



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 98604
 (22) Заявено на 28.02.94
 (24) Начало на действие
 на патента от: 25.03.98

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
 бюлетин № на
 (45) Отпечатано на 30.04.99
 (46) Публикувано в бюлетин № 1
 на 29.01.99
 (56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
 BASF AKTIENGESELLSCHAFT
 LUDWIGSHAFEN (DE)

(72) Изобретател(и):
 Manfred Kurfuerst, Hassloch
 Klaus Ruebsamen, Neustadt
 Bernhard Schmied, Frankenthal
 Wolfgang Koerwer, Gruenstadt
 Juergen Schweden, Deidesheim
 Hans Wolfgang Hoeffken
 Ludwigshafen (DE)

(74) Представител по индустриална
 собственост:
 Правда Георгиева Бойкова,
 1000 София, ул. "Хан Аспарух" 26

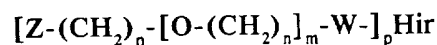
(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

Издава се съгласно §4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на: EP 0502962 от 13.03.96

(54) ХИРУДИНМУТЕИНИ И ТЕХНИ ПОЛИАЛКИЛЕНГЛИКОЛОВИ КОНЮГАТИ

(57) Изобретението се отнася до нови хирудинмутеини и техни полиалкиленгликолови конюгати с формула



и до метод за получаването им. Съединенията са подходящи за профилактика и лечение на сърдечносъдови заболявания.

16 претенции, 2 фигури

(54) ХИРУДИНМУТЕИНИ И ТЕХНИ ПОЛИАЛКИЛЕНГЛИКОЛОВИ КОНЮГАТИ**Област на техниката**

Изобретението се отнася за нови хирудинмутеини и техните полиалкиленгликолови конюгати, тяхното получаване и използването им както за профилактика и лечение на сърдечносъдови заболявания, така също и за модифициране на макромолекулни носители.

Предшествващо състояние на техниката

Хирудинът е отдавна известен, природно разпространен протеин със свойството да препятства съсирването на кръвта. Той е най-силният и най-селективен от досега известните инхибитори на тромбина (*Naturwissenschaften* (1955) 42, 537; *Hoppe-Seylers Z. für Biol. Chemie* (1985) 366, 379). Този полипептид, който се изолира от кръвен гел от *Hirudo medicinalis*, се състои от 65 аминокиселини, съдържа три дисулфидни моста и е сулфатиран в положение тирозин 63. Освен това, съществуват още няколко природно разпространени изоформи, които се различават от първоначалния хирудин по размяната на аминокиселини в различни положения. (*Folia Haematol.* (1988), 115, 30). Също така, познати са гентехнологично получени варианти (*Biochemistry* (1988), 27, 6517; *FEBS-Lett.* (1988), 229, 87). Хирудинът и различните варианти са достъпни днес по гентехнологичен път, при което у получените чрез гентехнологични методи хирудини липсва сулфатния остатък при аминокиселината Тир 63 (*Biochemistry* (1989), 28, 2941; *DNA* (1986), 5, 511). Добрата физиологична поносимост на тези инхибитори на кръвосъсирването също е известна от дълго време (*Pharmazie* (1981), 10, 653).

Въпреки достатъчните си фармакодинамични свойства, хирудинът, поради минималната стойност на полуживот в кръвта от около 50 min, е по-малко подходящ за продължително терапевтично приложение. Известно е, че времето на полуживот на протеините може да

се удължи чрез конюгиране с макромолекули /*J. Biol. Chem.* (1977), 252, 3582; *Biochim. Biophys. Acta* (1981), 660, 293/. Често след такова получаване на производни, например с полиетиленгликол, се наблюдава значително влошаване на ензимната активност, което силно ограничава приложимостта на такива модифицирани протеини /*Cancer Treat. Rep.* (1979), 63, 1127; *Chemistry Lett.* (1980), 773/. В случая с хирудина напоследък е показано от Walsmann, че чрез свързване с декстран може да се постигне ясно удължаване на времето на полуживот от около 50 min на повече от 7 h, обаче с драстична загуба на активност (*Pharmazie* (1989), 44, 72). Терапевтичното приложение на такива декстрин-хирудини е в противоречие, въпреки достатъчно удълженото време на полуживот, с твърде ниския добив на продукта, драстично намалената специфична активност, както и с възможно свързаните с това промени на фармакодинамичните свойства.

