



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011106573/15, 06.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.08.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
06.08.2008 EP 08161905.8

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2012 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 27.08.2014 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO2005027978 A2, 31.03.2005. WO2008003750 A, 10.01.2008. WO2006013201 A, 09.02.2006. SZENTE L et al "Fatty Acid-Cyclodextrin Complexes: Properties and Applications" j. of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 1993, 16, pp.339-340/

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.03.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2009/060186 (06.08.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/015668 (11.02.2010)Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):

БЕРЕНС Карстен (DK),
ГЭРИБЭЙ Патрик Уильям (DK),
ЭСТЕРГААРД Сёрен (DK),
АНДЕРСЕН Хенрик Сун (DK),
ЙОХАНСЕН Нильс Лангеланд (DK),
ПЕШКЕ Бернд (DK),
БАК Сонья (DK)

(73) Патентообладатель(и):

НОВО НОРДИСК ХЕЛС КЕА АГ (СН)

(54) КОНЬЮГИРОВАННЫЕ БЕЛКИ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ДЕЙСТВИЕМ IN VIVO

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к фармакологии, а именно к конъюгированным белкам, в частности, но не исключительно, к факторам свертывания крови, к способам получения этих конъюгатов, включающим стадии взаимодействия белка или гликопротеина с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом в присутствии молекулы

циклодекстрина, а также к фармацевтическим композициям, содержащим эти конъюгаты, и к применению конъюгатов при изготовлении лекарственного средства для терапии. Группа изобретений обеспечивает повышение биодоступности, периода полувыведения in vivo, повышенной устойчивости к протеазам, снижение иммуногенности. 3 н. и 18 з.п. ф-лы, 51 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 526 804** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011106573/15, 06.08.2009**

(24) Effective date for property rights:
06.08.2009

Priority:

(30) Convention priority:
06.08.2008 EP 08161905.8

(43) Application published: **20.09.2012** Bull. № **26**

(45) Date of publication: **27.08.2014** Bull. № **24**

(85) Commencement of national phase: **09.03.2011**

(86) PCT application:
EP 2009/060186 (06.08.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/015668 (11.02.2010)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT"

(72) Inventor(s):

**BERENS Karsten (DK),
GEhRIBehJ Patrik Uill'jam (DK),
EhSTERGAARD Seren (DK),
ANDERSEN Khenrik Sun (DK),
JOKhANSEN Nil's Langeland (DK),
PEShKE Bernd (DK),
BAK Son'ja (DK)**

(73) Proprietor(s):

NOVO NORDISK KhELS KEA AG (CH)

(54) **CONJUGATED PROTEINS WITH PROLONGED ACTION IN VIVO**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to pharmacology, namely to conjugated proteins, in particular, but not exclusively, to factors of blood coagulation, to methods of obtaining said conjugates, which include stages of interaction of protein or glycoprotein with water-insoluble albumin-binding substance in presence of cyclodextrin molecule, as well

as to pharmaceutical compositions, containing said conjugates, and to application of conjugates in manufacturing medication for therapy.

EFFECT: group of inventions ensures increase of bioavailability, period of half-life in vivo, increased resistance to proteases, reduction of immunogenicity.

21 cl, 51 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к конъюгированным белкам, в частности, но не исключительно, к факторам свертывания крови, к способам получения этих конъюгатов, к фармацевтическим композициям, содержащим эти конъюгаты, и к применению конъюгатов в терапии, в частности, но не исключительно, для лечения заболеваний, облегчаемых факторами свертывания крови, такого как профилактическое лечение гемофилии.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Свертывание крови представляет собой процесс, состоящий в комплексном взаимодействии различных компонентов (или факторов) крови, которое, в конечном счете, вызывает образование фибринового сгустка. Как правило, компоненты крови, которые участвуют в том, что называют "каскадом" свертывания крови, представляют собой ферментативно неактивные белки (проферменты или зимогены), которые преобразуются в протеолитические ферменты под действием активатора (который сам по себе представляет собой активированный фактор свертывания крови). Факторы свертывания крови, которые претерпели такое преобразование, обычно называют "активными факторами" и обозначают добавлением буквы "а" к названию фактора свертывания крови (например, фактор VII(a)).

Для пациентов с тяжелой гемофилией существует направление отхода от лечения по необходимости к профилактическим режимам, чтобы предотвратить кровотечение и последующее объединенное повреждение. Однако в связи с их коротким периодом полувыведения из циркулирующей крови факторы свертывания крови, такие как FVIII, FIX и FVIIa, в частности, не идеальны для долгосрочного профилактического лечения, поскольку для поддержания фармакологически релевантных уровней в плазме требуются как высокие дозы, так и частые инъекции. Поэтому в настоящее время внимание сосредоточено в направлении разработки длительно действующих аналогов, которые являются лучше подходящими для профилактического применения.

Пегилирование является установленным способом продления периода полувыведения белков из циркулирующей крови. Однако, в связи с большой пограничной поверхностью взаимодействия факторов свертывания крови в пределах клеточной мембраны с другими факторами и кофакторами свертывания крови, существуют ограниченные возможности для химической модификации без разрушительной потери активности.

Таким образом, существует огромная потребность в разработке факторов свертывания крови с повышенными периодами полувыведения из плазмы для профилактического лечения гемофилии.

В WO 2005/027978 (Novo Nordisk A/S) описаны производные глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), которые обладают пролонгированным профилем действия, где эти полипептиды связаны с альбумин-связывающим остатком через гидрофильный спейсер.

В изобретении, таким образом, предложены новые белковые конъюгаты с улучшенными фармакологическими свойствами, а также способы их получения.

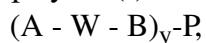
КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предложен способ получения конъюгированного белка или гликопротеина, который включает стадии взаимодействия белка или гликопротеина с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом в присутствии молекулы возможно замещенного циклодекстрина.

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложен белковый конъюгат, который содержит белок или гликопротеин, связанный с альбумин-связывающим остатком через гидрофильный спейсер, или его фармацевтически приемлемая соль,

сольват или пролекарство.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен белковый конъюгат формулы (I):



где P представляет собой белок или гликопротеин;

W представляет собой гидрофильный спейсер;

W представляет собой химическую группу, связывающую A и B;

A представляет собой альбумин-связывающий остаток; и

y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или пролекарство.

В соответствии с третьим аспектом изобретения предложен способ получения конъюгированного фактора свертывания крови, который включает стадии взаимодействия фактора свертывания крови, как определено в данной заявке, с модифицирующей группой, как определено в данной заявке.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен конъюгированный фактор свертывания крови, содержащий фактор свертывания крови, как определено в данной заявке, конъюгированный с модифицирующей группой, как определено в данной заявке.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен способ лечения гемофилии, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированного фактора свертывания крови, как определено в данной заявке.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин "белок", "полипептид" и "пептид", как используют в данной заявке, соединение, состоящее по меньшей мере из пяти составляющих аминокислот, соединенных пептидными связями. Составляющие аминокислоты могут относиться к группе аминокислот, кодируемых генетическим кодом, и они могут представлять собой природные аминокислоты, которые не кодируются генетическим кодом, а также синтетические аминокислоты. Природными аминокислотами, которые не кодируются генетическим кодом, являются, например, гидроксипролин, у-карбоксиглутамат, орнитин, фосфосерин, D-аланин и D-глутамин. Синтетические аминокислоты включают аминокислоты, полученные путем химического синтеза, то есть D-изомеры аминокислот, кодируемых генетическим кодом, такие как D-аланин и D-лейцин, Aib (α-аминоизомасляная кислота), Abu (α-аминомасляная кислота), Tie (трет-бутил глицин), β-аланин, 3-аминометилбензойная кислота, антраниловая кислота. Должно быть понятно, что термин "конъюгированный", используемый в данной заявке в отношении белка или гликопротеина, относится к определенной конъюгации с альбумин-связывающим остатком в соответствии с изобретением. Должно быть также понятно, что белок или гликопротеин, используемый в способе конъюгации по изобретению, может быть уже конъюгирован с другими группировками, такими как сахарная группировка.

Термин "гликопротеин", как используют в данной заявке, относится к белкам, которые содержат олигосахаридные цепи (гликаны), ковалентно присоединенные к их полипептидным боковым цепям. Должно быть понятно, что когда гликопротеин используют в способе конъюгации по изобретению, альбумин-связывающий остаток может быть связан с этим гликопротеином через остаток гликана.

В настоящем контексте термин "соединение гормона роста", как используют в данной заявке, означает гормон роста, имеющий происхождение от млекопитающих, такой

как гормон роста человека, быка или свиньи, и рекомбинантный гормон роста, такой как рекомбинантный гормон роста человека, быка или свиньи, а также варианты таких гормонов роста. Как используют в данной заявке, "GH" и "соединение гормона роста" взаимозаменяемы. Когда GH представляет собой вариант гормона роста, имеющего происхождение от млекопитающих, такого как hGH и рекомбинантный hGH, этот вариант понимают как соединение, полученное путем замены одного или более чем одного аминокислотного остатка в последовательности гормона роста, например hGH, другой природной или неприродной аминокислотой; и/или путем добавления одной или более чем одной природной или неприродной аминокислоты к последовательности гормона роста, например hGH; и/или путем делеции одного или более чем одного аминокислотного остатка из последовательности гормона роста, например hGH, где за любой из этих стадий может необязательно следовать дальнейшая дериватизация одного или более чем одного аминокислотного остатка. В частности, такие замены являются консервативными в том смысле, что один аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком из той же группы, то есть другим аминокислотным остатком с подобными свойствами. Аминокислоты могут быть для удобства подразделены на приведенные ниже группы на основании их свойств: Основные аминокислоты (такие как аргинин, лизин, гистидин), кислые аминокислоты (такие как глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярные аминокислоты (такие как глутамин, цистеин и аспарагин), гидрофобные аминокислоты (такие как лейцин, изолейцин, пролин, метионин и валин), ароматические аминокислоты (такие как фенилаланин, триптофан, тирозин) и малые аминокислоты (такие как глицин, аланин, серин и треонин). Типично GH обладает по меньшей мере 80% идентичности с hGH, и типично обладает по меньшей мере 20% активности гормона роста hGH, как определено в данной заявке в анализе I.

В настоящем контексте термин "альбумин-связывающий остаток", как используют в данной заявке, означает остаток, который нековалентно связывается с сывороточным альбумином человека. Альбумин-связывающий остаток, присоединенный к белку или гликопротеину, типично обладает связывающим сродством в отношении сывороточного альбумина человека, которое составляет ниже примерно 10 мкМ или даже ниже примерно 1 мкМ. Ряд альбумин-связывающих остатков известен среди нормальных и разветвленных липофильных группировок, содержащих 12-40 атомов углерода, соединений с циклопентанофенантроновым каркасом и/или пептидов, имеющих 10-45 аминокислотных остатков, и т.д. Альбумин-связывающие свойства можно измерить с помощью поверхностного плазменного резонанса, как описано в J. Biol. Chem. 277(38), 35035-35042, (2002).

Термин "гидрофильный спейсер", как используют в данной заявке, означает спейсер, который разделяет белок или гликопротеин и альбумин-связывающий остаток, с химической группировкой, которая содержит по меньшей мере 5 атомов не водорода, где 30-50% из них представляет собой N или O.

Термин "нерастворимый в воде" относится к группировке, имеющей cLogP>0.

Термин "водорастворимый" относится к группировке, имеющей cLogP<0.

В настоящем контексте термин "переаминирование" и родственные термины предназначены для указания реакции, где амидный атом азота в боковой цепи глутамина обменивается с атомом азота из другого соединения, в частности с атомом азота из другого азотсодержащего нуклеофила.

В настоящем контексте термин "недоступен" предназначен для указания того, что что-либо отсутствует или фактически отсутствует в том смысле, что не может быть

достигнуто. Когда указано, что функциональные группы недоступны в белке, который нужно конъюгировать, это должно указывать на то, что данная функциональная группа отсутствует в белке или, если присутствует, то каким-либо образом предотвращено ее участие в реакциях. Например, эта функциональная группа может быть глубоко погружена в структуру белка, так что она защищена от участия в реакции. Признано, что, является ли функциональная группа доступной или нет, зависит от условий реакции. Можно рассматривать, что, например, в присутствии денатурирующих агентов или при повышенных температурах белок может разворачиваться с открытием функциональных групп, которые в ином случае недоступны. Должно быть понятно, что "недоступен" означает "недоступен при условиях реакции, выбранных для конкретной интересующей реакции".

Термин "алкан" или "алкил" предназначен для указания насыщенного, нормального, разветвленного и/или циклического углеводорода. Если не указано другое число атомов углерода, термин предназначен для указания углеводородов с 1-30 (включительно) атомами углерода, как, например, 1-20 (включительно), как, например, 1-10 (включительно), например, от 1 до 5 (включительно). Термины алкил и алкилен относятся к соответствующему радикалу и бирадикалу, соответственно.

Термин "C₁₋₆ алкил" относится к прямоцепочечному или разветвленному насыщенному углеводороду, имеющему от одного до шести атомов углерода включительно. Примеры таких групп включают, но не ограничены ими, метил, 2-пропил, 1-бутил, 2-бутил, 2-метил-2-пропил, 2-метил-1-бутил и н-гексил.

Термин "C₃₋₁₀ циклоалкил" типично относится к циклопропилу, циклобутилу, циклопентилу, циклогексилу, циклогептилу, циклооктилу, циклононилу и циклодеканилу.

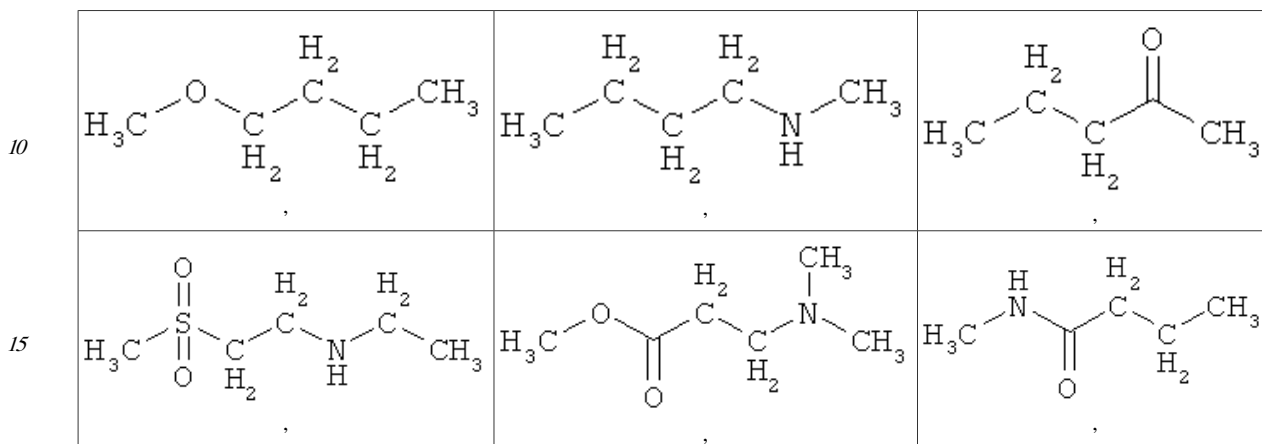
Термин "алкен" предназначен для указания нормальных, разветвленных и/или циклических углеводородов, содержащих по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Если не указано другое число атомов углерода, термин предназначен для указания углеводородов с 2-30 (включительно) атомами углерода, как, например, 2-20 (включительно), как, например, 2-10 (включительно), например, от 2 до 5 (включительно). Термины алкенил и алкенилен относятся к соответствующему радикалу и бирадикалу, соответственно.

Термин "алкин" предназначен для указания нормальных, разветвленных и/или циклических углеводородов, содержащих по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь, и которые могут возможно содержать одну или более чем одну углерод-углеродную двойную связь. Если не указано другое число атомов углерода, термин предназначен для указания углеводородов с 2-30 (включительно) атомами углерода, как, например, 2-20 (включительно), как, например, 2-10 (включительно), например, от 2 до 5 (включительно). Термины алкинил и алкинилен относятся к соответствующему радикалу и бирадикалу, соответственно.

Термин "гомоциклическое ароматическое соединение" предназначен для указания ароматических углеводородов, таких как бензол и нафталин.

Термин "гетероциклическое соединение" предназначен для указания циклического соединения, содержащего 5, 6 или 7 кольцевых атомов, из которых 1, 2, 3 или 4 представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O и/или S. Примеры включают гетероциклические ароматические соединения, такие как тиафен, фуран, пиран, пиррол, имидазол, пиразол, изотиазол, изоксазол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, а также их частично или полностью гидрогенизированные эквиваленты, такие как пиперидин, пиразолидин, пирролидин, пирролин, имидазолидин, имидазолин, пиперазин и морфолин.

Термины "гетероалкан", "гетероалкен" и "гетероалкин" предназначены для указания алканов, алкенов и алкинов, как определено выше, в которых в структуру этих группировок встроен один или более чем один гетероатом или группа. Примеры гетерогрупп и атомов включают -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)-, -C(S)- и -N(R*)-, где R* представляет собой атом водорода или Si-Cg-алкил. Примеры гетероалканов включают:



Термин "радикал" или "бирадикал" предназначен для указания соединения, из которого удален один или два, соответственно, атома водорода. Когда конкретно указано, радикал может также включать группировку, образованную в результате предшествующего удаления из соединения большей группы атомов, например, гидроксила.

