Метилловый эфир 16-аминогексадекановой кислоты подвергали взаимодействию с коммерчески доступным NHS-ПЭГ-NHS (NHS-dPEG (4)-NHS/IRIS Biotech GmbH, Марктредвиц, Германия) в 1,4-диоксане при комнатной температуре в течение трех дней с получением линкера на основе NHS-жирной кислоты (Cline et al., The Aminolysis of N-Hydroxysuccinimide Esters. A Structure-Reactivity Study, JACS 1987; 109:3087-91).

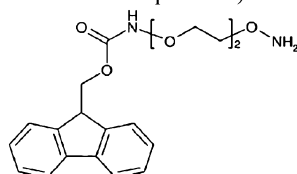
Пример 17. Оценка аналитических характеристик конъюгатов белок-ЖК.

Альбуминсвязывающие свойства образцов ЖК-rFVIII, rFIX или FVIIa, полученных в соответствии с примерами, описанными в данном описании, проверяли *in vitro* с помощью систем твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА). 96-луночный планшет покрывали поликлональными антителами против сывороточного альбумина человека (HSA). Следующей стадией являлось блокирование планшета для твердофазного ИФА PBS-желатиновым буфером. Затем с антителом связывали HSA с последующим связыванием образца ЖК-белок, разведенного до различных концентраций. Наконец, образец HSA-белок обнаруживали с помощью антител против факторов VIII, FIX или FVIIa, меченных пероксидазой. Пероксидазную активность обнаруживали, используя тетраметилбензидин (ТМБ) в качестве субстрата. Интенсивность развившегося окрашивания измеряли на ридере для твердофазного ИФА при 450 нм. Связывание образца ЖК-белок с HSA оценивали путем нанесения на график различных концентраций образца по оси x и соответствующих им величин поглощения по оси y.

Пример 18. Получение водорастворимого линкера на основе пегилированной жирной кислоты, содержащего аминоксигруппу.

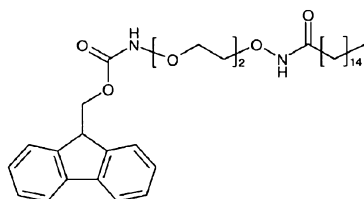
Линкер на основе жирной кислоты, содержащий цепь водорастворимого ПЭГ с аминоксигруппой в ω-положении, присоединенную к карбоксильной группе жирной кислоты, получали в ходе трехстадийного синтеза, используя 3-оксапентан-1,5-диоксиамин, как описано в примере 1.

Стадия 1. Получение N-(9-флуоренилметоксикарбонил)-3-оксапентан-1,5-диоксиамин



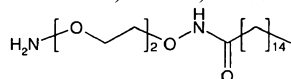
3-Оксапентан-1,5-диоксиамин подвергали взаимодействию с 9-флуоренилметилхлорформиатом в 1,4-диоксане при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор выпаривали при пониженном давлении, и неочищенный продукт очищали, используя хроматографию на силикагеле со смесью дихлорметан/метанол 20/1 (об./об.) в качестве растворителя, с получением чистого моно-FMOC-блокированного диоксиамин (Boturyn et al., Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA, Tetrahedron 1997; vol.53, № 15, 5485-92).

Стадия 2. Получение (2-(2-(N-(9-флуоренилметоксикарбонил)аминоокси)этокси)этокси)амида гексадекановой кислоты



N-(9-флуоренилметоксикарбонил)-3-оксапентан-1,5-диоксиамин подвергали взаимодействию с коммерчески доступным N-гидроксисукцинимидным эфиром пальмитиновой кислоты в ТГФ при комнатной температуре в течение ночи с получением конъюгата моно-FMOC-блокированной аминоксигруппы жирной кислоты (Jong et al., Synthesis of ceramides using N-hydroxysuccinimide esters, Journal of Lipid Research 1972; vol.13, 819-22).

Стадия 3. Получение (2-(2-аминооксиэтокси)этокси)амида гексадекановой кислоты



Конъюгат моно-FMOC-блокированной аминоксигирной кислоты подвергали взаимодействию с пиперидином в дихлорметане при комнатной температуре с получением линкера на основе деблокированной аминоксигирной кислоты в качестве конечного продукта (Boturyn et al., Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA, Tetrahedron 1997; vol.53, № 15, 5485-92).

Пример 19. Присоединение линкера на основе MAL-жирной кислоты к A1PI.