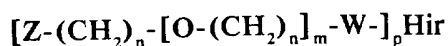
Конюгиране на протеини с макромолекули се постига често чрез реакция на карбоксилните групи на аспарагинова или глутаминова киселина чрез реакция на сулфхидрилната група на аминокиселината цистеин или чрез взаимодействие на аминокиселините от страничните вериги на аминокиселината лизин от съответния протеин. Често обаче точно споменатите аминокиселини са от съществено значение за функцията на съответните протеини. Получаването на производни от един протеин може да бъде свързано с промяна на физикохимичните или ензимните свойства дори до инактивиране. Хирудинът съдържа няколко остатъка от аспарагинова киселина и глутаминова киселина, главно в С-крайната област на молекулата. Лизиновите остатъци се намират в положения 27, 36 и 47 в хирудиновата молекула. Въз основа на това може да се мисли за свързване през С-края или N-края на молекулата. Известно е обаче, че както киселите аминокиселини от С-крайна област (*FEBS Lett.* (1983), 164, 307-313), така и основните лизинови остатъци, по-специално силно експонирания в молекулата лизинов остатък № 47, участват решаващо във взаимодействието на

хирудина с протеазата тромбин (Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1985), 366, 379-385). Реакциите в N-края, като например удължаване (Biochemistry (1989), 28, 10079), водят до драстично намаление на инхибиращата активност на хирудина. Въз основа на това не може да се очаква, че получаването на производни на хирудин може да се постигне без значителна загуба на активност. Това очакване е ясно потвърдено от проведените от Walsmann (Pharmazie (1989), 44, 72) опити за получаване на производни на лизиновия остатък на хирудина с декстран.

Поради големия брой кисели аминокиселини при конюгиране на макромолекули с карбоксилните странични вериги на хирудина не може да се очаква хомогенен продукт. Дори при получаване на производно само на основните функции на полипептида, се очаква смес до около 32 различни съединения. При моно-, ди- и тризаместените производни е допустимо голямо число позиционни изомери, които се приличат по физични и химични свойства, но се различават по биологичната си активност. Дори ако по-големият брой теоретично допустими конюгати допринасят само в следи за общата смес, трябва да се очакват значителни проблеми при разделянето на един нехомогенен продукт.

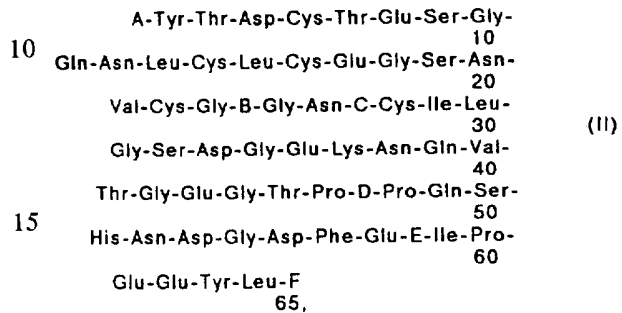
Техническа същност на изобретението

Намерено е, че конюгирането на полиалкиленгликолови производни чрез вмъкване на подходящи хирудинмутеини може да се управлява толкова добре, че да може да се получи с приемливи разходи за пречистване химически еднородно хирудин-полимерно производно. Изненадваща е констатацията, че конюгати с формула I от полиалкиленгликол или полиалкиленгликолови производни с инхибиращи кръвосъсирването хирудинмутеини



където Z означава един от остатъците -OH, -NH₂, -NH-CO-R, -O-R или -O-CO-R (R означава C₁-C₄-алкилова група), n има стой-

ност 2, 3 или 4, m има стойност от 50 до 500, W е директна ковалентна връзка или свързваща група, p има стойност 1, 2 или 3 и Hir означава свързан чрез аминокгрупата(ите) на лизиновата странична(и) верига(и) с Z-(CH₂)_n-[O-(CH₂)_m]-W-остатък(ците) полипептид с формула II



в която

- 20 A = Val-Val,
= Ile-Thr,
= Leu-Thr или
25 = Pro-Val,
B = Gln или Glu,
C = Lys, Arg или Asn,
D = Lys, Arg, Asn или Gln,
30 E = Glu или Pro,
F = Asp или Gln,

при което в полипептида с формула II една или повече аминокиселини в положения 30-38 са заменени или делетиранни и се съдържат два допълнителни лизинови остатъка чрез заместване на една от наличните аминокиселини в положения 30-38, притежават ясно удължена бионаличност, при което биологичната активност остава напълно или в много голяма степен запазена.