Термин "галоген" предназначен для указания членов седьмой основной группы периодической таблицы, например F, Cl, Br и I.

В настоящем контексте термин "арил" предназначен для указания карбоциклического ароматического кольцевого радикала или радикала конденсированной ароматической кольцевой системы, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим. Типичные арильные группы включают фенил, дифенилил, нафтил и тому подобное.

Термин "гетероарил" или "гетарил", как используют в данной заявке, один или в комбинации, относится к ароматическому кольцевому радикалу, например, с 5-7 атомами-членами, или к радикалу конденсированной ароматической кольцевой системы, например, с 7-18 атомами-членами, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим, содержащему в качестве кольцевого атома один или более чем один гетероатом, выбранный из гетероатомов азота, кислорода или серы, где N-оксиды, а также монооксиды серы и диоксиды серы являются допустимыми гетероароматическими замещениями. Примеры включают фуранил, тиенил, тиюфенил, пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, тиазолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, изотиазолил, пиридилил, пиридазинил, пиразинил, пиримидинил, хинолинил, изохинолинил, бензофуранил, бензотиюфенил, индолил и индазолил и тому подобное.

Отметка звездочкой, используемая в химических структурах, в данной заявке указывает на присутствие открытой связи, пригодной для присоединения.

Термин "конъюгат" как существительное предназначен для указания модифицированного белка, то есть белка с группировкой, связанной с ним с целью модификации свойств этого белка. Как глагол, этот термин предназначен для указания процесса связывания группировки с белком для модификации свойств этого белка.

Как используют в данной заявке, термин "пролекарство" указывает биогидролизуемые амиды и биогидролизуемые сложные эфиры, а также охватывает а) соединения, в

которых биогидролизуемая функциональная группа в таком пролекарстве включена в соединение в соответствии с настоящим изобретением, и б) соединения, которые могут быть окислены или восстановлены биологически в данной функциональной группе с получением лекарственных веществ в соответствии с настоящим изобретением. Примеры

5 этих функциональных групп включают 1,4-дигидропиридин, N-алкилкарбонил-1,4-дигидропиридин, 1,4-циклогексадиен, трет-бутил и тому подобное.

Как используют в данной заявке, термин "биогидролизуемый сложный эфир" представляет собой сложный эфир лекарственного вещества (в данном случае, соединения в соответствии с изобретением), который либо а) не препятствует

10 биологической активности исходного вещества, но придает этому веществу предпочтительные свойства *in vivo*, такие как продолжительность действия, начало действия и тому подобное, либо б) является биологически неактивным, но легко преобразуется *in vivo* субъектом в биологически активное вещество. Преимуществом является, например, повышенная растворимость или то, что биогидролизуемый сложный

15 эфир всасывается перорально из кишечника и преобразуется в соединение в соответствии с настоящим изобретением в плазме. Многие их примеры известны в данной области техники и включают, например, сложные низшие алкилэфиры (например, C₁-C₄), низшие ацилоксиалкилэфиры, низшие алкоксиацилоксиалкилэфиры, алкоксиацилоксиэфиры, алкилациламиноалкилэфиры и холиновые эфиры.

20 Как используют в данной заявке, термин "биогидролизуемый амид" представляет собой амид лекарственного вещества (в данном случае, соединение в соответствии с настоящим изобретением), который либо а) не препятствует биологической активности исходного вещества, но придает этому веществу предпочтительные свойства *in vivo*, такие как продолжительность действия, начало действия и тому подобное, либо б)

25 является биологически неактивным, но легко преобразуется *in vivo* субъектом в биологически активное вещество. Преимуществом является, например, повышенная растворимость или то, что биогидролизуемый амид всасывается перорально из кишечника и преобразуется в соединение в соответствии с настоящим изобретением в плазме. Многие их примеры известны в данной области техники и включают, например,

30 низшие алкиламиды, амиды α-аминокислот, алкоксиациламиды и алкиламиноалкилкарбониламиды.

В настоящем контексте термин "фармацевтически приемлемая соль" предназначен для указания солей, которые не являются вредными для пациента. Такие соли включают

35 фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированного аммония. Соли присоединения кислоты включают соли неорганических кислот, а также органических кислот. Репрезентативные примеры подходящих неорганических кислот включают соляную, бромисто-водородную, йодисто-водородную, фосфорную, серную, азотную

40 кислоты и тому подобное. Репрезентативные примеры подходящих органических кислот включают муравьиную, уксусную, трихлоруксусную, трифторуксусную, пропионовую, бензойную, коричную, лимонную, фумаровую, гликолевую, молочную, малеиновую, яблочную, малоновую, миндальную, щавелевую, пикриновую, пировиноградную, салициловую, янтарную, метансульфоновую, этансульфоновую, винную, аскорбиновую, памовую, бисметиленсалициловую, этандисульфоновую, глюконовую, цитраконовую,

45 аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, ЭДТА, гликолевую, пара-аминобензойную, глутаминовую, бензолсульфоновую, пара-толуолсульфоновую кислоты и тому подобное. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения неорганической или органической кислоты включают

фармацевтически приемлемые соли, приведенные в J. Pharm. Sci. 66, 2, (1977), которая включена в данную заявку посредством ссылки. Примеры солей металлов включают соли лития, натрия, калия, магния и тому подобное, примеры солей аммония и алкилированного аммония включают соли аммония, метиламмония, диметиламмония, триметиламмония, этиламмония, гидроксиэтиламмония, диэтиламмония, бутиламмония, тетраметиламмония и тому подобное.

"Терапевтически эффективное количество" соединения, как используют в данной заявке, означает количество, достаточное для вылечивания, облегчения или частичной остановки клинических проявлений данного заболевания и его осложнений. Количество, адекватное для осуществления этого, определяют как "терапевтически эффективное количество". Эффективные количества для каждой цели зависят от тяжести заболевания или повреждения, а также от массы и общего состояния субъекта. Должно быть понятно, что определение соответствующей дозировки может быть достигнуто с использованием рутинного экспериментирования путем построения матрицы значений и тестирования различных точек в матрице, что находится в пределах обычной компетенции подготовленного врача или ветеринара.

Термин "лечение" и "лечащий", как используют в данной заявке, означает лечение и уход за пациентом в целях борьбы с состоянием, таким как заболевание или расстройство. Термин предназначен для включения всего спектра терапий для данного состояния, которым страдает пациент, таких как введение активного соединения для облегчения симптомов или осложнений, для замедления прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, для облегчения или ослабления симптомов или осложнений и/или для излечения или устранения заболевания, расстройства или состояния, а также для предупреждения этого состояния, где предупреждение следует понимать как лечение и уход за пациентом в целях борьбы с заболеванием, состоянием или расстройством, и оно включает введение активных соединений для предупреждения возникновения симптомов или осложнений. Пациент, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой млекопитающее, в частности человека, но может также включать животных, таких как собаки, кошки, коровы, овцы и свиньи.

Термин "аналог", как используют в данной заявке по отношению к полипептиду, означает модифицированный пептид, где один или более чем один аминокислотный остаток пептида заменен другими аминокислотными остатками и/или где один или более чем один аминокислотный остаток делетирован из пептида и/или где один или более чем один аминокислотный остаток добавлен в пептид. Такое добавление или делеция аминокислотных остатков может иметь место при N-конце пептида и/или при C-конце пептида. Все аминокислоты, для которых оптический изомер не указан, следует понимать как означающие L-изомер.

Термин "функциональный период полувыведения *in vivo*" используют в его обычном значении, то есть периода, при котором 50% биологической активности модифицированного белка или стандартной молекулы все еще присутствует в организме/органе-мишени, или время, которое требуется для падения активности модифицированного белка или стандартной молекулы до 50% ее пикового значения. В качестве альтернативы определению функционального периода полувыведения *in vivo* можно определять "период полувыведения из плазмы *in vivo*", то есть период, при котором 50% модифицированных белков или стандартных молекул циркулирует в плазме или кровотоке до их выведения.

Определение периода полувыведения из плазмы часто проще, чем определение функционального периода полувыведения, и величина периода полувыведения из

плазмы обычно является хорошим показателем величины функционального периода полувыведения *in vivo*. Альтернативные термины периода полувыведения из плазмы включают период полувыведения из сыворотки, период полувыведения из циркулирующей крови, период полувыведения из кровообращения, сывороточный клиренс, плазменный клиренс и период полувыведения клиренса. Функция, которая должна сохраняться, обычно выбрана из прокоагулянтной, протеолитической, связывающей кофактор, активности связывания рецептора или другого типа биологической активности, связанной с конкретным белком.

Измерение биологического периода полувыведения *in vivo* можно осуществлять с помощью ряда путей, которые описаны в литературе. Пример использования модифицированного FVIIa (фактора свертывания крови Vila) анализа для измерения периода полувыведения *in vivo* rFVIIa и его вариантов описан в ссылке FDA № 96-0597. Кратко, свертывающую активность FVIIa измеряют в плазме, взятой до и во время 24-часового периода после введения модифицированного белка. Измеряют средний кажущийся объем распределения в стабильном состоянии и определяют средний клиренс.

Термин "повышенный", используемый в отношении функционального периода полувыведения *in vivo* или периода полувыведения из плазмы, указывает на то, что релевантный период полувыведения модифицированного белка статистически значимо повышен относительно стандартной молекулы, такой как белок, идентичный во всем остальном, который, однако, не подвергнут способу по изобретению. Таким образом, период полувыведения определяют в сравнимых условиях. Например, релевантный период полувыведения может быть повышен по меньшей мере примерно на 25%, например, по меньшей мере примерно на 50%, например, по меньшей мере примерно на 100%, 150%, 200%, 250% или 500%. В некоторых формах осуществления модифицированные белки по настоящему изобретению проявляют повышение периода полувыведения по меньшей мере примерно на 0,25 ч, предпочтительно по меньшей мере примерно на 0,5 ч, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 1 ч и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 2 ч относительно периода полувыведения немодифицированного белка.

Термин "биодоступность" относится к доле введенной дозы конъюгата, который можно обнаружить в плазме в predetermined моменты времени после введения. Типично биодоступность измеряют у подопытных животных путем введения дозы между примерно 25-250 мкг/кг препарата; получения образцов плазмы в predetermined моменты времени после введения; и определения содержания белка в образцах, используя подходящий биологический анализ или иммунологический анализ, либо эквивалентный анализ. Данные типично выражают графически как [белок] против времени, и биодоступность выражают в виде площади под кривой (AUC). Относительная биодоступность тестируемого препарата относится к отношению между AUC тестируемого препарата и немодифицированного белка.

Термин "иммуногенность" препарата относится к способности препарата при введении людям вызывать вредный иммунный ответ, либо гуморальный, либо клеточный, либо оба ответа. В любой подгруппе населения людей могут существовать индивидуумы, которые проявляют чувствительность к определенным вводимым белкам. Иммуногенность можно измерить путем количественного определения присутствия антител против белка и/или Т-клеток, реактивных в отношении этого белка, у чувствительного индивидуума, используя общепринятые способы, известные в данной области техники. В некоторых формах осуществления модифицированные белки по настоящему изобретению проявляют снижение иммуногенности у чувствительного

индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 25%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 50% относительно иммуногенности немодифицированного белка для этого индивидуума.

5 Иммуногенность лекарства также относится к тому факту, что белковые лекарства могут быть иммуногенными у нечувствительных субъектов, что означает, что повторные введения этого лекарства приводят к постоянному бустингу иммунного ответа против этого лекарства. Это в большинстве случаев нежелательно, поскольку иммунный ответ
10 будет препятствовать активности лекарства, в результате чего возникает необходимость вводить возрастающие дозы этого лекарства со временем с целью получения терапевтического эффекта. В некоторых формах осуществления модифицированные белки по настоящему изобретению проявляют снижение иммуногенности у нечувствительного индивидуума по меньшей мере примерно на 10%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 25%, более предпочтительно по меньшей мере примерно
15 на 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 50% относительно иммуногенности немодифицированного белка для этого индивидуума.

Термин "защищенный от протеаз", как используют в данной заявке относительно белка, означает белок, который химически модифицирован с целью придания этому соединению устойчивости к пептидазам или протеазам плазмы. Известно, что протеазы
20 в плазме вовлечены в расщепление нескольких пептидных гормонов, а также играют роль при расщеплении белков большего размера.

Устойчивость пептида к расщеплению, например, дипептидиламинопептидазой IV (DPPIV) определяют с помощью приведенного ниже анализа расщепления: Аликвоты пептида (5 нмоль) инкубируют при 37°C с 1 мкл очищенной дипептидиламинопептидазы
25 IV, что соответствует ферментативной активности 5 mU, в течение 10-180 минут в 100 мкл буфера 0,1 М триэтиламин-HCl, pH 7,4. Ферментативные реакции останавливают добавлением 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты, и продукты расщепления пептида разделяют и определяют количественно, используя анализ ВЭЖХ. Одним из способов проведения этого анализа является следующий: Смеси наносят на колонку Vydac C18
30 с широкими порами (поры 30 нм, частицы 5 мкм) 250 x 4,6 мм и элюируют при скорости тока 1 мл/мин линейными ступенчатыми градиентами ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (0% ацетонитрила в течение 3 мин, 0-24% ацетонитрила в течение 17 мин, 24-48% ацетонитрила в течение 1 мин) согласно Siegel et al., Regul. Pept. 1999;79:93-102 и Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993;214:829-35. Мониторинг пептидов и
35 продуктов их расщепления можно проводить на основании их поглощения при 220 нм (пептидные связи) или 280 нм (ароматические аминокислоты) и определять количественно путем интегрирования их пиковых областей относительно пиковых областей стандартов. Степень гидролиза пептида дипептидиламинопептидазой IV оценивают при периодах инкубации, результатом которых является менее чем 10%
40 гидролизованного пептида. Этот эксперимент можно возможно ставить в присутствии альбумина, чтобы исследовать защитные свойства, проявляемые комплексообразованием с альбумином.

Термин "водная композиция" определяют как композицию, содержащую по меньшей мере 50% масс/масс воды. Подобным образом, термин "водный раствор" определяют
45 как раствор, содержащий по меньшей мере 50% мас./мас. воды, и термин "водная суспензия" определяют как суспензию, содержащую по меньшей мере 50% мас./мас. воды.

Термин "идентичность", как известно в данной области техники, относится к

отношениям между последовательностями двух или более чем двух белков, которые определяют путем сравнения последовательностей. В данной области техники "идентичность" также означает степень родства последовательностей между белками, которую определяют по числу совпадений между цепочками из двух или более чем двух аминокислотных остатков. "Идентичность" измеряет процент идентичных совпадений между наименьшими из двух или более чем двух последовательностей с выравниванием с помощью гэпов (если есть), предусмотренным конкретной математической моделью или компьютерной программой (то есть "алгоритмами"). Идентичность родственных пептидов можно легко вычислить известными способами. Такие способы включают, но не ограничены ими, способы, описанные в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48, 1073, (1988).

Предпочтительные способы определения идентичности разработаны таким образом, чтобы давать наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные способы определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, включающий GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12, 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J.Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)). Программа BLASTX общедоступна из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). Хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана можно также использовать для определения идентичности.

Например, используя компьютерный алгоритм GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), два белка, для которых нужно определить процент идентичности последовательности, выравнивают для максимального совпадения из соответствующих аминокислот ("matched span", как определено алгоритмом). Штраф на открытие гэпа (который вычисляют как 3-кратную среднюю диагональ; "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, приписываемое каждому наилучшему совпадению аминокислот конкретной матрицей сравнения) и штраф на удлинение гэпа (который обычно составляет {коэффициент (1/10)} штрафа на открытие гэпа), а также матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, используют в сочетании с алгоритмом. Стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978) для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992) для матрицы сравнения BLOSUM 62) также используется алгоритмом.

Предпочтительные параметры для сравнения белковых последовательностей включают приведенные ниже:

Алгоритм: Needleman et al., J. Mol. Biol, 48, 443-453, (1970); Матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992); Штраф на гэп: 12, Штраф на длину гэпа: 4, Порог подобия: 0.

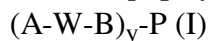
Программа GAP полезна с приведенными выше параметрами. Вышеупомянутые параметры представляют собой параметры по умолчанию для сравнений белков

(параллельно с отсутствием штрафа на концевые гэпы) с использованием алгоритма GAP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предложен способ получения конъюгированного белка или гликопротеина, который включает стадии взаимодействия белка или гликопротеина с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом в присутствии молекулы возможно замещенного циклодекстрина.