Линкер на основе жирной кислоты, содержащий MAL-группу, получали, как описано в примере 15, путем взаимодействия метилового эфира 16-гидроксигексадекановой кислоты с коммерчески доступной MAL-ПЭГ-COOH (mal-ПЭГ(12)-COOH/IRIS Biotech GmbH, Марктредвиц, Германия), используя реакцию Мицунобу. Указанный линкер присоединяли к свободной SH-группе A1PI.

10 мг очищенного A1PI (концентрация: 1 мг/мл) растворяли в реакционном буфере (20 мМ фосфата, 5 мМ ЭДТА, pH 7,0), и к раствору A1PI добавляли 10 мкл 5% (мас./об.) раствора линкера на основе MAL-жирной кислоты в ДМСО. Реакцию модификации проводили в течение 2 ч при комнатной температуре с последующей стадией гашения с использованием L-цистеина (конечная концентрация 10 мМ). После добавления L-цистеина реакционную смесь инкубировали при осторожном встряхивании в течение дополнительного часа при той же температуре. Модифицированный A1PI разбавляли уравнивающим буфером (25 мМ фосфата, pH 6,5) для коррекции проводимости раствора до значений <4,5 мСм/см и наносили на предварительно упакованную HiTrap Q FF (GE-Healthcare) с объемом колонки (CV) 5 мл. Затем колонку уравнивали 10 CV уравнивающего буфера (скорость потока: 2 мл/мин). Наконец, ПЭГ-A1PI элюировали линейным градиентом буфера для элюирования (25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl, pH 6,5).

Пример 20. Присоединение линкера на основе NHS-жирной кислоты к фактору свертывания VIII.

Линкер на основе жирной кислоты, содержащий NHS-группу, получали, как описано в примере 16, путем взаимодействия метилового эфира 16-гидроксигексадекановой кислоты с коммерчески доступным NHS-ПЭГ-NHS (NHS-dPEG(4)-NHS (IRIS Biotech GmbH, Марктредвиц, Германия). Указанный линкер присоединяли к свободным аминоксигруппам остатков лизина фактора свертывания VIII.

10 мг rFVIII растворяли в Hepes-буфере (50 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 5 мМ хлорида кальция, pH 6,0) с получением концентрации белка 2 мг/мл. Затем 10 мкл 10% (мас./об.) раствора линкера на основе NHS-жирной кислоты в ДМСО добавляли к раствору FVIII. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин в темноте при температуре 22°C при осторожном перемешивании. Затем реакцию останавливали добавлением водного раствора глицина (1M) с получением конечной концентрации в реакционной смеси 20 мМ. Смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре при осторожном перемешивании и затем наносили на ионообменную колонку, заполненную Q-сефарозой FF (1,6×8 см). Колонку промывали уравнивающим буфером (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) в количестве 20 об. колонки и элюировали конъюгат ЖК-rFVIII буфером В (20 мМ Hepes, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,5M NaCl, pH 7,4). Наконец, продукт подвергали ультрафильтрации/диафильтрации на устройствах Vivaspin, используя Hepes-буфер, 7,4 (20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) в качестве буфера для диафильтрации.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты, содержащий водорастворимое производное жирной кислоты, включающее жирную кислоту или эфир жирной кислоты, присоединенные к водорастворимому линкеру, причем указанное производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку, где водорастворимый линкер включает полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ, по меньшей мере одну аминоксигруппу, присоединенную к терапевтическому белку, и вторую аминоксигруппу, присоединенную к жирной кислоте или эфиру жирной кислоты, где жирная кислота включает цепь длиной C10-C24.

2. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, который связывает сывороточный альбумин человека (HSA) *in vitro* или *in vivo*, обладает повышенным временем полужизни по сравнению с нативным терапевтическим белком и в котором жирная кислота является насыщенной жирной кислотой или ненасыщенной жирной кислотой.

3. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.2, где жирная кислота является жирной кислотой с разветвленной цепью.

4. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

5. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота присоединена к водорастворимому линкеру по группе жирной кислоты, выбранной из группы, состоящей из концевой карбоксильной группы и ω-группы, в которой ω-группа выбрана из группы, состоящей из гидроксила, amino-, тио- и карбоксила.

6. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

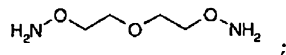
7. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где сложный эфир жирной кислоты выбран из группы, состоящей из метилового эфира и этилового эфира.

8. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.7, где сложный эфир жирной кислоты представляет собой метиловый эфир 16-гидроксигексадекановой кислоты.

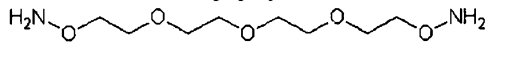
9. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

10. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.9, где водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

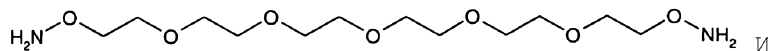
а) 3-оксапентан-1,5-диоксамина формулы



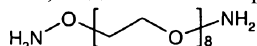
b) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамин формулы



с) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



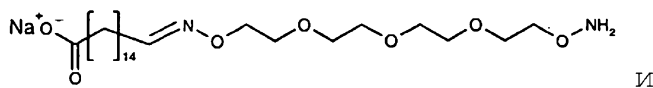
d) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



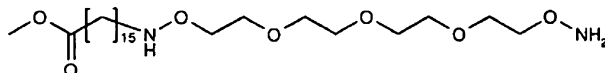
11. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где производное жирной кислоты стабильно присоединено к терапевтическому белку посредством оксимной связи, где оксимная связь образована между оксимной группой водорастворимого линкера и альдегидной группой окисленного углевода в составе терапевтического белка.

12. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где производное жирной кислоты выбрано из группы, состоящей из:

а) натревой соли 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этоксиимино)гексадекановой кислоты формулы



б) метилового эфира 16-(2-(2-(2-(2-аминооксиэтокси)этокси)этокси)этоксиамино)гексадекановой кислоты



13. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, где терапевтический белок представляет собой гликопротеин или терапевтический белок, гликозилированный *in vitro*, и выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX), фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЕРО, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбопоэтина (ТРО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопэтинподобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопэтинподобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопэтинподобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопэтинподобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопэтинподобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопэтинподобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопэтинподобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка 1A, рецептора костного морфогенетического белка 1B, рецептора костного морфогенетического белка II, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, crip1, crip2, crip3, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\beta$ , фактора роста эндотелиальных клеток  $\beta$ , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробла-

стов 8b, фактора роста фибробластов 8с, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha 1$ , рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha 2$ , белка, связанного с ростом, белка  $\alpha$ , связанного с ростом, белка  $\beta$ , связанного с ростом, белка  $\gamma$ , связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкозингибирующего фактора, рецептора  $\alpha$  лейкозингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропозтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина M (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , трансформирующего фактора роста  $\beta 1.2$ , трансформирующего фактора роста  $\beta 2$ , трансформирующего фактора роста  $\beta 3$ , трансформирующего фактора роста  $\beta 5$ , латентного трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопозтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PLA2), инсулина, лектина, рибина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбозина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, адалимумаба, деносумаба, этанерцепта, белка из таблицы.

14. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FVIIa.

15. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FVIII.

16. Конъюгат терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.13, где терапевтическим белком является FIX.

17. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий:

а) окисление  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты с получением альдегидной группы в составе жирной кислоты;

б) присоединение водорастворимого линкера, включающего (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминоксигруппу, к указанной альдегидной группе с образованием стабильной оксимной связи, таким образом получая производное жирной кислоты; и

с) конъюгирование производного жирной кислоты с окисленной углеводной группой терапевтического белка;

причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде; где  $\omega$ -гидроксигруппу окисляют окислителем, выбранным из группы, состоящей из периодинового реагента Десса-Мартина, реагента Темпо, оксалилхлорида/ДМСО, тетрапропиламмонийперрутената (TPAP) и реагентов на основе хрома (VI) (реагента Коллинза, пиридинийхлорхромата (PCC) и бихромата пиридиния); где жирной кислотой является насыщенная жирная кислота или ненасыщенная жирная кислота.

18. Способ по п.17, в котором жирной кислотой является жирная кислота с разветвленной цепью.