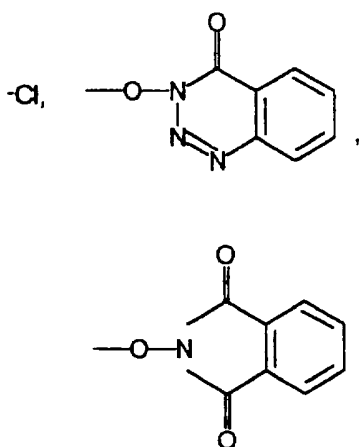
Изобретението се отнася още до полипептидите с формула II.

45 С оглед на по-просто провеждане на реакцията и химически еднороден продукт, изгодно е лизиновите остатъци, при които взаимодействието е PEG не е желано, да се заместят с други, по-слаби нуклеофилни аминокиселини. Като особено подходящо се оказва при посочените мутеини замяната на Lys 47 с

Arg 47 или също Gln 47. Съответните продукти на свързване PEG-мутеин имат подобни високо специфични активности както мутеин, от който не са получавани производни. Чрез броя на наличните, съответно нововъведените лизинови остатъци, може да се влияе на частта на свързаните полимери и с това на молекулното тегло на конюгата.

Такива хирудинмутеини могат да се получат много добре по гентехнологичен път. Най-напред се получават синтетично кодиращите за съответния мутеин нуклеинови киселини. Тези синтетични гени след това могат да бъдат снабдени с подходящи регулиращи последователности (промотор, терминатор и пр.) и да се приведат към експресия в хетерологови системи (FEBS-Lett. (1986), 202, 373; Biol. Chem. Hoppe-Seyley (1986), 367, 731). Експресията може да се осъществи в еукариотни системи (клетки на бозайници, дрожди или нишковидни гъби) или в прокариотни системи (E. coli, Bacilli и т.н.). Експресията в E. coli се извършва за предпочитане чрез слят протеин, от който хирудинът може да се освободи и след това да се активира (DNA (1986), 5, 511). В следващите примери е описано получаването само на един от претендираните съгласно изобретението мутеини, като останалите се получават аналогично.

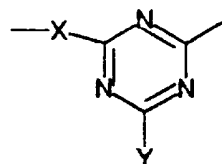
Като свързващи групи W се имат пред-



като Q означава 1-3 халогенни атоми или 1-2 нитрогрупи или ацетилна група и R има значение на метил, етил, норм-пропил,

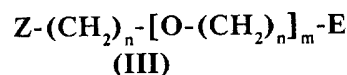
вид следните групи:

-X-CO-; -X-CO-NH-U-NH-CO-; -X-CO-CH₂-CH₂-CO-; -X-CH₂-CO- или

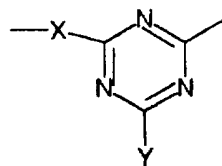


в които X означава -S-, -O-, -NH-, U - C₂-C₆-алкиленова група или p-фениленова група и Y - -Cl-, -OH, или H.

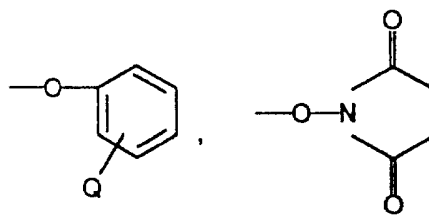
Новите хирудинполиалкиленгликолови производни могат да се получат при взаимодействие на хирудинмутеини с формула II с полиалкиленгликолови производни с формула III



в която Z, m и n имат посочените значения, и E е един от остатъците -X-CO-V, -X-CO-NH-U-N=C=O, -X-CO-CH₂-CH₂-CO-V, -X-CH₂-CO-V,



или -O-SO₂-R, като X, U и Y имат посочените значения, а V означава



изопропил, фенил, толил или тресил.