В одной форме осуществления белковый конъюгат представляет собой белковый конъюгат формулы (I):



где P представляет собой белок или гликопротеин;

W представляет собой гидрофильный спейсер;

W представляет собой химическую группу, связывающую A и B;

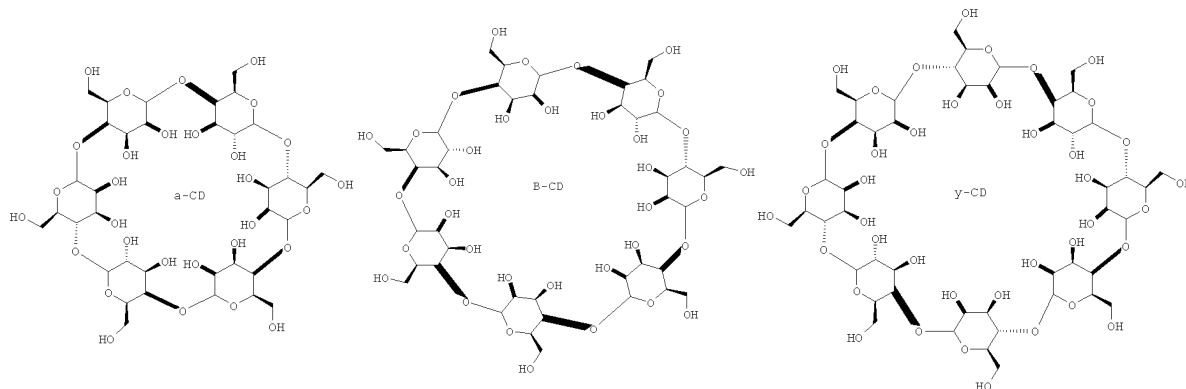
A представляет собой альбумин-связывающий остаток; и

y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, так что группировка A-W-B- включает нерастворимую в воде группировку.

Результатом изобретения являются модифицированные белки или гликопротеины, обладающие улучшенными фармакологическими свойствами по сравнению с немодифицированным белком или гликопротеином. Например, улучшенное фармакологическое свойство выбрано из группы, состоящей из повышенной биодоступности, повышенного функционального периода полувыведения *in vivo*, повышенного периода полувыведения *in vivo* из плазмы, сниженной иммуногенности, повышенной устойчивости к протеазам, повышенного сродства к альбумину, улучшенного сродства к рецептору, повышенной стабильности при хранении, сниженного функционального периода полувыведения *in vivo* и сниженного периода полувыведения *in vivo* из плазмы.

Циклодекстрины (также известные как циклоамилозы) составляют семейство циклических олигосахаридов, состоящих из 5 или большего числа α-D-гликопиранозидных звеньев, связанных 1->4, как в амилозе (фрагменте крахмала). Типичные циклодекстрины содержат ряд мономеров глюкозы в диапазоне от шести до восьми звеньев в кольце, создавая коническую форму. Примеры таких циклодекстринов включают α-циклодекстрин (α-CD; шестичленную кольцевую молекулу сахара), β-циклодекстрин (β-CD; семичленную кольцевую молекулу сахара) и γ-циклодекстрин (γ-CD; восьмичленную кольцевую молекулу сахара), как показано ниже:



В одной форме осуществления молекула циклодекстрина включает возможно замещенный β-циклодекстрин.

Необязательные заместители для циклодекстрина включают одну или более чем

одну C₁₋₆ алкильную группу (например, метил, этил или пропил), каждая из которых может быть возможно замещена одной или более чем одной гидроксильной группой (например, гидроксиэтилциклодекстрин или гидроксипропилциклодекстрин). В одной форме осуществления возможно замещенный циклодекстрин включает 2-гидроксиэтил-β-циклодекстрин.

Молекула возможно замещенного циклодекстрина может быть добавлена в концентрации от 1% до 10% (например, 5%).

В одной форме осуществления реакция конъюгации включает реакцию в водном буферном растворе, таком как буфер ГЭПЭС (например, 50 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl и 10 мМ CaCl₂). В одной форме осуществления реакция конъюгации включает реакцию при постоянном pH (например, pH 7,0) и постоянной температуре (например, 25°C). Преимущество проведения реакции конъюгации при постоянном pH и температуре состоит в том, что уменьшается вероятность денатурации фактора свертывания крови.

Кроме факторов свертывания крови, изобретение также применимо к белкам большого размера, которые не являются родственными или являются только отдаленно родственными факторам свертывания крови. Большие белки в данном контексте представляют собой белки с молекулярными массами выше 10000 Да.

Таким образом, в одной форме осуществления Р представляет собой белок с молекулярной массой выше 10000 Да.

В другой форме осуществления Р представляет собой белок с молекулярной массой выше 20000 Да.

В другой форме осуществления Р представляет собой белок с молекулярной массой выше 30000 Да.

В другой форме осуществления Р представляет собой белок с молекулярной массой выше 40000 Да.

Белки и пептиды в объеме Р включают, но не ограничены ими, гемоглобин, сывороточные белки, такие как факторы крови, включая фактор VII, FX, FII, FV, белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор, FXI, FXII и FXIII, а также варианты последовательностей FVIII и FIX; иммуноглобулины, цитокины, такие как интерлейкины, альфа-, бета- и гамма-интерфероны, колониестимулирующие факторы, включая гранулоцитарные колониестимулирующие факторы, тромбоцитарные факторы роста и белок-активатор фосфолипазы (PLA₂).

Другие белки и пептиды общебиологического и терапевтического интереса включают инсулин, растительные белки, такие как лектины и рицины, факторы некроза опухоли и родственные аллели, растворимые формы рецепторов факторов некроза опухоли, рецепторы интерлейкинов и растворимые формы рецепторов интерлейкинов, факторы роста, такие как тканевые факторы роста, такие как TGFα или TGFβ, и эпидермальные факторы роста, гормоны, соматомедины, эритропоэтин, пигментные гормоны, гипоталамические рилизинг-факторы, антидиуретические гормоны, пролактин, хорионический гонадотропин, фолликулостимулирующий гормон, тиреостимулирующий гормон, тканевой активатор плазминогена и тому подобное. Иммуноглобулины, представляющие интерес, включают IgG, IgE, IgM, IgA, IgD и их фрагменты.

В форме осуществления изобретения пептид представляет собой апротинин, ингибитор биохимического пути тканевого фактора, или другие ингибиторы протеаз, инсулин или предшественники инсулина, гормон роста человека или быка, интерлейкин, глюкагон, оксинтомодулин, GLP-1, GLP-2, IGF-I, IGF-II, тканевой активатор плазминогена, трансформирующий фактор роста у или Р, тромбоцитарный фактор роста, GRF (рилизинг-фактор гормона роста), фактор роста человека, иммуноглобулины,

ЕРО, ТРА, белок С, факторы свертывания крови, такие как FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, белок С, белок S, PAI-1, тканевой фактор, FXI, FXII и FXIII, экзендин-3, экзендин-4 и ферменты, или их функциональные аналоги В настоящем контексте термин

"функциональный аналог" подразумевают как указывающий белок с функцией, подобной нативному белку. Белок может быть структурно подобен нативному белку и может быть образован из нативного белка путем добавления одной или более чем одной аминокислоты либо с С, либо с М-конца, либо с обоих концов нативного белка, замены одной или более чем одной аминокислоты в одном сайте или в ряде различных сайтов в нативной аминокислотной последовательности, делеции одной или более чем одной аминокислоты с любого или с обоих концов нативного белка, либо в одном или нескольких сайтах аминокислотной последовательности, либо инсерции одной или более чем одной аминокислоты в одном или более чем одном сайте нативной аминокислотной последовательности. Кроме того, белок может быть ацилирован в одном или более чем одном положении, см., например, WO 98/08871, в которой раскрыто ацилирование GLP-1 и его аналогов, и WO 98/08872, в которой раскрыто ацилирование GLP-2 и его аналогов. Примером ацилированного производного GLP-1 является Lys26(N^{epsilon}-тетрадеканоил)-GLP-1 (7-37), который представляет собой GLP-1 (7-37), где эпислон-аминогруппа остатка Lys в положении 26 тетрадеканоилирована.

Белки или их участки могут быть получены или выделены путем использования методов, известных обычным специалистам в данной области техники, такие как тканевая культура, выделение из животных источников, либо с помощью методологий рекомбинантных ДНК. Трансгенные источники белков, пептидов, аминокислотных последовательностей и тому подобное также принимают во внимание. Такие материалы получают от трансгенных животных, то есть мышей, свиней, коров и т.д., где белок экспрессируется в молоке, крови или тканях. Трансгенные насекомые и бакуловирусные системы экспрессии также рассматривают в качестве источников. Кроме того, мутантные варианты белков, такие как мутантные TNF и/или мутантные интерфероны, также находятся в пределах объема изобретения. Другими белками, представляющими интерес, являются аллергенные белки, такие как пыльца, антиген Е, пчелиный яд, клещевой аллерген и тому подобное.

В одной форме осуществления, Р представляет собой а фактор свертывания крови. Примеры подходящих факторов свертывания крови включают:

I (фибриноген), II (протромбин), тканевой фактор, V (проакцелерин), VI, VII, VIII, IX (тромбопластин плазмы), X (фактор Стюарта-Прауэра), XI (предшественник тромбопластина плазмы), XII (фактор Хагемана), XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), фактор Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген (НМWK), фибронектин, антитромбин 111, кофактор гепарина 11, белок С, белок S, белок Z, белок Z-родственный ингибитор протеазы (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (РАН), ингибитор-2 активатора плазминогена (РАИ2) и раковый прокоагулянт. В следующей форме осуществления фактор свертывания крови выбран из FVII, FX, FII, FV, белка С, белка S, tPA, PAI-1, тканевого фактора, FXI, FXII и FXIII, а также вариантов последовательностей FVIII, FIX.

В следующей форме осуществления фактор свертывания крови представляет собой FVII (то есть FVIIa).

В альтернативной форме осуществления Р представляет собой гормон роста (GH).

В одной форме осуществления у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3. Эта форма осуществления особенно подходит для форм осуществления, где Р

представляет собой гормон роста, поскольку гормон роста имеет 3 точки присоединения для такой группировки A-W-B-, а именно N-конец, Gln40 и Gln141.

В одной форме осуществления у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В следующей форме осуществления у представляет собой 2. В альтернативной форме осуществления у представляет собой 1.

Как вышеописанные формы осуществления, так и формы осуществления, которые описаны в данной заявке ниже, следует рассматривать как относящиеся к любому из аспектов, описанных в данной заявке, а также к любой из форм осуществления, описанных здесь, если не указано, что форма осуществления относится к определенному аспекту или аспектам настоящего изобретения.

В одной форме осуществления настоящего изобретения гидрофильный спейсер В имеет $c\text{LogP} < 0$, как определено в J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 5175-5180 "A New Substituent Constant, Π , Derived from Partition Coefficients", и как вычислено с использованием программного обеспечения Sybyl от Tripos (Tripos Associates, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319 USA).

В следующей форме осуществления конъюгата формулы (I) гидрофильный спейсер В имеет формулу
 $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

где X_1 представляет собой $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 представляет собой $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 представляет собой $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$,

X_4 представляет собой $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$,

l1, l2, l3, l4, l5 и l6 независимо выбраны из 0-16,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F представляет собой арил, гетероарил, пирролидин-2,5-дион, где арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила,

R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из атома водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила;

где алкильная, арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- или валентной связи; где R⁶ и R⁷ независимо представляют собой атом водорода или C₁₋₆-алкил,

W₁-W₆ независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или валентной связи; где s2 равно 0 или 1.

В следующей форме осуществления W_i выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- или валентной связи. Типично W₁ выбран из -C(O)MH-, -MHC(O)- или -C(O)NHS(O)₂-.

В следующей форме осуществления W_1 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_2 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В следующей форме осуществления W_3 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_3 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В следующей форме осуществления W_4 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_4 выбран из $-C(O)NH-$, $-MHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В следующей форме осуществления W_5 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_5 выбран из $-C(O)NH-$, $-MHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В следующей форме осуществления W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В следующей форме осуществления R^1 выбран из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. Типично R^1 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В следующей форме осуществления R^2 выбран из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. Типично R^2 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В следующей форме осуществления R^3 выбран из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. Типично R^3 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В следующей форме осуществления R^4 выбран из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. Типично R^4 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В следующей форме осуществления R^5 выбран из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила, где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. Типично R^5 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; где алкильная группа возможно замещена $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В следующей форме осуществления $E1$ выбран из $-O-$ или $-NR^6-$ или валентной связи. Типично, $E1$ выбран из $-O-$.

В следующей форме осуществления E2 выбран из -O- или -NR⁶- или валентной связи. Типично E2 выбран из -O-.

В следующей форме осуществления E1 и E2 оба представляют собой -O-.

5 В следующей форме осуществления E1 и E2 оба представляют собой -NR⁶-.

В следующей форме осуществления F представляет собой фенил, пирролидин-2,5-дион или валентную связь.

В следующей форме осуществления D1 выбран из -O- или -NR⁶- или валентной связи.

Типично D1 выбран из -NR⁶-.

10 В следующей форме осуществления D2 выбран из -O- или -NR⁶- или валентной связи.

Типично D1 выбран из -NR⁶-.

В следующей форме осуществления 11 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления 12 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

15 В следующей форме осуществления 13 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления 14 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления 15 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления 16 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления t1 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

20 В следующей форме осуществления t2 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В следующей форме осуществления m3 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления m4 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

25 В следующей форме осуществления m5 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В следующей форме осуществления m6 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В следующей форме осуществления m7 равно 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

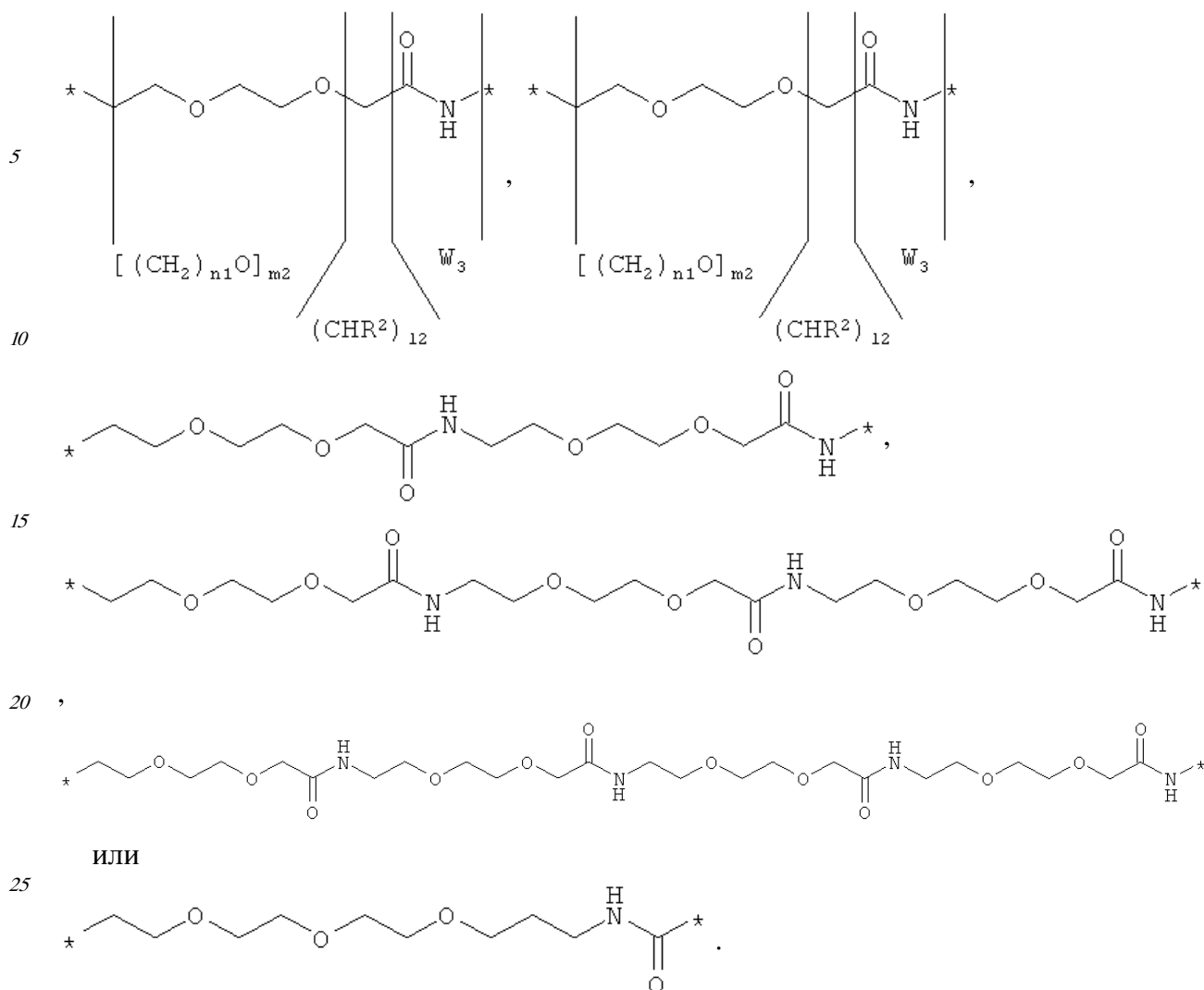
В следующей форме осуществления m1 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

30 В следующей форме осуществления m2 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В следующей форме осуществления m3 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

35 В следующей форме осуществления m4 равно 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В следующей форме осуществления X₁ представляет собой -W₁-(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}- и X₂ представляет собой -[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}-, где -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}- и -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}- выбраны из



В следующей форме осуществления молярная масса гидрофильного спейсера находится в интервале от 80 Дальтон (Д) до 1500 Д или в интервале от 500 Д до 1100 Д.