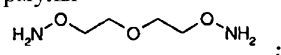
19. Способ по п.17, в котором жирная кислота включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

20. Способ по п.19, в котором жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

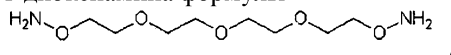
21. Способ по п.17, в котором ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

22. Способ по п.21, в котором водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

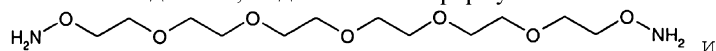
а) 3-оксапентан-1,5-диоксида формулы



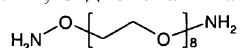
b) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



c) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



d) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



23. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий:

- этерификацию карбоксильной группы жирной кислоты с получением эфира жирной кислоты;
- активацию  $\omega$ -гидроксигруппы жирной кислоты с получением мезильной группы в составе жирной кислоты со стадии а);
- присоединение водорастворимого линкера, включающего (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминоксигруппу, путем замещения мезильной группы со стадии б) с образованием стабильной оксиимин-метиленовой связи, таким образом получая производное жирной кислоты; и
- конъюгирование производного жирной кислоты с окисленной углеводной группой терапевтического белка;

причем указанное производное жирной кислоты растворимо в воде; где карбоксильную группу этерифицируют этерифицирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из ацетилхлорида, метанола в присутствии кислоты, этанола в присутствии кислоты, diazometana и метилиодида; где  $\omega$ -гидроксигруппу активируют активирующим агентом, выбранным из группы, состоящей из мезилхлорида, тозилхлорида и нозилхлорида; и где жирная кислота представляет собой насыщенную жирную кислоту или ненасыщенную жирную кислоту.

24. Способ по п.23, в котором жирная кислота является жирной кислотой с разветвленной цепью.

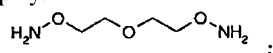
25. Способ по п.23, в котором жирная кислота включает цепь, выбранную из группы, состоящей из C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22 и C24.

26. Способ по п.25, в котором жирная кислота представляет собой 16-гидроксигексадекановую кислоту.

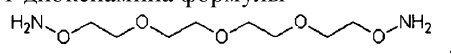
27. Способ по п.23, в котором ПЭГ включает цепь длиной, выбранной из группы, состоящей из O3, O5, O7, O9, O11, O13 и O15.

28. Способ по п.27, в котором водорастворимый линкер выбран из группы, состоящей из:

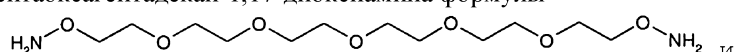
a) 3-оксапентан-1,5-диоксиамины формулы



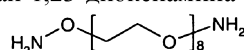
b) 3,6,9-триоксаундекан-1,11-диоксиамины формулы



c) 3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1,17-диоксиамины формулы



d) 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диоксиамины формулы



29. Способ получения конъюгата терапевтического белка и производного жирной кислоты по п.1, включающий контакт окисленной углеводной группы терапевтического белка с производным жирной кислоты в условиях, обеспечивающих конъюгирование;

причем указанную углеводную группу окисляют путем инкубирования с буфером, включающим окислитель, выбранный из группы, состоящей из периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ), тетраацетата свинца ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ) и перрутеноата калия ( $\text{KRuO}_4$ );

где производное жирной кислоты включает жирную кислоту или эфир жирной кислоты, присоединенные к водорастворимому линкеру, включающему (i) полиэтиленгликоль (ПЭГ) или разветвленный ПЭГ и (ii) активную аминоксигруппу;

где между окисленной углеводной группой и активной аминоксигруппой производного жирной кислоты образуется оксимная связь;

где образование указанной оксимной связи катализируется нуклеофильным катализатором, выбранным из группы, включающей анилин, о-аминобензойную кислоту, м-аминобензойную кислоту, п-аминобензойную кислоту, сульфаниловую кислоту, о-аминобензамид, о-толуидин, м-толуидин, п-толуидин, о-анизидин, м-анизидин и п-анизидин.

30. Способ по п.29, в котором терапевтический белок представляет собой гликопротеин или терапевтический белок, гликозилированный *in vitro*, и выбран из группы, состоящей из фактора IX (FIX),