Взаимодействието на съединение с формула III с хирудинмутеини се осъществява как-

то следва.

Активирианият полиалкиленгликол с формула III взаимодейства с хирудинмутеин в стехиометрични количества или в излишък в подходящ буфер (рН 6-10), във вода, в даден случай при прибавка на помощна основа, като натриев или калиев карбонат или хидрогенкарбонат, алкален хидроксид, триетиламин, N-метилморфолин, диизопропиламин или пиридин в органичен разтворител (метанол, етанол, изопропанол, ацетонитрил, диметилформамид, N-метилпирилодон, дихлорометан, диметилсулфоксид, тетраhydroфуран, 1,4-диоксан, толуен) или в смес от споменатите разтворители, при температури от -20 до 100°C, за предпочитане при температури от 0 до 60°C. Получените конюгати се изолират и се пречистват и характеризират с обичайните за химията на протеините методи.

Описаните съгласно изобретението конюгати на полиалкиленхирудинмутеин показват в сравнение с хирудина задоволителен фармакологичен профил на действие. Те имат не само благоприятните фармакодинамични свойства на хирудините, но показват освен това и значително удължено биологично действие и по-добра бионаличност. Освен това, полиалкилгликолхирудинмутеиновите конюгати показват отчетливо минимална антигенност в сравнение с хирудина. Въз основа на тези си свойства описаните полиалкиленови конюгати превъзхождат хирудина, хепарина и нискомолекулния хепарин при терапията и профилактиката на тромбоемболични заболявания. Те могат да се прилагат много успешно например при инфаркт на миокарда, при дълбоки тромбози на вените, заболявания с периферни артериални запушвания, белодробна емболия, както и при екстракорпорално кръвообращение например хемодиализа или кардиопулмонарен байпас. Освен това полиалкиленгликолхирудинмутеиновите конюгати могат да се прилагат за препятстване на реоклузия след повторно отваряне на артериални съдове чрез механични методи или лиза. Новите хирудинмутеин-полиалкиленгликолови производни могат да бъдат успешно въведени за насляване на изкуствени повърхности, както например мем-

брани за хемодиализа и изискващите се за това системи от маркучи, при заместване на съдове или при апарати сърце-бял дроб.

Съединенията съгласно изобретението могат да се дават по обичайния начин орално или парентерално (подкожно, венозно, мускулно, интраперитонеално).

Дозирането зависи от възрастта, състоянието и теглото на пациента, както и от начина на приложение. Според формата на приложение и индикациите обикновената доза на действащото вещество възлиза по правило на от 20 до 40 000 ATU/kg телесно тегло.

Новите съединения могат да се прилагат в употребяваните галенични форми на приложение в твърдо или течено състояние, например като разтвори, мази, кремове или спрейове. Те се получават по обичайния начин. При това действащите вещества могат да се преработват с обичайните помощни вещества като пълнители, консерванти, регулиращи течливостта средства, омокрящи, диспергиращи, емулгиращи средства, разтворители и изтласкващи газове (виж H. Sucker et al., Pharmazeutische Technologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1978).

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Получаване на хирудинмутеини.

а) Конструирание на векторите

Протеин А-векторът pRIT 2T (фиг.1) е търговско достъпен и подробно описан (Pharmacia, номер за поръчване № 27-4808-01). С негова помощ могат да се получат пептиди и протеини, като слят протеин с протеин А, от *Staphylococcus aureus* в *E. coli*. За целта е необходимо нуклеиновите киселини, които трябва да се експресират, да се вмъкнат в полилинкера на вектора pRIT 2T при запазване на четящата система на протеин А. pRIT 2T ДНК се отрязва с рестрикционни ендонуклеази EcoRI и Sal II съгласно указанията на производителя, отрязъкът се разделя на нискотопящ се агарозен гел и по-големият фрагмент от вектора се изолира от гела в чиста форма. Основната техника на генната технология, както

и подробни указания за работа, се намират в Sambrook et al., (1989) "Molecular cloning" 2nd edition, CSH-Press.