Еще в одной следующей форме осуществления W имеет формулу $-W_7-Y-$,

где Y представляет собой $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -циклоалкил- W_8- или валентную связь, 17 равно 0-6,

W_7 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или валентной связи; где s_3 равно 0 или 1,

W_8 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, или валентной связи; где s_4 равно 0 или 1.

В форме осуществления W Y представляет собой $-(CH_2)_{17}$ -Циклогексил- W_8- .

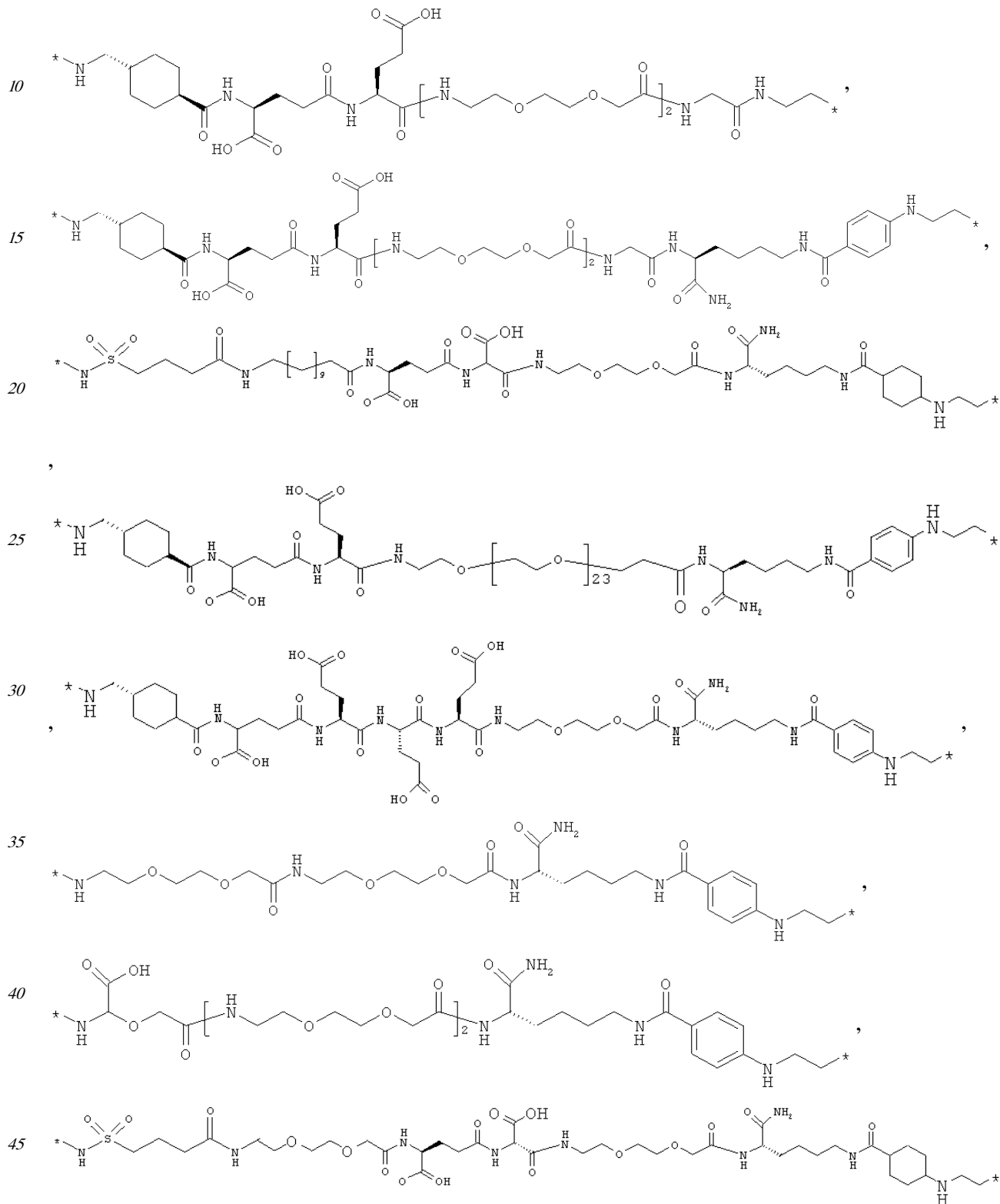
В следующей форме осуществления Y представляет собой валентную связь.

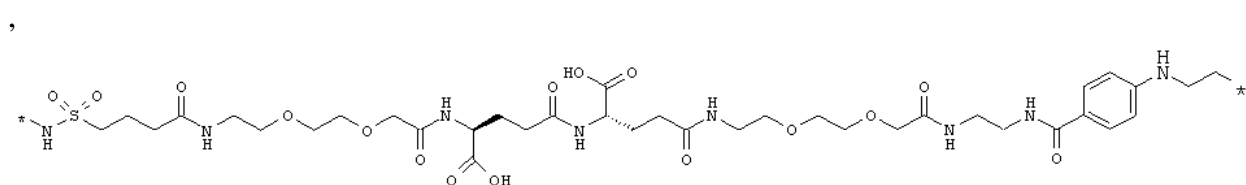
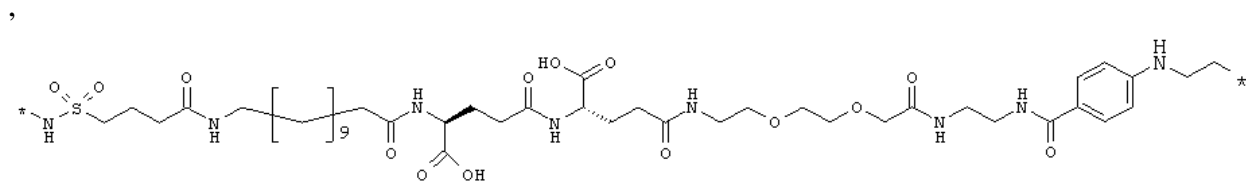
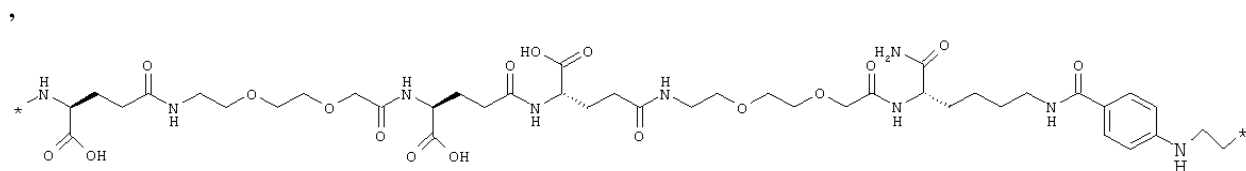
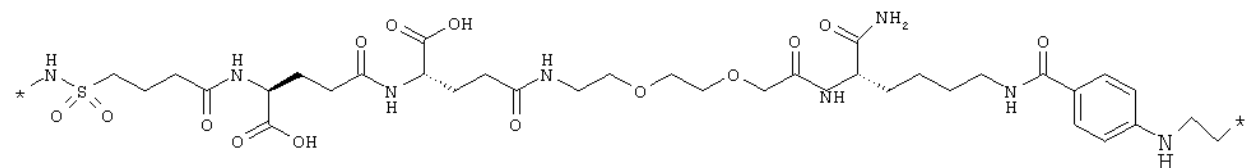
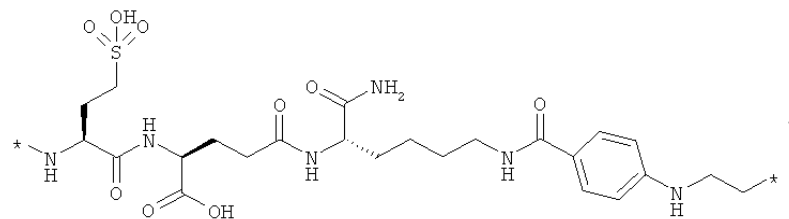
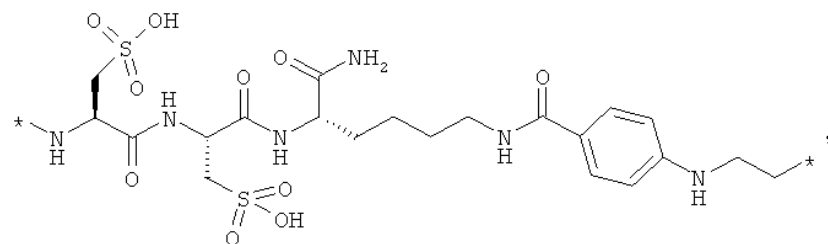
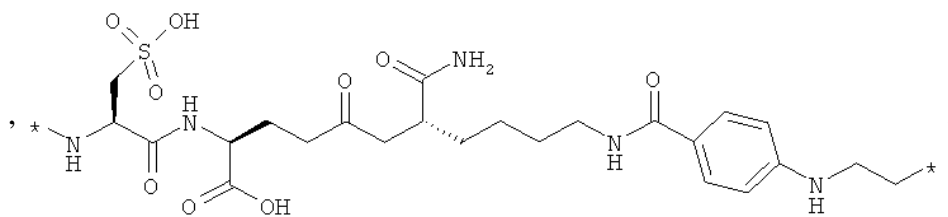
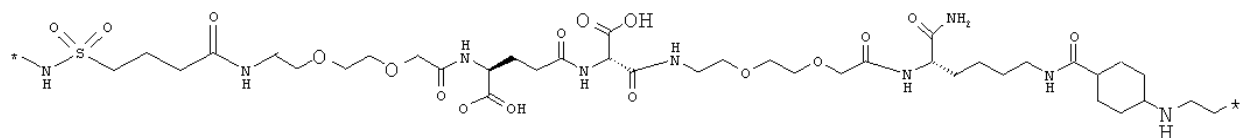
В форме осуществления W_7 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_7 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$.

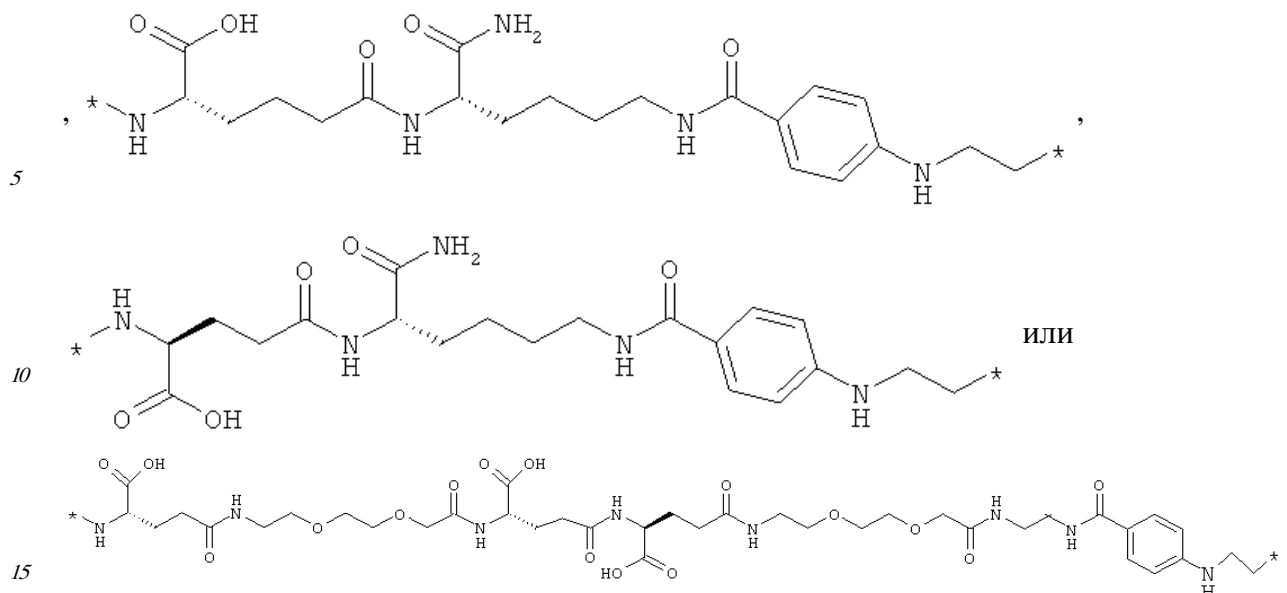
В следующей форме осуществления W_8 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи. Типично W_8 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2$.

5 В следующей форме осуществления 17 равно 0 или 1.

В следующей форме осуществления гидрофильный спейсер В по настоящему изобретению выбран из







Альбумин-связывающий остаток (заместитель А в формуле (I) выше), присоединенный к Р, является липофильным остатком, который связывается нековалентно с альбумином. Типично альбумин-связывающий остаток отрицательно заряжен при физиологическом рН и имеет связывающее сродство в отношении человеческого сывороточного альбумина, которое составляет ниже примерно 10 мкМ или даже ниже примерно 1 мкМ.

Альбумин-связывающие вещества, используемые в данном изобретении, типично представляют собой производные жирных кислот с низкой растворимостью в водном растворе. Растворимость альбумин-связывающего вещества может быть описана ее логарифмическим значением Р. Log Р, также известный как коэффициент распределения, представляет собой логарифм отношения концентраций соединения в двух фазах смеси двух несмешиваемых растворителей в состоянии равновесия. Типично одним из растворителей является вода, тогда как второй выбран из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP). Значения Log Р, измеренные в этих различных растворителях, проявляют различия, главным образом, за счет эффектов водородного связывания. Октанол может быть донором и акцептором водородных связей, тогда как циклогексан является инертным. Хлороформ может быть донором водородных связей, тогда как PGDP может быть только их акцептором.

В одной форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество может иметь Log Р > -3 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP).

В следующей форме осуществления альбумин-связывающее вещество имеет log Р выше -4 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP).

Еще в одной следующей форме осуществления альбумин-связывающее вещество имеет log Р выше -5 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP).

Альтернативно cLogP может быть вычислен для альбумин-связывающего участка с использованием опубликованных алгоритмов (J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 5175-5180 "A New Substituent Constant, Π , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 23 (1997) 3-25, "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" и I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. and Pharm. Bull., 42 (1994) 976-978

"Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods".

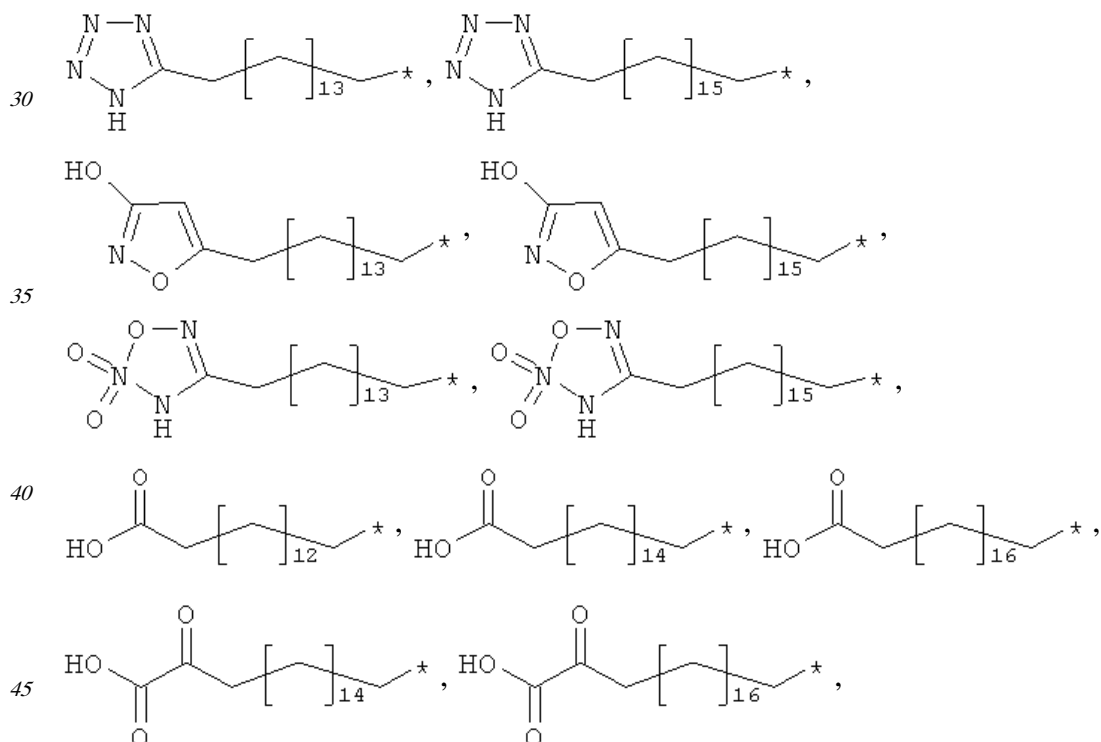
В одной форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество имеет cLog P >1 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропилеггликольдипеларгоната (PGDP). В следующей форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество имеет cLog P >2 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропилеггликольдипеларгоната (PGDP). Еще в одной следующей форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество имеет cLog P >3 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропилеггликольдипеларгоната (PGDP). Еще в одной следующей форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество имеет clog P > 4 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропилеггликольдипеларгоната (PGDP). Еще в одной следующей форме осуществления изобретения альбумин-связывающее вещество имеет clog P > 5 в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропилеггликольдипеларгоната (PGDP).

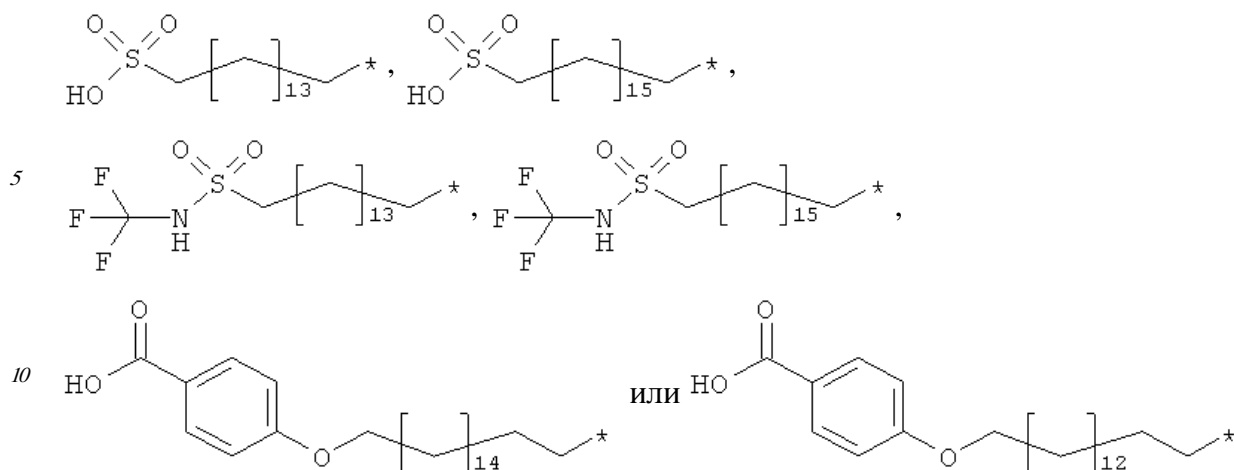
В следующей форме осуществления альбумин-связывающий остаток выбран из прямоцепочечной алкильной группы, разветвленной алкильной группы, группы, которая имеет группу ω-карбоновой кислоты или изостеры ω-карбоновой кислоты. Типично альбумин-связывающий остаток имеет от 6 до 40 атомов углерода. В следующей форме осуществления альбумин-связывающий остаток имеет от 8 до 26 атомов углерода. В следующей форме осуществления альбумин-связывающий остаток имеет от 8 до 20 атомов углерода.

В следующей форме осуществления А имеет от 14 до 26 атомов углерода и содержит группу ω-карбоновой кислоты. В следующей форме осуществления А имеет от 14 до 26 атомов углерода и содержит группу изостеры со-карбоновой кислоты, такую как тетразол.

Альбумин-связывающие свойства можно измерить с помощью поверхностного плазменного резонанса, как описано в J. Biol.Chem. 277(38), 35035-35042, 2002.

В следующей форме осуществления А выбран из





где * обозначено присоединение к В через W.

В одной форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку глутамина белка Р через гидрофильный спейсер В.

В другой форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку цистеина белка Р через гидрофильный спейсер В.

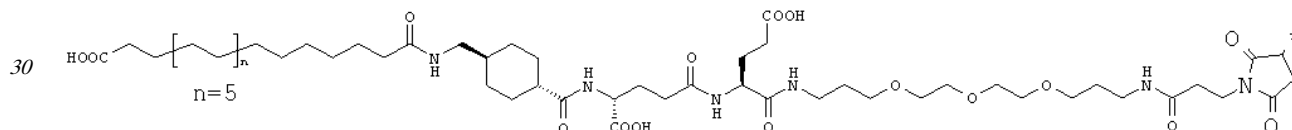
В другой форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к N-концевому остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

В другой форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к С-концевому остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

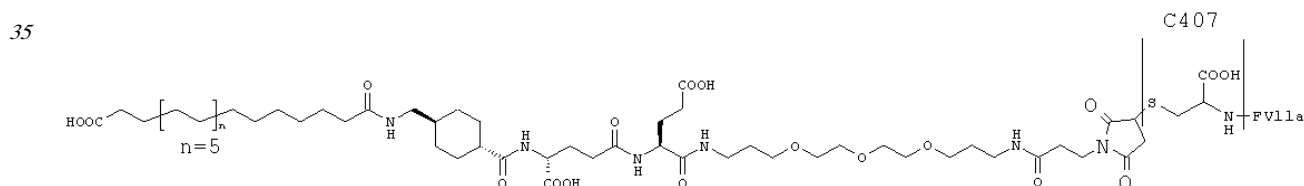
В другой форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку лизина белка Р через гидрофильный спейсер В.

Еще в одной другой форме осуществления альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку окисленного гликана гликобелка Р через гидрофильный спейсер В.

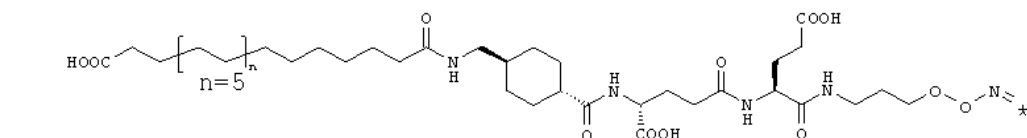
В одной форме осуществления А-В-В- представляет собой



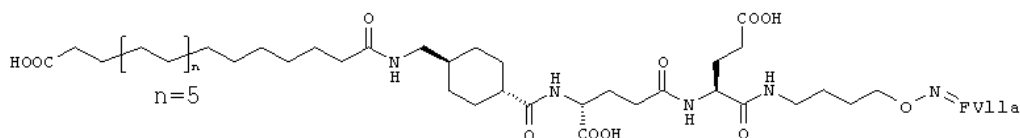
В одной форме осуществления Р представляет собой FVIIa-C407, и A-W-B-P представляет собой



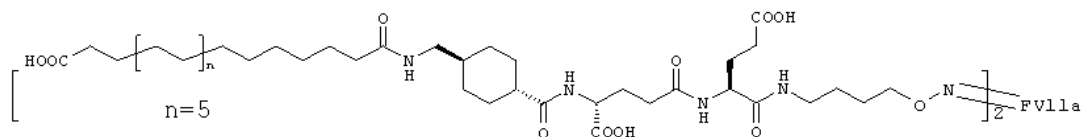
в одной форме осуществления А-В-В=представляет собой



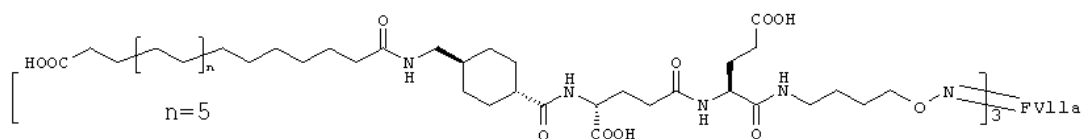
В одной форме осуществления Р представляет собой гликоокисленный FVIIa, и A-W-B=P представляет собой



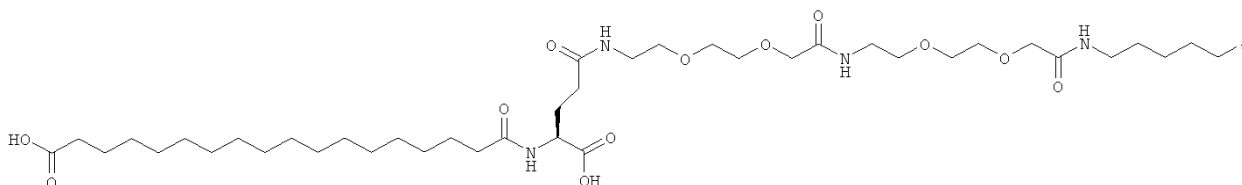
В одной форме осуществления Р представляет собой гликоокисленный FVIIa, $y = 2$ и $(A-W-B)_yP$ представляет собой



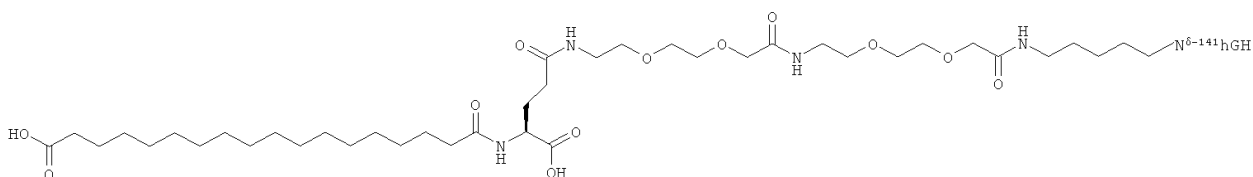
В одной форме осуществления Р представляет собой гликоокисленный FVIIa, $y = 3$ и $(A-W-B)_yP$ представляет собой



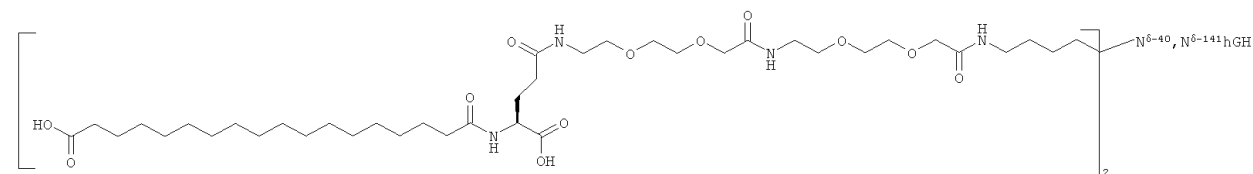
В одной форме осуществления A-W-B- представляет собой



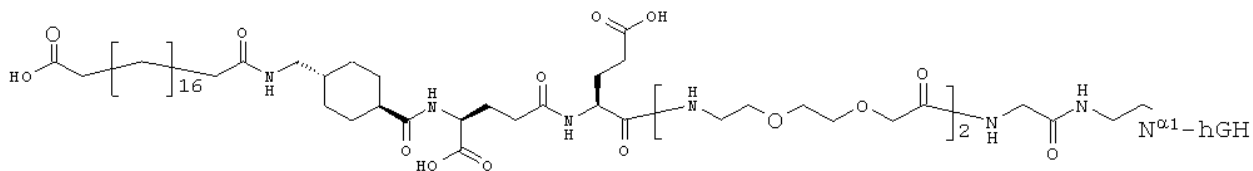
В одной форме осуществления Р представляет собой hGH и A-W-B-Р представляет собой



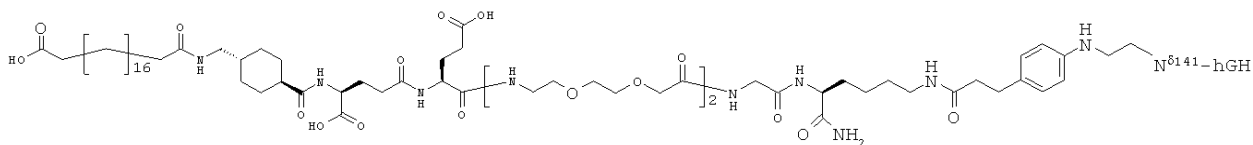
В одной форме осуществления Р представляет собой hGH, $y = 2$ и $(A-W-B)_yP$ представляет собой



,



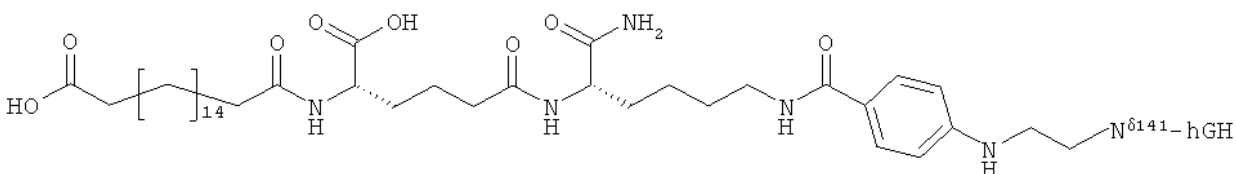
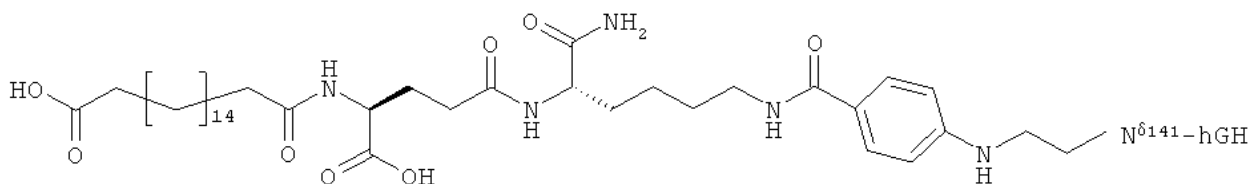
,



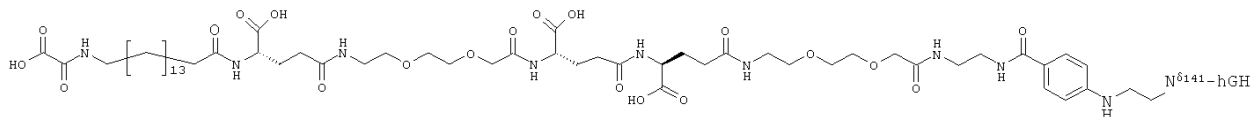
,







или



В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен белковый конъюгат, как определено в данной заявке, для применения в терапии.

В следующем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белковый конъюгат, как определено в данной заявке, возможно в комбинации с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен белковый конъюгат, который содержит белок или гликопротеин, связанный с альбумин-связывающим остатком через гидрофильный спейсер, или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен способ получения конъюгированного фактора свертывания крови, который включает стадии взаимодействия фактора свертывания крови, как определено в данной заявке, с модифицирующей группой, как определено в данной заявке.

Результатом способа по изобретению являются модифицированные факторы свертывания крови, обладающие улучшенными фармакологическими свойствами по сравнению с немодифицированным фактором свертывания крови. Например, улучшенное фармакологическое свойство выбрано из группы, состоящей из повышенной биодоступности, повышенного функционального периода полувыведения *in vivo*, повышенного периода полувыведения из плазмы *in vivo*, сниженной иммуногенности, повышенной устойчивости к протеазам, повышенного сродства к альбумину, улучшенного сродства к рецептору, повышенной стабильности при хранении, сниженного функционального периода полувыведения *in vivo*, сниженного периода полувыведения из плазмы *in vivo*.

В одной форме осуществления способ дополнительно включает добавление солюбилизирующего агента. Когда модифицирующая группа содержит жирную кислоту, присутствие такого солюбилизирующего агента обеспечивает преимущество повышения растворимости жирных кислот в водном растворе и вследствие этого повышает эффективность реакции конъюгации.

В одной форме осуществления солюбилизирующий агент включает молекулу возможно замещенного циклодекстрина.

Таким образом, в соответствии со следующим аспектом изобретения предложен способ получения конъюгированного белка или гликопротеина, который включает стадии взаимодействия белка или гликопротеина, как определено в данной заявке, с

альбумин-связывающим веществом, как определено в данной заявке, в присутствии молекулы возможно замещенного циклодекстрина. В одной форме осуществления альбумин-связывающее вещество включает нерастворимое в воде альбумин-связывающее вещество, а белок или гликопротеин включает водорастворимый белок или гликопротеин.

Некоторые факторы свертывания крови (например, FVIIa, FIXa, FXa, FIIa) действуют как протеазы в каскаде свертывания крови, и хорошо известно, что они расщепляются посредством автокатализа при длительном стоянии в растворе.

Поэтому, кроме использования солубилизирующего агента, когда модификатор содержит жирную кислоту, реакционная смесь может дополнительно содержать обратимый блокирующий агент, который ингибирует активный центр факторов свертывания крови протеазного типа (например, FVIIa, FIXa, FXa, FVIIa и т.д.).

Таким образом, в одной форме осуществления конъюгацию между фактором свертывания крови и модифицирующей группой проводят в условиях, где функциональный центр фактора свертывания крови (то есть протеазный центр) блокирован молекулой-хелпером, такой как ингибитор сериновой протеазы. Предпочтительно молекула-хелпер представляет собой молекулу, которая специфично и обратимо распознает протеазный центр и может быть легко удалена во время последующих стадий очистки. Например, бензамидин является подходящим обратимым ингибитором активного центра для FVIIa.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен конъюгированный белок или гликопротеин, который может быть получен способом, как определено выше.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен конъюгированный фактор свертывания крови, который может быть получен способом, как определено выше.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен конъюгированный фактор свертывания крови, содержащий фактор свертывания крови, как определено в данной заявке, конъюгированный с модифицирующей группой, как определено в данной заявке.