фактора VIII (FVIII), фактора VIIa (FVIIa), фактора Виллебранда (ФВ), фактора FV (FV), фактора X (FX), фактора XI (FXI), фактора XII (FXII), тромбина (FII), белка C, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора (TF), протеазы ADAMTS 13, IL-1-альфа, IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующего фактора-1 (КСФ-1), М-КСФ, SCF, ГМ-КСФ, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), ЕРО, интерферона-альфа (IFN-альфа), консенсусного интерферона, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-31, IL-32-альфа, IL-33, тромбопоэтина (ТРО), Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ангиопозтин-подобного полипептида 1 (ANGPTL1), ангиопозтин-подобного полипептида 2 (ANGPTL2), ангиопозтин-подобного полипептида 3 (ANGPTL3), ангиопозтин-подобного полипептида 4 (ANGPTL4), ангиопозтин-подобного полипептида 5 (ANGPTL5), ангиопозтин-подобного полипептида 6 (ANGPTL6), ангиопозтин-подобного полипептида 7 (ANGPTL7), витронектина, фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ангиогенина, активина А, активина В, активина С, костного морфогенетического белка-1, костного морфогенетического белка-2, костного морфогенетического белка-3, костного морфогенетического белка-4, костного морфогенетического белка-5, костного морфогенетического белка-6, костного морфогенетического белка-7, костного морфогенетического белка-8, костного морфогенетического белка-9, костного морфогенетического белка-10, костного морфогенетического белка-11, костного морфогенетического белка-12, костного морфогенетического белка-13, костного морфогенетического белка-14, костного морфогенетического белка-15, рецептора костного морфогенетического белка IА, рецептора костного морфогенетического белка IВ, рецептора костного морфогенетического белка II, нейротрофического фактора головного мозга, кардиотрофина-1, цилиарного нейротрофического фактора, рецептора цилиарного нейротрофического фактора, crip1, crip2, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\alpha$ , цитокин-индуцируемого фактора хемотаксиса нейтрофилов 2 $\beta$ , фактора роста эндотелиальных клеток  $\beta$ , эндотелина 1, эпидермального фактора роста, эпигена, эпирегулина, эпителиального аттрактанта нейтрофилов, фактора роста фибробластов 4, фактора роста фибробластов 5, фактора роста фибробластов 6, фактора роста фибробластов 7, фактора роста фибробластов 8, фактора роста фибробластов 8b, фактора роста фибробластов 8c, фактора роста фибробластов 9, фактора роста фибробластов 10, фактора роста фибробластов 11, фактора роста фибробластов 12, фактора роста фибробластов 13, фактора роста фибробластов 16, фактора роста фибробластов 17, фактора роста фибробластов 19, фактора роста фибробластов 20, фактора роста фибробластов 21, кислого фактора роста фибробластов, основного фактора роста фибробластов, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 1, рецептора глиального нейротрофического фактора  $\alpha$ 2, белка, связанного с ростом, белка  $\alpha$ , связанного с ростом, белка  $\beta$ , связанного с ростом, белка  $\gamma$ , связанного с ростом, гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста, фактора роста гепатоцитов, рецептора фактора роста гепатоцитов, гепатомного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста I, рецептора инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобного фактора роста II, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, фактора роста кератиноцитов, лейкоз-ингибирующего фактора, рецептора  $\alpha$  лейкоз-ингибирующего фактора, фактора роста нервов, рецептора фактора роста нервов, нейропозтина, нейротрофина-3, нейротрофина-4, онкостатина М (OSM), плацентарного фактора роста, плацентарного фактора роста 2, тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток, тромбоцитарного фактора роста, А-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста AA, тромбоцитарного фактора роста AB, В-цепи тромбоцитарного фактора роста, тромбоцитарного фактора роста BB, рецептора  $\alpha$  тромбоцитарного фактора роста, рецептора  $\beta$  тромбоцитарного фактора роста, фактора, стимулирующего рост предшественников В-клеток, фактора стволовых клеток (SCF), рецептора фактора стволовых клеток, ФНО, ФНО0, ФНО1, ФНО2, трансформирующего фактора роста  $\alpha$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ , трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1.2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 3, трансформирующего фактора роста  $\beta$ 5, латентного трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1, белка I, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка II, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белка III, связывающего трансформирующий фактор роста  $\beta$ , лимфопоэтина стромы тимуса (TSLP), рецептора I типа фактора некроза опухолей, рецептора II типа фактора некроза опухолей, рецептора активатора плазминогена урокиназного типа, фосфолипаза-активирующего белка (PUP), инсулина, лектина, рицина, пролактина, хориогонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, тканевого активатора плазминогена, IgG, IgE, IgM, IgA и IgD,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, ДНКазы, фетуина, лютеинизирующего гормона, эстрогена, инсулина, альбумина, липопротеинов, фетопротеина, трансферрина, тромбопоэтина, урокиназы, интегрина, тромбина, лептина, адалимумаба, деносуаба, энбрела этанерцепта, белка из таблицы.

31. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FVIIa.

32. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FVIII.

33. Способ по п.30, в котором терапевтическим белком является FIX.

34. Способ по п.17, в котором окислителем является периодинан Десса-Мартина.