б) Кодиращите последователности за претендираните съгласно изобретението хирудинмутеини се синтезират с помощта на апарат за ДНК-синтеза от фирма Applied Biosystems, модел 380А съгласно предписание и с химикали от производителя. Пълната кодираща област се съставя от 3 частични последователности до по две комплементарни олигонуклеотиди. Комплементарните един на друг олигонуклеотиди се подават заедно, нагряват се 5 min

5

10

при 90°C и се охлаждат в интервал от 30 min до стайна температура. Получените при това фрагменти с две разклонения се киназират в техните 5'-краища и се лигираат заедно. Така образуваният хирудинов ген може да се вмъкне в EcoRI и Sal I положенията на линеаризиращия експресиращ вектор pRIT 2T в правилно ориентиране и при запазване на четящата система на протеина А.

За получаване на различни мутеини се комбинират едни с други следните последователности (фиг.2):

HL 11A	1A+2A+3A	Ser32→Lys32 Asp33→Asn33 Glu35→Gln35
HL 11B	1A+2A+3B	Ser32→Lys32 Asp33→Asn33 Glu35→Gln35 Lys47→Arg47
HL 12A	1A+2B+3A	Asp33→Lys33 Glu35→Gln35
HL 12B	1A+2B+3B	Asp33→Lys33 Glu35→Gln35 Lys47→Arg47
HL 14A	1A+2C+3A	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36
HL 14B	1A+2C+3B	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36 Lys47→Arg47
HL 14C	1A+2C+3C	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36 Lys47→Gln47

Получените след лигирането химерни плаزمиди (pRIT 2T-Hir) се трансформират за ДНК-амплификация в ламдализогенен *E. coli* щам № 4830-1 (Pharmacia, № за поръчка 27-4808-01), ДНК се изолира от отделните клонове и се анализира чрез ДНК-секвенционен анализ за наличие на правилната последователност.

Пример 2. Експресия на слетия протеин.

Съответният експресионен плазмид pRIT 2T-Hir се трансформира в щам *E. coli* № 4830. Този щам съдържа хромозом на термочувствителния ламбда-репресор Cl 857.

В ерленмаерова колба с дефлектор се стерилизират 100 ml MIM-среда (MIM = 32 g триптон, 20 g екстракт от дрожди, 6 g Na_2HPO_4 , 3 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl на литър и 0,1 mM MgSO_4 , както и 0,001 mM FeCl_3) и се прибавя ампицилин (до 100 $\mu\text{g/ml}$). Средата се инокулира с 1 ml прясна култура на една нощ от щам pRIT 2TA-Hir/№ 4830-1 и при разклащане се инкубира при 28°C, докато абсорбцията при 550 nm стане 0,6. Тогава се прибавят 100 ml затоплена до 65°C прясна MIM-среда и още 4 h се инкубира при 42°C. През това време се синтезира желаният слят протеин. Чрез прибавяне на лизозим до 75 mg/ml и инкубация (3 h, 37°C) се отстраняват по ензимен път клетъчните стени. След това клетките се изключват механично (преса на Maptop-Gaulin, цикъл на замразяване, силно разбъркване) чрез топлинен шок при 80°C или хипотонно лизиране и разтворимият слят протеин се освобождава в средата.

Пример 3. Пречистване на слетия протеин.

Клетъчните отломки се отстраняват чрез центрофугиране и бистрата надутаечна течност се изпомпва в IgG-сефарозна колона (IgG-Sepharose®6 "Fast Flow", Pharmacia, № за поръчка 17-0969-01). Съхранението на материалите за колоната, подготовката и поставянето на колоната, условията на нанасяне и елуиране се изпълняват по данни на производителя. Така за 6 l Uberstand се прилага слой от гел 200 ml и скорост на елуиране от около 3 l/h. При този етап слетият протеин се свързва обратно с гелната матрица посредством не-

говата IgG-свързваща протеин А част (добив около 95%). След нанасянето колоната се промива с 10 об. спрямо слоя TST (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl и 0,05% Tween®20). Елуирането се извършва с 0,5 M ацетатен буфер pH 2,8.