Примеры подходящих факторов свертывания крови включают: I (фибриноген), II (протромбин), тканевой фактор, V (проакцелерин), VI, VII, VIII, IX (тромбопластин плазмы), X (фактор Стюарта-Прауэра), XI (предшественник тромбопластина плазмы), XII (фактор Хагемана), XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), фактор Виллебранда, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген (НМWK), фибронектин, антитромбин III, кофактор гепарина II, белок C, белок S, белок Z, белок Z-родственный ингибитор протеазы (ZPI), плазминоген, альфа-2-антиплазмин, тканевой активатор плазминогена (tPA), урокиназу, ингибитор-1 активатора плазминогена (РАН), ингибитор-2 активатора плазминогена (РАI2) и раковый прокоагулянт.

В изобретение также включены неприродные сконструированные белки с коагуляционными активностями, такие как аналоги тканевого фактора (TF), слитые белки TF или химеры TF, обладающие повышенным сродством к активированным тромбоцитам, например, TF-аннексин V, слитые белки TF-антитело и другие слитые белки TF, включающие химеры, где не-TF компонент увеличивает связывающее сродство к эпитопам, экспрессируемым на активированных тромбоцитах. Другие примеры белков с коагуляционной активностью включают ингибиторные антагонисты биохимического пути тканевого фактора, включая антитела анти-TFPI или их фрагменты, а также активируемый тромбином фактор X. Дополнительные примеры включают FVIII-имитирующее биспецифическое МАВ.

В одной форме осуществления фактор свертывания крови представляет собой фактор Vila (FVIIa), фактор VIII (FVIII) или фактор IX (FIX). В следующей форме осуществления фактор свертывания крови представляет собой фактор Vila (FVIIa).

В одной форме осуществления фактор свертывания крови представляет собой аналог фактора Vila (FVIIa), фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX). В следующей форме осуществления фактор свертывания крови представляет собой аналог фактора Vila (FVIIa).

В одной форме осуществления модифицирующая группа проявляет пролонгирующий эффект в результате связывания с альбумином. Альбумин, который присутствует в большом количестве в крови, связывает низкомолекулярные жирные кислоты с микро- или наномолярным сродством. Если жирная кислота присоединена к молекуле большего размера, такой как пептид, конъюгат может специфично связываться с альбумином, присутствующим в крови. Затем альбумин может функционировать в качестве молекулы-носителя большего размера, которая благодаря ее размеру защищает пептид от почечного клиренса или протеолитической атаки. Этот принцип хорошо документально описан для пептидов меньшего размера, таких как GLP-1 и инсулин, но неожиданно авторы изобретения обнаружили, что данный тип модифицирующей группы также вызывает пролонгирование белков большего размера, таких как факторы свертывания крови размера, подобного альбумину, то есть белков, которые сами должны быть достаточно велики, чтобы избежать почечного клиренса.

Кроме того, удивительно, что комплексы между большими белками сравнимого размера могут удерживаться вместе за счет липофильных сил, проявляемых модифицирующими группами, как определено в данной заявке, и, в частности, теми, которые включают соединение формулы I.

Таким образом, как указано выше, показано, что присоединение альбумин-связывающих веществ к белкам или пептидам потенциально увеличивает период полувыведения из плазмы этих белков или пептидов. Класс типичных альбумин-связывающих веществ образован из жирных кислот, поскольку альбумин способен к связыванию с высокогидрофобными молекулами. Поэтому соединения, имеющие группировку $-(CH_2)_{12}-$, являются возможными альбумин-связывающими веществами в контексте данного изобретения. Если альбумин-связывающее вещество, которое определено, как выше, присоединено к белку или пептиду и приводит в результате к повышенному периоду полувыведения из плазмы этого белка или пептида, понятно, что альбумин-связывающее вещество, представляющее собой группировку, которая увеличивает период полувыведения из плазмы, как описано в данном изобретении, вносит вклад в общее повышение периода полувыведения из плазмы либо за счет связывания с альбумином, и/или за счет других пролонгирующих механизмов, таких как неспецифичное связывание с липидными слоями, и т.д.

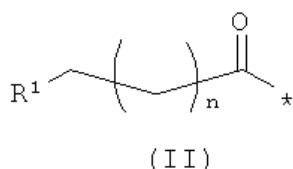
В некоторых формах осуществления препараты по настоящему изобретению проявляют относительную биодоступность по меньшей мере примерно 110%, предпочтительно по меньшей мере примерно 120%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 130% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 140% от биодоступности соответствующего немодифицированного белка. Биодоступность можно измерить у любых видов млекопитающих, предпочтительно у собак, и predetermined periods, используемые для вычисления AUC, могут охватывать различные приращения, от 10 мин до 8 ч. Биодоступность можно, например, измерить в модели собак, как описано ниже:

Эксперимент проводят как перекрестное исследование на четырех лапах у 12 собак

породы бигль, разделенных на четыре группы. Все животные получают тестируемый препарат А и стандартный препарат В в дозе примерно 90 мкг/кг в подходящем буфере, таком как глицилглициновый буфер (рН 5,5), содержащий хлорид натрия (2,92 мг/мл), дигидрат хлорида кальция (1,47 мг/мл), маннит (30 мг/мл) и полисорбат 80. Образцы крови берут через 10, 30 и 60 минут и 2, 3, 4, 6 и 8 часов после первоначального введения. Плазму получают из образцов, и белок количественно определяют с помощью ELISA.

В одной форме осуществления модифицирующая группа включает производное жирной кислоты. В следующей форме осуществления модифицирующая группа включает C12, C14, C16, C18 и C20 производное жирной кислоты. Не связываясь теорией, и, как упомянуто выше, считают, что альбумин, который присутствует в большом количестве в крови, связывает низкомолекулярные жирные кислоты с микро- наномолярным сродством. Альбумин, таким образом, функционирует как молекула-носитель, которая защищает пептид от почечного клиренса, нейтрализующих антител, рецептор-опосредованного клиренса или протеолитической атаки. Таким образом, в настоящем изобретении предложены конъюгированные аналоги факторов свертывания крови, обладающие повышенными периодами полувыведения из плазмы *in vivo* по сравнению с соответствующим неконъюгированным фактором.

В одной форме осуществления модифицирующая группа включает соединение формулы (II):



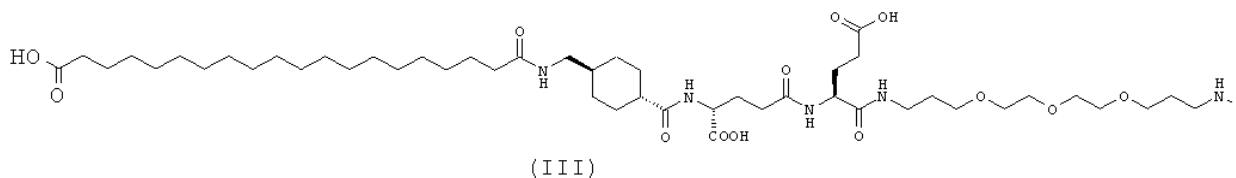
где R¹ представляет собой атом водорода, -COOH, тетразолил или -C(=O)-NHS(=O)₂-R²;

n представляет собой целое число, выбранное из любого из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25; и

R² представляет собой C₁₋₆алкил, фенил, C₁₋₆алкилфенил, C₁₋₂₀алкилтетразолил или C₁₋₂₀алкилкарбоксил.

В одной форме осуществления R^1 представляет собой -COOH и n представляет собой целое число, выбранное из 12-18 (например, 12, 14, 16 или 18).

В одной форме осуществления модифицирующая группа включает соединение формулы (III):



В одной форме осуществления модифицирующая группа и/или фактор свертывания крови дополнительно включают группировку конъюгации, имеющую такую структуру, чтобы способствовать конъюгации. Например, в одной форме осуществления модифицирующая группа включает группировку конъюгации, выбранную из гидроксилламинной группировки. Такая гидроксилламинная группировка будет пригодна для конъюгации с рядом функционализированных факторов свертывания крови (например, окисленных производных факторов свертывания крови). Такие окисленные

производные факторов свертывания крови могут быть получены путем прямого окисления (например, периодной кислотой), когда гликановые группировки присутствуют на факторе свертывания крови (как описано в WO 2008/025856), или

путем соответствующей эксцизии, чтобы дать возможность окисления галактозооксидазой (как описано в WO 2005/014035). В том случае, когда доступный остаток галактозы или сиаловой кислоты отсутствует на факторе свертывания крови, он может быть галактозилирован или сиалилирован перед окислением, используя галактозилтрансферазу или сиалилтрансферазу.

В альтернативной форме осуществления модифицирующая группа включает группировку конъюгации, выбранную из малеимидной или галогеноацетатной группировки. Такие малеимидные и галогеноацетатные группировки будут пригодны для конъюгации с рядом функционализированных факторов свертывания крови (например, с фактором свертывания крови, имеющим свободный или частично свободный остаток цистеина). Понятно, что факторы свертывания крови могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь свободный или частично свободный остаток цистеина (как описано в WO 2006/134174). В некоторых случаях остатки цистеина могут быть частично блокированы посредством смешанной дисульфидной связи, например, с глутатионом. В таких случаях он может быть частично удален перед конъюгацией путем осторожного регулирования редокс-потенциала (GSSG/GSH) в присутствии глутаредоксина. Поверхностно экспонированные цистеины можно также разблокировать химическим путем с использованием, например, восстанавливающих агентов на основе фосфина, таких как трикарбоксиэтилфосфин или трис(3-сульфонатофенил)фосфин (как описано в US 2006/0115876). Свободные тиолы на факторе свертывания крови можно также подвергать взаимодействию с активированными сульфидами, такими как тиопиридил-активированные сульфиды, с образованием смешанных дисульфидов.

В альтернативных формах осуществления фактор свертывания крови можно конъюгировать с модифицирующей группой, используя окисление N-концевого серина с последующим, например, оксимированием (как описано в WO 2006/122982), C-концевой транспептидацией с использованием карбоксипептидазы (как описано в WO 2005/035553) и с соответствующим образом сконструированными производными модифицирующей группы путем использования транслутаминазы (как описано в WO 2005/070468), либо путем прямого ацилирования на боковых цепях лизина с использованием, например, модифицирующих групп, активированных NHS эфиром или гидроксibenзотриазолиловым эфиром.

Конъюгированные факторы свертывания крови по изобретению и фармацевтические композиции, содержащие конъюгированные факторы свертывания крови, можно применять при лечении заболеваний, облегчаемых введением факторов свертывания крови (например, FVII(a), FVIII или FIX), таких как расстройство, связанное с кровотечением, например гемофилии, заболевания крови, гемартроза, гематом, кожно-слизистого кровотечения, наследственного заболевания крови, семейного расстройства, связанного с кровотечением, семейного заболевания крови или заместительной терапии фактора. В одной форме осуществления заболевание, облегчаемое введением фактора свертывания крови, представляет собой гемофилию, такую как гемофилия В или дефицит фактора IX.

Таким образом, в соответствии с первым аспектом изобретения предложен способ лечения гемофилии, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированного фактора свертывания крови, как определено в данной

заявке выше.

Также предложен конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в данной заявке выше, для применения при лечении гемофилии.

Также предложено применение конъюгированного фактора свертывания крови, как определено в данной заявке выше, при получении лекарства для лечения гемофилии.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в данной заявке выше, для применения при лечении гемофилии.

Должно быть понятно, что терапевтический и профилактический (превентивный) режимы составляют отдельные аспекты настоящего изобретения. В частности, должно быть понятно, что в настоящем изобретении предложены конъюгированные факторы свертывания крови с повышенными периодами полувыведения из плазмы, которые делают их желательными для профилактического лечения гемофилии. Такое профилактическое лечение гемофилии составляет предпочтительную форму осуществления изобретения.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предложен фармацевтический препарат, содержащий конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в данной заявке выше.

Этот препарат может дополнительно содержать буферную систему, консервант(ы), тонический агент(ы), хелатирующий агент(ы), стабилизаторы и сурфактанты. В одной форме осуществления изобретения фармацевтический препарат представляет собой водный препарат, то есть препарат, содержащий воду. Такой препарат типично представляет собой раствор или суспензию. В одной форме осуществления изобретения фармацевтический препарат представляет собой водный раствор.

В одной форме осуществления фармацевтический препарат представляет собой лиофилизированный препарат, к которому врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением.

В одной форме осуществления фармацевтический препарат представляет собой высушенный препарат (например, лиофилизированный или высушенный распылительной сушкой), готовый к применению без какого-либо предварительного растворения.

В одной форме осуществления изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему водный раствор конъюгированного фактора свертывания крови по настоящему изобретению и буфер, где конъюгированный фактор свертывания крови присутствует при концентрации от 0,1 до 100 мг/мл, и где препарат имеет рН от примерно 2,0 до примерно 10,0.

В одной форме осуществления изобретения рН препарата выбран из перечня, состоящего из 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 и 10,0.

В одной форме осуществления изобретения буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицилглицина, (2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), 3-(М-морфолино)пропансульфоновой кислоты (MOPS); 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES); N-циклогексил-3-аминопропансульфоновой кислоты (CAPS); М-циклогексил-2-аминоэтансульфоновой кислоты (CHES); гистидина, глицина, лизина, аргинина, дигидрофосфата натрия, динатрия гидрофосфата, фосфата натрия и трис(гидроксиметил)аминометана, бицина,

трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей. Каждый из этих конкретных буферов составляет альтернативную форму осуществления изобретения.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит ингибитор активного центра.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В одной форме осуществления изобретения консервант выбран из группы, состоящей из фенола, орто-крезола, мета-крезола, пара-крезола, метил-пара-гидроксibenзоата, пропил-пара-гидроксibenзоата, 2-феноксиэтанола, бутил-пара-гидроксibenзоата, 2-фенилэтанола, бензилового спирта, хлорбутанола и тиомеросала, бронопола, бензойной кислоты, имидомочевины, хлоргексидина, дегидроацетата натрия, хлоркрезола, этил-пара-гидроксibenзоата, бензетония хлорида, хлорфенезина (3-пара-хлорфеноксипропан-1,2-диола) или их смесей.

В одной форме осуществления изобретения консервант присутствует при концентрации от 0,1 мг/мл до 20 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения консервант присутствует при концентрации от 0,1 мг/мл до 5 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения консервант присутствует при концентрации от 5 мг/мл до 10 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения консервант присутствует при концентрации от 10 мг/мл до 20 мг/мл. Каждый из этих конкретных консервантов составляет альтернативную форму осуществления изобретения. Использование консервантов в фармацевтических композициях хорошо известно специалистам в данной области техники. Для удобства можно сделать ссылку на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит изотонический агент. В одной форме осуществления изобретения изотонический агент выбран из группы, состоящей из соли (например, хлорида натрия), сахара или сахарного спирта, аминокислоты (например, L-глицина, L-гистидина, аргинина, лизина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, триптофана, треонина), альдита (например, глицерина, 1,2-пропандиола (пропиленгликоля), 1,3-пропандиола, 1,3-бутандиола) полиэтиленгликоля (например, ПЭГ400) или их смесей. Можно использовать любой сахар, такой как моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые гликаны, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу-Na. В одной форме осуществления сахарная добавка представляет собой сахарозу. Сахарный спирт определяют как C4-C8 углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН группу, и включает, например, маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. В одной форме осуществления добавка сахарного спирта представляет собой маннит. Сахара или сахарные спирты, упомянутые выше, можно использовать индивидуально или в комбинации. Нет фиксированного предела используемого количества, насколько сахар или сахарный спирт растворим в жидком препарате, и не оказывает вредного влияния на стабилизирующие эффекты, достигнутые с использованием способов по изобретению. В одной форме осуществления концентрация сахара или сахарного спирта составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 150 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения изотонический агент присутствует при концентрации от 1 мг/мл до 50 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения изотонический агент присутствует при концентрации от 1 мг/мл до 7 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения изотонический агент присутствует при концентрации

от 8 мг/мл до 24 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения изотонический агент присутствует при концентрации от 25 мг/мл до 50 мг/мл. Каждый из этих конкретных изотонических агентов составляет альтернативную форму осуществления изобретения. Использование изотонического агента в фармацевтических композициях хорошо известно специалистам в данной области техники. Для удобства можно сделать ссылку на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит хелатирующий агент. В одной форме осуществления изобретения хелатирующий агент выбран из солей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), лимонной кислоты и аспарагиновой кислоты, а также их смесей. В одной форме осуществления изобретения хелатирующий агент присутствует при концентрации от 0,1 мг/мл до 5 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения хелатирующий агент присутствует при концентрации от 0,1 мг/мл до 2 мг/мл. В одной форме осуществления изобретения хелатирующий агент присутствует при концентрации от 2 мг/мл до 5 мг/мл. Каждый из этих конкретных хелатирующих агентов составляет альтернативную форму осуществления изобретения. Использование хелатирующего агента в фармацевтических композициях хорошо известно специалистам в данной области техники. Для удобства можно сделать ссылку на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит стабилизатор. Использование стабилизатора в фармацевтических композициях хорошо известно специалистам в данной области техники. Для удобства можно сделать ссылку на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

Более конкретно композиции по изобретению представляют собой стабилизированные жидкие фармацевтические композиции, терапевтически активные ингредиенты которых включают полипептид, который, возможно, проявляет образование агрегатов во время хранения в жидких фармацевтических препаратах. Под "образованием агрегатов" подразумевают физическое взаимодействие между молекулами полипептида, которое приводит в результате к образованию олигомеров, которые могут оставаться растворимыми, или больших видимых агрегатов, которые выпадают в осадок из раствора. Под "временем хранения" подразумевают, что, как только готовят жидкую фармацевтическую композицию или препарат, его не сразу вводят субъекту. Вероятнее, после приготовления его упаковывают для хранения, либо в жидкой форме, либо в замороженном состоянии, либо в высушенной форме для последующего восстановления в жидкой форме или в другой форме, пригодной для введения субъекту. Под "высушенной формой" подразумевают, что жидкую фармацевтическую композицию или препарат сушат либо путем сушки вымораживанием (то есть лиофилизации, см., например, Williams and Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), либо путем распылительной сушки (см. Masters (1991) в Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; и Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), либо путем сушки на воздухе (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; и Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

Образование агрегатов полипептидом при хранении жидкой фармацевтической композиции может оказывать вредное влияние на биологическую активность этого полипептида, что приводит в результате к потере терапевтической эффективности фармацевтической композиции. Кроме того, образование агрегатов может вызвать другие проблемы, такие как закупорка трубок, мембран или насосов, когда

фармацевтическую композицию, содержащую полипептид, вводят с использованием инфузионной системы.