Пример 4. Отцепване на слетия протеин.

Елуатът от колоната от пример 3 се лиофилизира и се съхранява при -20°C. За отцепването елуатът се разбърква със 70%-на мравчена киселина до концентрация на протеин от около 25 g/l. След промиване с аргон за отцепването на хирудинмутеина се прибавя 1 g BrCN във вид на твърдо вещество за г слят протеин. Отцепването се осъществява под аргон при 37°C за около 4 h. Излишъкът от бромшиан, разтворителят и други летливи съставки се отстраняват чрез лиофилизация. Накрая се промива три пъти с вода.

Пример 5. Ренатуриране и пречистване на хирудинмутеините.

Леофилизатът се смесва до 1-100 mg/ml протеин с 6M гуанидин-солна киселина, 0,1 M Tris-HCl pH 5, 02 MDTT. След инкубиране в продължение на 2 h пробата се обезсолява чрез G-10-изключваща хроматография (еквилибриране с 10 mM HCl). Обезсолената проба се разрежда 1:20 в 0,1 M Tris/HCl, 5 mM GSH/0,5 mM GSSG, 1 mM EDTA, pH 8,7 и се инкубира 1 h (GSH е редуциран и GSSH оксидиран глутатион). Чрез тази обработка нараства специфичната активност на хирудинмутеините с фактор около 3-5. След коригиране на pH стойността на 7,6 с HCl, прибавяне на NaCl до 150 mM и Tween®20 до 0,05%, се повтаря хроматографията на IgG-сефароза (пример 3). Докато слетият партньор на протеин А и неразпаденият слят протеин се свързват с колоната, активните хирудинмутеини минават в елуата с чистота, по-голяма от 90%. Чрез класическите методи на протеиновата химия се пречистват по-нататък до клинична чистота.

Пример 6. Получаване на метокси-полиетиленгликол (8000)-N-сукцинимидокарбонати.

а) N-сукцинимидо-хлороформиат

В разтвор на около 30 g фосген в 200 ml дихлорметан при 0°C в течение на 30 min се

вносят 21,0 g калиева сол на N-хидроксисукцинимид и сместа се разбърква 2 h при 0°C. След това, през суспензията се прокарва в продължение на 1 h азот, за да се продуха излишният фосген (промивна кула). Суспензията се филтрира и филтратът се концентрира под вакуум до сухо. N-сукцинимидо-хлороформиатът, 10,6 g, представлява жълтеникаво масло и е онечистен с неорганични соли и дисукцинимидокарбонат. Суровият продукт може да взаимодейства с полиалкиленгликол без допълнително пречиствани или може да се освободи от неорганичните соли чрез разтваряне в 150 ml диетилов етер, филтриране и отново концентриране.

b) метокси-полиетиленгликол(8000)-N-сукцинимидокарбонат

10,0 g метокси-PEG(8000)-ОН се разтварят в 20 ml сух пиридин чрез леко затопляне. След охлаждане до стайна температура разтворът взаимодейства при стайна температура с 890 mg N-сукцинимидо-хлороформиат и се разбърква в продължение на една нощ. След прибавяне на излишък от диетилов етер сместа се разбърква 30 min на ледена баня, изпадналото твърдо вещество се филтрира, прекристализира се два пъти из изопропанол, утаява се из диетилов етер, филтрира се и се суши. Получават се 10 g метокси-полиетиленгликол(8000)-N-сукцинимидокарбонат под формата на безцветно твърдо вещество.

Пример 7. Получаване на метокси-полиетиленгликол(8000)-4-нитрофенилкарбонат.

a) 4-нитрофенилформиат

В суспензия от 20,0 g нитрофенол в 60 ml толуен се вкарват при 0°C около 43 g фосген-газ. Сместа се разбърква 4-5 h при 0°C. След това при -15°C бавно се прибавя на капки разтвор на 20 ml триетиламин в 20 ml толуен и се разбърква една нощ на размразяваща се ледена баня. Излишният фосген се продухва с азот и след това реакционната смес се филтрира. Филтратът се концентрира под вакуум до сухо. Остатъкът, 33,7 g кафеникаво маслообразно вещество съдържа освен 4-нитрофенол-хлороформиат, още и разтворител и сол. Сместа кристализира в хладилник и може да се използва без по-нататъшно пречистване.

b) метокси-полиетиленгликол(8000)-4-нитрофенилкарбонат.