Фармацевтические композиции по изобретению могут дополнительно содержать количество аминокислотного основания, достаточное для уменьшения образования агрегатов полипептидом во время хранения композиции. Под "аминокислотным основанием" подразумевают аминокислоту или комбинацию аминокислот, где любая данная аминокислота присутствует либо в ее форме свободного основания, либо в ее солевой форме. Где используют комбинацию аминокислот, все аминокислоты могут присутствовать в их формах свободного основания, все могут присутствовать в их солевых формах, либо некоторые могут присутствовать в их формах свободного основания, тогда как другие присутствуют в их солевых формах. В одной форме осуществления аминокислоты для использования при приготовлении композиций по изобретению представляют собой аминокислоты, несущие заряженную боковую цепь, такие как аргинин, лизин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Любой стереоизомер (то есть, L, D или их смеси) конкретной аминокислоты (например, метионина, гистидина, имидазола, аргинина, лизина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, триптофана, треонина и их смесей) или комбинации этих стереоизомеров могут присутствовать в фармацевтических композициях по изобретению, насколько конкретная аминокислота присутствует либо в ее форме свободного основания, либо в ее солевой форме. В одной форме осуществления используют L-стереоизомер.

Композиции по изобретению можно также готовить с аналогами этих аминокислот. Под "аналогом аминокислоты" подразумевают производное природной аминокислоты, которое вызывает желаемый эффект уменьшения образования агрегатов полипептидом во время хранения жидких фармацевтических композиций по изобретению. Подходящие аналоги аргинина включают, например, аминокуанидин, орнитин и M-моноэтил-1-- аргинин, подходящие аналоги метионина включают этионин и бутионин, и подходящие аналоги цистеина включают S-метил-L-цистеин. Как и другие аминокислоты, аналоги аминокислот включают в композиции либо в их форме свободного основания, либо в их солевой форме. В одной форме осуществления изобретения аминокислоты или аналоги аминокислот используют в концентрации, которая достаточна для предотвращения или замедления агрегации белка.

В одной форме осуществления изобретения метионин (или другие серосодержащие аминокислоты или аналоги аминокислот) можно добавлять для ингибирования окисления остатков метионина до метионинсульфоксида, когда полипептид, действующий в качестве терапевтического агента, представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере один остаток метионина, чувствительный к такому окислению. Под "ингибированием" подразумевают минимальное накопление окисленных молекул метионина со временем. Ингибирование окисления метионина приводит в результате к большему сохранению полипептида в его правильной молекулярной форме. Можно использовать любой стереоизомер метионина (L, D или их смеси) или их комбинации. Количество, которое нужно добавлять, должно составлять количество, достаточное для ингибирования окисления остатков метионина, так чтобы количество метионинсульфоксида было приемлемо для регуляторных органов. Типично это означает, что композиция содержит не более чем от примерно 10% до примерно 30% метионинсульфоксида. Как правило, этого можно достичь путем добавления метионина, так чтобы отношение добавленного метионина к остаткам метионина находилось в интервале от примерно 1:1 до примерно 1000:1, как, например, от 10:1 до примерно 100:1.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит стабилизатор, выбранный из группы высокомолекулярных полимеров или низкомолекулярных соединений. В одной форме осуществления изобретения стабилизатор выбран из полиэтиленгликоля (например, ПЭГ 3350), поливинилового спирта (PVA), поливинилпирролидона, карбокси-/гидроксицеллюлозы или ее производных (например, НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстринов, серосодержащих веществ, таких как монотиоглицерин, тиогликолевая кислота и 2-метилтиоэтанол, и различных солей (например, хлорида натрия). Каждый из этих конкретных стабилизаторов составляет альтернативную форму осуществления изобретения.

Фармацевтические композиции могут также содержать дополнительные стабилизирующие агенты, которые дополнительно усиливают стабильность терапевтически активного полипептида в композиции. Стабилизирующие агенты, представляющие особый интерес для настоящего изобретения, включают, но не ограничены ими, метионин и ЭДТА, которые защищают полипептид от окисления метионина, и неионный сурфактант, который защищает полипептид от агрегации, связанной с замораживанием - оттаиванием или механическим сдвигом.

В одной форме осуществления изобретения препарат дополнительно содержит сурфактант. В одной форме осуществления изобретения сурфактант выбран из детергента, этоксилированного касторового масла, полиглицозилированных гликозидов, ацетилованных моноглицеридов, эфиров сорбитана и жирных кислот, блок-сополимеров полиоксипропилена и полиоксиэтилена (например, полуксамеров, таких как Pluronic® F68, полуксамер 188 и 407, Тритон X-100), эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, производных полиоксиэтилена и полиэтилена, таких как алкилированные и алкоксилированные производные (твины, например, Твин-20, Твин-40, Твин-80 и Brij-35), моноглицеридов или их этоксилированных производных, диглицеридов или их полиоксиэтиленовых производных, спиртов, глицерина, пектинов и фосфолипидов (например, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, фосфотидилэтаноламина, фосфатидилинозита, дифосфатидилглицерина и сфингомиелина), производных фосфолипидов (например, дипальмитоилфосфатидной кислоты) и лизофосфолипидов (например, пальмитоиллизофосфатидил-1-серина и эфиров 1-ацил-3-глицеро-3-фосфата и этаноламина, холина, серина или треонина) и алкил-, алкоксил(алкилэфир)-, алкокси(алкилэфир)-производных лизофосфатидил- и фосфатидилхолинов, например, лауроил- и миристоил-производных лизофосфатидилхолина, дипальмитоиллизофосфатидилхолина и модификаций полярной головной группы, то есть холинов, этаноламинов, фосфатидной кислоты, серинов, треонинов, глицерина, инозита и положительно заряженных DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, лизофосфатидилсерина и лизофосфатидилтреонина, и глицерофосфолипидов (например, цефалинов), глицерогликолипидов (например, галактопиранозидов), сфингогликолипидов (например, церамидов, ганглиозидов), додецилфосфохолина, лизолецитина куриных яиц, производных фузидовой кислоты (например, тауродигидрофузидата натрия и т.д.), длинноцепочечных жирных кислот и их солей C6-C12 (например, олеиновой кислоты и каприловой кислоты), ацилкарнитинов и их производных, N^αацилированных производных лизина, аргинина или гистидина, или ацилированных по боковой цепи производных лизина или аргинина, N^ε-ацилированных производных дипептидов, содержащих любую комбинацию лизина, аргинина или гистидина и нейтральной или кислой аминокислоты, N^ε-ацилированного производного трипептида, содержащего

любую комбинацию нейтральной аминокислоты и двух заряженных аминокислот, DSS (докузата натрия, регистрационный № CAS [577-11-7]), докузата кальция, регистрационный № CAS [128-49-4]), докузата калия, регистрационный № CAS [7491-09-0]), ДСН (додецилсульфата натрия или лаурилсульфата натрия), каприлата натрия, 5 холевой кислоты или ее производных, желчных кислот и их солей и конъюгатов глицина или таурина, урсодезоксихолевой кислоты, холата натрия, деоксихолата натрия, таурохолата натрия, гликохолата натрия, N-гексадецил-N, N-диметил-3-аммоний-1-пропансульфоната, анионных (алкиларилсульфонатов) моновалентных сурфактантов, цвиттерионных сурфактантов (например, N-алкил-N,N-диметиламмоний-1-пропансульфонатов, 10 3-холамида-1-пропилдиметиламмоний-1-пропансульфоната, катионных сурфактантов (оснований четвертичного аммония) (например, цетилтриметиламмония бромида, цетилпиридиния хлорида), неионных сурфактантов (например, додецил-β-D-глюкопиранозид), полуксаминов (например, Tetronic), которые представляют собой тетрафункциональные блок-сополимеры, образованные в результате последовательного присоединения пропиленоксида и этиленоксида к 15 этилендиамину, либо сурфактант может быть выбран из группы производных имидазолина или их смесей. Каждый из этих конкретных сурфактантов составляет альтернативную форму осуществления изобретения.

Использование сурфактанта в фармацевтических композициях хорошо известно 20 специалистам в данной области техники. Для удобства можно сделать ссылку на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

Возможно, что другие ингредиенты могут присутствовать в фармацевтическом препарате по настоящему изобретению. Такие дополнительные ингредиенты могут 25 включать увлажняющие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, тонические модификаторы, хелатирующие агенты, ионы металлов, маслянистые носители, белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттерион (например, аминокислоту, такую как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, конечно, не должны оказывать вредного влияния на общую стабильность фармацевтического препарата по настоящему изобретению. 30

Фармацевтические композиции, содержащие конъюгированный фактор свертывания крови по настоящему изобретению, можно вводить пациенту, нуждающемуся в таком 35 лечении, в нескольких сайтах, например в местных сайтах, например сайтах кожи и слизистой оболочки, в сайтах, которые обходят всасывание, например, введение в артерию, в вену, в сердце, и в сайтах, в которые вовлечено всасывание, например введение в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшину.

Введение фармацевтических композиций в соответствии с изобретением можно осуществлять посредством нескольких путей введения, например язычного, 40 подъязычного, трансбуккального, в полости рта, перорального, в желудок и кишечник, назального, легочного, например, через бронхиолы и альвеолы, или их комбинации, эпидермального, кожного, чрескожного, вагинального, ректального, глазного, например, через конъюнктиву, уретрального или парентерального, пациентам, нуждающимся в таком лечении.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить в нескольких лекарственных формах, например в виде растворов, суспензий, эмульсий, микроэмульсий, 45 множественных эмульсий, пенек, бальзамов, паст, пластырей, мазей, таблеток, таблеток с покрытием, полосканий, капсул, например твердых желатиновых капсул и мягких желатиновых капсул, суппозиторий, ректальных капсул, капель, гелей, спреев, порошка, аэрозолей, ингаляционных препаратов, глазных капель, глазных мазей, глазных

полосканий, вагинальных пессариев, вагинальных колец, вагинальных мазей, инъекционного раствора, растворов, преобразующихся *in situ*, например образующих гель *in situ*, осаждающихся *in situ*, выпадающих в осадок *in situ*, кристаллизующихся *in situ*, инфузионного раствора и имплантатов.

5 Композиции по изобретению можно дополнительно объединять или соединять, например, посредством ковалентных, гидрофобных и электростатических взаимодействий, с носителем лекарства, системой доставки лекарства и прогрессивной системой доставки лекарства с целью дополнительного усиления стабильности пептида по настоящему изобретению, повышения биодоступности, повышения растворимости, 10 снижения вредных эффектов, достижения хронотерапии, хорошо известной специалистам в данной области техники, и повышения соблюдения пациентом режима и схемы лечения, или любой их комбинации. Примеры носителей, систем доставки лекарства и прогрессивных систем доставки лекарства включают, но не ограничены ими, полимеры, например целлюлозу и ее производные, полисахариды, например декстран и его 15 производные, крахмал и его производные, поли(виниловый спирт), полимеры акрилата и метакрилата, полимер молочной и полимер гликолевой кислоты и их блок-сополимеры, полиэтиленгликоли, белки-носители, например, альбумин, гели, например системы термического гелеобразования, например блок-сополимерные системы, хорошо известные специалистам в данной области техники, мицеллы, липосомы, микросферы, 20 наночастицы, жидкие кристаллы и их дисперсии, L2 фазу и ее дисперсии, хорошо известные специалистам в области поведения фаз в жидкостно-водных системах, полимерные мицеллы, множественные эмульсии, самоэмульгирующие системы, системы, самостоятельно образующие микроэмульсии, циклодекстрины и их производные, и дендримеры.

25 Композиции по настоящему изобретению полезны при изготовлении твердых, полутвердых, порошкообразных препаратов и растворов для легочного введения пептида по настоящему изобретению, используя, например, ингалятор мерной дозы, ингалятор сухого порошка и небулайзер, все из которых являются устройствами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

30 Композиции по настоящему изобретению особенно полезны при изготовлении систем доставки лекарств регулируемого, ограниченного, пролонгированного, замедленного и медленного высвобождения. Более конкретно, но не ограничено, композиции полезны при изготовлении парентеральных систем регулируемого высвобождения и ограниченного высвобождения (обе системы приводят к многократному снижению 35 числа введений), хорошо известных специалистам в данной области техники. Даже более предпочтительны системы регулируемого высвобождения и ограниченного высвобождения, вводимые подкожно. Без ограничения объема изобретения примерами полезных систем и композиций регулируемого высвобождения являются гидрогели, маслянистые гели, жидкие кристаллы, полимерные мицеллы, микросферы и наночастицы.

40 Способы получения систем регулируемого высвобождения, полезные для композиций по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, кристаллизацию, конденсацию, совместную кристаллизацию, осаждение, соосаждение, эмульгирование, дисперсию, гомогенизацию высокого давления, инкапсуляцию, распылительную сушку, микроинкапсуляцию, коацервацию, разделение фаз, выпаривание растворителя с 45 получением микросфер, экструзию и сверхкритические жидкостные процессы. Общую ссылку делают на Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L, ed. Marcel Dekker, New York, 2000) и Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

Парентеральное введение можно осуществлять путем подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекции с помощью шприца, возможно шприца карандашного типа. Альтернативно парентеральное введение можно осуществлять с помощью инфузионного насоса. Дополнительной возможностью является композиция, которая может представлять собой раствор или суспензию для введения пептида по настоящему изобретению в форме назального или легочного спрея. В качестве еще одной дополнительной возможности фармацевтические композиции, содержащие пептид по настоящему изобретению, могут быть также адаптированы для чрескожного введения, например, с помощью безыгольной инъекции или посредством пластыря, возможно ионтофоретического пластыря, или через слизистую оболочку, например, трансбуккального введения.

Термин "стабилизированная композиция" относится к композиции с повышенной физической стабильностью, повышенной химической стабильностью или повышенной физической и химической стабильностью.

Термин "физическая стабильность" белковой композиции, как используют в данной заявке, относится к тенденции белка к образованию биологически неактивных и/или нерастворимых агрегатов белка в результате воздействия на белок термомеханических нагрузок и/или взаимодействия с границами раздела и поверхностями, которые являются дестабилизирующими, такими как гидрофобные поверхности и границы раздела.

Физическую стабильность водных белковых композиций оценивают с помощью визуального осмотра и/или измерений мутности после воздействия на препарат, заполненный в подходящие контейнеры (например, картриджи или флаконы), механической/физической нагрузки (например, взбалтывания) при различных температурах в течение различных периодов времени. Визуальный осмотр композиций проводят в четко сфокусированном свете на темном фоне. Мутность композиций характеризуют визуальным баллом распределения степени мутности, например, на шкале от 0 до 3 (композиция, не показывающая мутности, соответствует визуальному баллу 0, а композиция, проявляющая визуальную мутность в дневном свете, соответствует визуальному баллу 3). Композицию классифицируют как физически нестабильную в отношении агрегации белка, когда она показывает визуальную мутность в дневном свете. Альтернативно мутность композиции можно оценить с помощью простых измерений мутности, хорошо известных специалистам в данной области техники. Физическую стабильность водных белковых композиций можно также оценить путем использования спектроскопического агента или пробы конформационного состояния белка. Эта проба предпочтительно представляет собой малую молекулу, которая преимущественно связывается с ненативным конформером белка. Одним из примеров низкомолекулярной спектроскопической пробы структуры белка является тиофлавин Т. Тиофлавин Т представляет собой флуоресцентный краситель, который широко применяли для обнаружения амилоидных фибрилл. В присутствии фибрилл и, возможно, также других конфигураций белка тиофлавин Т вызывает новый максимум возбуждения примерно при 450 нм и усиленную эмиссию примерно при 482 нм при связывании с фибриллярной формой белка. Несвязанный тиофлавин Т является по существу не флуоресцентным при этих длинах волн.