Получаването и пречистването се осъществяват аналогично на пример 6.

Пример 8. Получаване на метокси-полиетиленгликол(8000)-2,4,5-трихлорофенилкарбонат.

a) 2,4,5-трихлорофенилхлороформиат

В разтвор от 10,0 g 2,4,5-трихлорофенол в 50 ml дихлорметан се вкарват при 0°C около 7 g фосген-газ и сместа се разбърква при 0°C 15 min, в продължение на 30 min се прибавят на капки 7,2 ml хинолин в 20 ml дихлорметан и оранжево оцветената суспензия се разбърква още 1 h на ледена баня. След това през суспензията се пропуска азот в продължение на 1 h, за да се продуха излишният фосген (промивна кула). След това сместа се филтрира, филтратът се промива два пъти с вода, суши се, отново се филтрира и се концентрира под вакуум до сухо. Получават се 4,45 g масловиден кафеникав, относително чист 2,4,5-трихлорофенилхлороформиат, който кристализира в хладилник и може да се използва без по-нататъшно пречистване.

b) Метокси-полиетиленгликол(8000)-2,4,5-трихлорофенилкарбонат.

Получаването и пречистването се осъществяват аналогично на пример 6.

Пример 9. Взаимодействие на хирудинмутеин HL 14В с метокси-полиетиленгликол(8000)-4-нитрофенилкарбонат

10 mg хирудинмутеин HL 14В (специфична активност 8900 ATU/mg) се разтварят до концентрация 20 mg/ml в 0,1 M натриев хидрогенкарбонатен буфер с pH 8,0, взаимодейства с 80 mg 4-нитрофенил-активиран метоксиполиетиленгликол (8000 Da), разтворен в 0,5 ml 1,4-диоксан, и се инкубира 3 h при 25°C. След това реакцията се спира чрез прибавяне на 100-кратен излишък от Tris-база, освободеният 4-нитрофенол се отстранява чрез екстракция и хирудин-PEG конюгатът се нанася на колона с HP-Q-Sepharose® (Pharmacia). Колоната се елуира с линеен градиент от NaCl от 0 до 400 mM NaCl в 20 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Частта от желаното PEG2-производно

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65			
12. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65			
13. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65			
14. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	5		
15. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	10		
15. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	15		
16. Хирудинмутеин съгласно претенции 9 до 15 за покриване на повърхности.			
Приложение: 2 фигури			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	20		
13. Хирудинмутеин съгласно претенция 9 с формула			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	25		
16. Хирудинмутеин съгласно претенции 9 до 15 за покриване на повърхности.			
Приложение: 2 фигури			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	30		
16. Хирудинмутеин съгласно претенции 9 до 15 за покриване на повърхности.			
Приложение: 2 фигури			
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly- 10 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn- 20 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu- 30 Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val- 40 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser- 50 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro- 60 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln. 65	35		

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

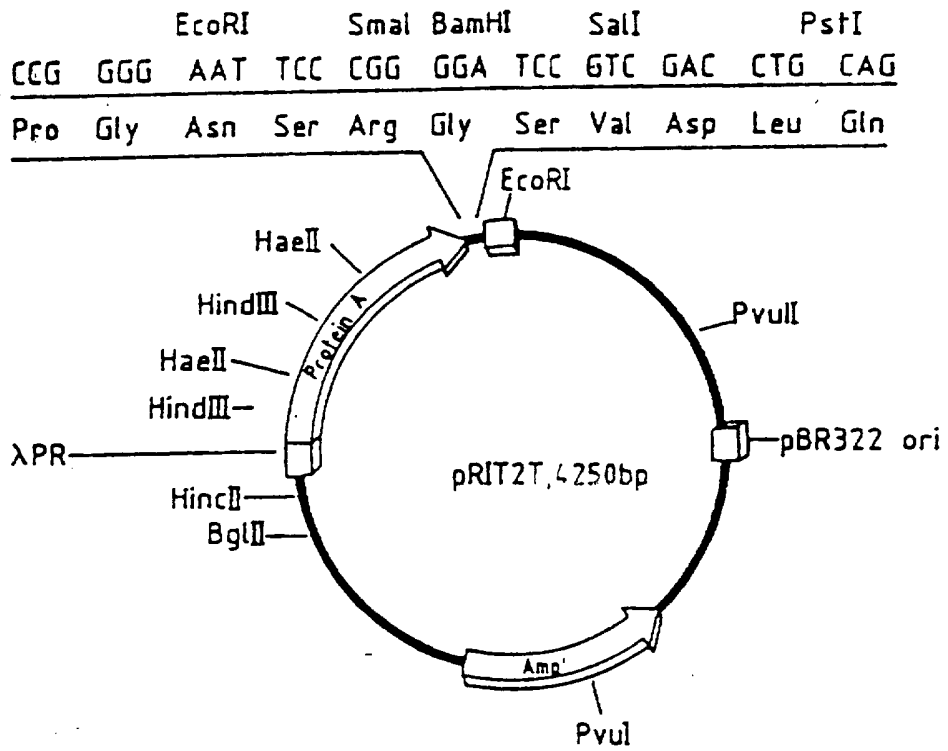
Експерт: А. Антонова

Редактор: Р. Николова

Пор. № 39275

Тираж: 40 ЗС

Фиг. 1



1 Фиг. 2

Исползван синтетичен ДНК фрагмент

фрагмент 1А:

```

aat tca atc gat act atg qtr qtt tac act qac tgc act qaa tcc qdt caqaac ctg tgc ctg tgc qaa qgc tct aar qtt tgc qgc caq qqr
qt taq cta tga tac caa caa atg tga ctg acg tga ctt aag cca qtc ttg qac acg qac acg ctt ccg aga ttg caa a
Met Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val (Cys Gly Gln Gly)
1 5 10 15 20 25

```

фрагмент 2А:

```

aac aaa tgc atc ctg qgc tct aaa qgc caq aaa aac caq tgc qtt act qgc qaa qgt ac
cg ctg qtc ccg ttg ttt aag taq qac ctg aqa ttt ccg qtc ttt ttg qtc acg caa taa ccg ctt
(Gly Gln Gly)Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser Lys Gly Gln Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu(Gly)
25 30 35 40

```

фрагмент 2В:

```

aac aaa tgc atc ctg qgc tct aaa qgc qaa cgt aac caq tgc qtt act qgc qaa qgt ac
cg ccg qtc ccg ttg ttt aag taq qac ccg aga ttt ccg ctt gca ttg qtc acg caa tga ccg ctt c
(Gly Gln Gly)Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser Lys Gly Glu Arg Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu(Gly)
25 30 35 40

```

Фиг. 2 продължение

фрагмент 1A:

```

c ccg aaa ccg ccg tct cac aac gac qgc qgc ttc gaa gaa aac ccg gaa tac tac ctg cag taa tag g
ca tgg qgc ttt qgc qgc qgc ttc ctg ccg ctg aag ctt ctt taq ggc ttt ctt atg gac gtc att atc taq ct
(Thr)Pro Lys Pro Glu Ser His Asp Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Glu End End
45 50 55 60 65

```

фрагмент 1B:

```

c ccg ccg ccg ccg tct cac aac gac qgc qgc ttc gaa gaa aac ccg gaa tac tac ctg cag taa tag g
ca tgg qgc qgc qgc qgc qgc qgc ctg ctg aag ctt ctt taq ggc ttt ctt atg gac gtc att atc cag ct
(Thr)Pro Arg Pro Glu Ser His Asp Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Glu End End
45 50 55 60

```

фрагмент 1C:

```

c ccg ccg ccg ccg tct cac aac gac qgc qgc ttc gaa gaa aac ccg gaa tac tac ctg cag taa tag g
ca tgg qgc qgc qgc qgc qgc qgc ctg ctg aag ctt ctt taq ggc ttt ctt atg gac gtc att atc cag ct
(Thr)Pro Glu Pro Glu Ser His Asp Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Glu End End
45 50 55 60 65

```