В качестве проб на изменения в структуре белка от нативных до ненативных состояний можно использовать другие малые молекулы, например пробы на "гидрофобный пэтч", которые преимущественно связываются с доступными гидрофобными пэтчами белка. Эти гидрофобные пэтчи обычно углублены внутри третичной структуры белка в его нативном состоянии, но становятся доступными, как

только белок начинает разворачиваться или денатурировать. Примерами этих низкомолекулярных спектроскопических зондов являются ароматические гидрофобные красители, такие как антрацен, акридин, фенантролин или тому подобное. Другие спектроскопические пробы представляют собой комплексы металл-аминокислота, такие как комплексы металла кобальта с гидрофобными аминокислотами, такими как фенилаланин, лейцин, изолейцин, метионин и валин или тому подобное.

Термин "химическая стабильность" белковой композиции, как используют в данной заявке, относится к химическим ковалентным изменениям в структуре белка, приводящим к образованию продуктов химического распада с потенциальной потерей биологической эффективности и/или потенциально повышенными иммуногенными свойствами по сравнению с нативной структурой белка. Различные продукты химического распада могут образоваться в зависимости от типа и природы нативного белка, а также окружающей среды, под воздействием которой находится белок.

Элиминации химического распада наиболее вероятно нельзя полностью избежать, и возрастающие количества продуктов химического распада часто наблюдают в процессе хранения и применения белкового препарата, как хорошо известно специалистам в данной области техники. Большинство белков склонно к деамидированию, процессу, при котором амидная группа боковой цепи в остатках глутаминила или аспарагинила гидролизуетсся с образованием свободной карбоновой кислоты. Другие биохимические пути распада включают образование высокомолекулярных продуктов преобразования, где две или более чем две молекулы белка ковалентно связаны друг с другом посредством трансамидирования и/или дисульфидных взаимодействий, что приводит к образованию ковалентно связанных димерных, олигомерных и полимерных продуктов распада (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Окисление (например, остатков метионина) можно упомянуть как другой вариант химического распада. Химическую стабильность белковой композиции можно оценить путем измерения количества продуктов химического распада в различные моменты времени после воздействия различных условий окружающей среды (образование продуктов распада может быть часто ускорено, например, повышенной температурой). Количество каждого индивидуального продукта распада часто определяют путем разделения продуктов распада в зависимости от молекулярного размера и/или заряда, используя различные хроматографические методики (например, вытеснительную хроматографию по размеру - ВЭЖХ и/или ВЭЖХ с обращенной фазой).

Следовательно, как изложено выше, "стабилизированная композиция" относится к композиции с повышенной физической стабильностью, повышенной химической стабильностью или повышенной физической и химической стабильностью. Как правило, композиция должна быть стабильной во время применения и хранения (в соответствии с рекомендованными условиями применения и хранения) вплоть до достижения срока годности.

В одной форме осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат формулы (I), стабильна в течение более чем 6 недель применения и более чем 3 лет хранения.

В другой форме осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат формулы (I), стабильна в течение более чем 4 недель применения и более чем 3 лет хранения.

В следующей форме осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат формулы (I), стабильна в течение более чем 4 недель

применения и более чем двух лет хранения.

В следующей форме осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат формулы (I), стабильна в течение более чем 2 недели применения и более чем двух лет хранения.

- 5 В следующей форме осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат формулы (I), стабильна в течение более чем 1 недели применения и более чем шести месяцев хранения.

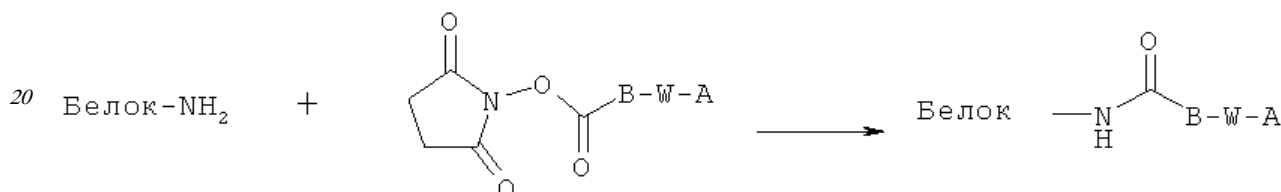
Общие способы получения

- 10 Группировки A-W-B- могут быть присоединены к белкам ферментативным путем или посредством реакционной химической группы. Выбор реакционной группы зависит от функциональной группы, присутствующей на альбумин-связывающем веществе, и функциональной группы на белке, подлежащем модификации.

(а) Химические реакционные группы

Активированные сложные эфиры

- 15 Активированные сложные эфиры, как правило, являются реакционными в отношении функциональных групп amino, таких как epsilon-аминогруппы на остатках лизина, и аминогруппа, присутствующая на М-конце пептидной/белковой цепи.

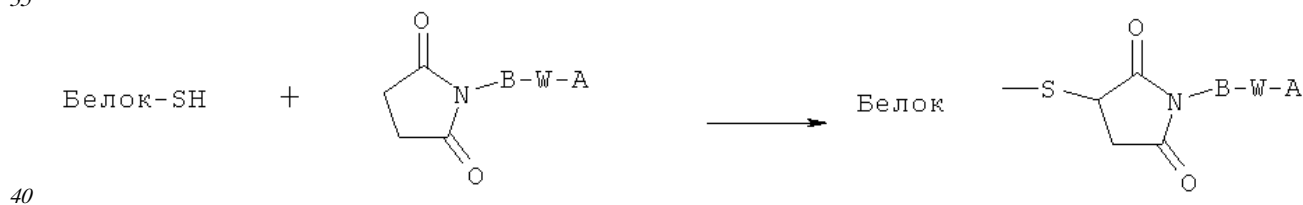


- 25 Подходящие активированные сложные эфиры включают N-гидроксисукцинимидиловые сложные эфиры, но специалистам в данной области техники известны другие активированные сложные эфиры, такие как эфиры гидроксибензотриазола, 3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксо-1,2,3-бензотриазина, 7-азабензотриазол-1-иловые эфиры или тому подобное.

- 30 В одной форме осуществления белок ацилируют нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, преобразованным в виде активированного сложного эфира в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

Сочетание со свободными тиольными группами

- 35 Белки могут содержать свободные тиольные группы, которые можно подвергать взаимодействию с альбумин-связывающими веществами, преобразованными малеимидом, как изображено ниже:



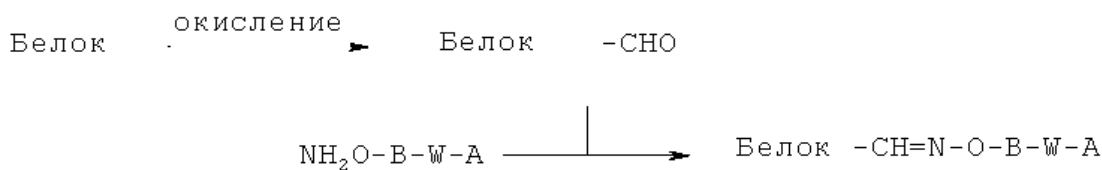
Другие тиольные реакционные группы включают галогеноацетамиды, например йодацетамиды или бромацетамиды, и S-тиопиридинные группы.

- 45 В одной форме осуществления белок, содержащий свободную тиольную группу, подвергают взаимодействию с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, функционализированным малеимидной группой, в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

Сочетание с альдегидными группами

Альдегидные функциональные группы могут быть образованы на белке путем

мягкого окисления М-концевых остатков серина или треонина или путем мягкого окисления гликановых группировок на гликобелке, как описано в WO 2008/025856 A2. Альбумин-связывающие вещества, функционализированные гидроксиламином, гидразином или гидразидами, можно последовательно подвергать сочетанию с белком, как изображено ниже:



В одной форме осуществления белок окисляют таким образом, чтобы он содержал альдегидную функциональную группу, и последовательно подвергают взаимодействию с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, функционализированным группой гидроксилламин, в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

(б) Ферментативные сочетания

Альбумин-связывающие вещества можно подвергать сочетанию с белками, используя ферменты.

Галактозооксидаза

Гликобелки, содержащие галактозные концы, могут быть окислены ферментативным путем, используя галактозооксидазу (ЕС. 1.1.3.9), как описано в WO 2005/014035 A2. Остатки галактозы на гликобелках часто непосредственно недоступны для ферментативного окисления, поскольку они блокированы присутствием сиаловых кислот. В таких случаях сиаловые кислоты необходимо удалить путем использования сиалидаз/нейраминидаз или путем мягкого кислотного гидролиза, после чего возможно окисление.



В одной форме осуществления гликобелок окисляют, используя галактозооксидазу, так что он содержит альдегидную функциональную группу, и последовательно подвергают взаимодействию с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, функционализированным группой гидроксилламин, в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

Трансглютаминаза

Трансглютаминаза (Е.С.2.3.2.13) также известна как белок-глутамин-у-глутамилтрансфераза и катализирует общую реакцию

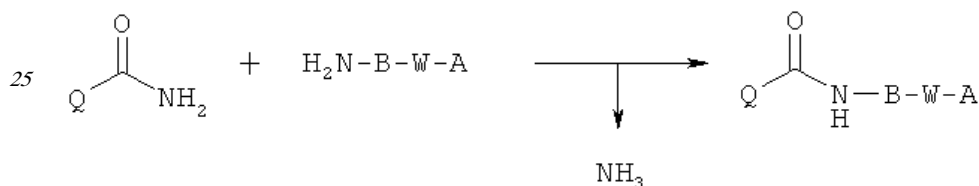


Q-C(O)-NH₂ (акцептор амина) может представлять собой пептид или белок, содержащий остаток глутамина, и Q'-NH₂ (донор амина) представляет собой аминокислотосодержащий нуклеофил. Альтернативно Q-C(O)-NH₂ и Q'-NH₂ могут представлять

собой акцептор амина и лизинсодержащий пептид или белок, соответственно. В настоящем изобретении, однако, Q-C(O)-NH₂ представляет собой белок, содержащий остаток глутамина, и Q'-NH₂ представляет собой аминоксодержащий нуклеофил, как

указано выше.

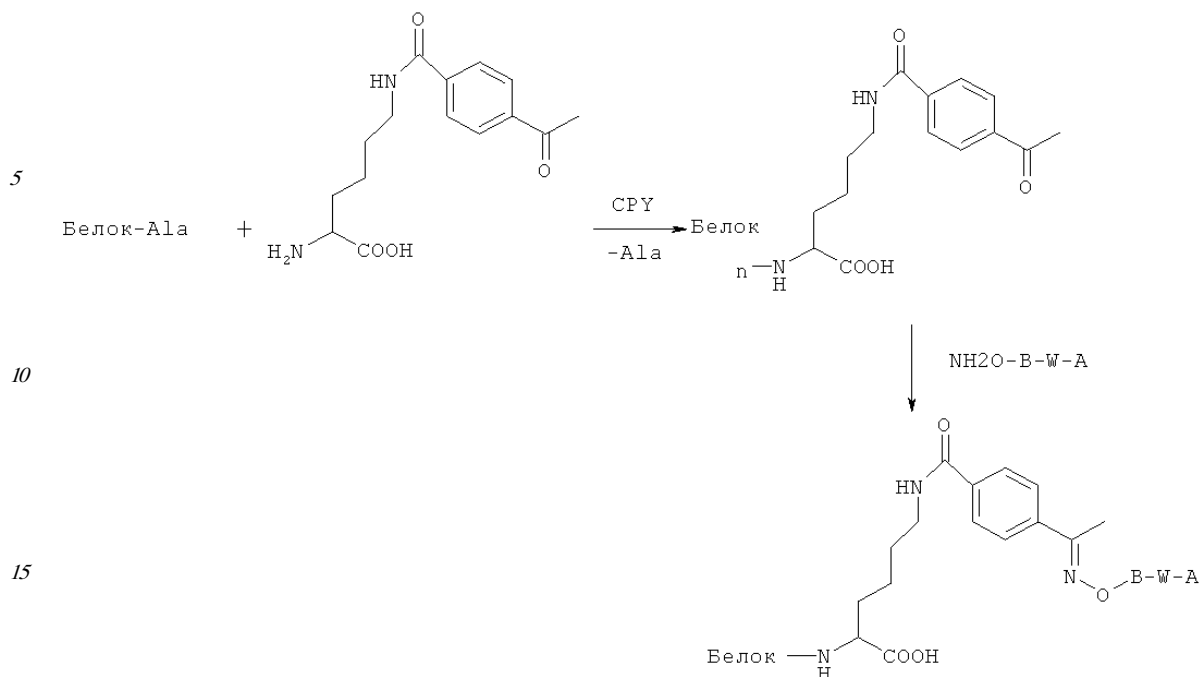
Примеры полезных транsgлутаминаз включают транsgлутаминазы микроорганизмов, такие как, например, из *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* и *Streptomyces griseocarneum* (все раскрыты в US 5156956, которая включена в данную заявку посредством ссылки), и из *Streptomyces lavendulae* (раскрыта в US 5252469, которая включена в данную заявку посредством ссылки) и *Streptomyces ladakanum* (JP 2003/199569, которая включена в данную заявку посредством ссылки). Следует отметить, что члены прежнего рода *Streptoverticillium* в настоящее время включены в род *Streptomyces* (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137, 1831-1892 (1991)). Другие полезные транsgлутаминазы микроорганизмов выделены из *Bacillus subtilis* (раскрыты в US 5731183, которая включена в данную заявку посредством ссылки) и из различных *Mucoromycetes*. Другими примерами полезных транsgлутаминаз микроорганизмов являются те, которые раскрыты в WO 96/06931 (например, транsgлутаминаза из *Bacillus licheniformis*) и WO 96/22366, обе из которых включены в данную заявку посредством ссылки. Полезные транsgлутаминазы не из микроорганизмов включают транsgлутаминазу из печени морской свинки и транsgлутаминазы из различных морских источников, таких как камбала *Pagrus major* (раскрыта в EP-0555649, которая включена в данную заявку посредством ссылки) и японская устрица *Crassostrea gigas* (раскрыта в US 5736356, которая включена в данную заявку посредством ссылки).



В одной форме осуществления белок обрабатывают транsgлутаминазой и нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, преобразованным носителем амина, в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

Карбоксипептидаза Y

Белки могут быть модифицированы в их С-конце путем использования карбоксипептидазы Y (EC. 3.4.16.5) и подходящих модифицированных субстратов, как описано в WO 2007/093594. Двухстадийная методика, которая описана в B. Peschke et al. "C-Terminally PEGylated hGH derivatives" Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 4382-4395, где С-концевой аланин ферментативным путем обменивается с N^ε-ацетилбензоил)лизином с последующим взаимодействием с альбумин-связывающим производным A-W-B-ONH₂, показана в качестве иллюстрации:



В одной форме осуществления белок обрабатывают карбоксипептидазой Y и N^ε-(4-ацетилбензоил)лизином, а затем нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом, преобразованным носителем аминокислот, в водном растворе в присутствии циклодекстрина или производного циклодекстрина.

Теперь изобретение будет описано со ссылкой на приведенные ниже не ограничивающие Примеры:

ПРИМЕРЫ

Используемые сокращения:

amu = единицы атомной массы

ч = час(ы)

Гц = Герц

л = литр(ы)

М = молярный

мбар = миллибар

мг = миллиграмм(ы)

МИН = МИНУТА(Ы)

мл = миллилитр(ы)

мМ = миллимолярный

мм = миллиметр(ы)

ММОЛЬ = МИЛЛИМОЛЬ

НМОЛЬ = НАНОМОЛЬ

МОЛЬ = МОЛЬ

MW = молекулярная масса

н. = нормальный

нм = нанометр(ы)

сек = секунда(ы)

млн⁻¹ = миллионные доли

ИЭР = ионизация электрораспылением

i.v. = внутривенный

m/z = отношение массы к заряду

МС = масс-спектрометрия

ВЭЖХ = жидкостная хроматография высокого давления

ОФ = обращенная фаза

ВЭЖХ-МС = жидкостная хроматография высокого давления - масс-спектрометрия

5 ЯМР = ядерная магнитно-резонансная спектроскопия

p.o. = пероральный

кг или КГ = комнатная температура

s.c. = подкожный

Rt = время удерживания

10 Вое = трет-бутоксикарбонил

OtBu = трет-бутиловый эфир

tBu = трет-бутил

Woc-4-ABZ-OH = 4-трет-бутоксикарбонил-аминобензойная кислота

CH₃CN = ацетонитрил

15 ДХМ = дихлорметан, CH₂Cl₂, метилхлорид

DIC = диизопропилкарбодиимид

DIPEA = N,N-диизопропилэтиламин

ДМФ = N,N-диметилформамид

ДМСО = диметилсульфоксид

20 ДТТ = дитиотрейтол

EDAC = 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид

Et₂O = диэтиловый эфир

EtOAc = этилацетат

25 Fmoc = 9H-флуорен-9-илметоксикарбонил

Fmoc-Glu-O-t-Bu = N-Fmoc-глутаминовой кислоты-1-трет-бутиловый эфир

Fmoc-Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(Дифенил-лара-толуилметил)-амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-гексановая кислота

Fmoc-OEG-OH = (2[2-(Fmoc-амино)этокси]этокси)уксусная кислота

30 H₂O = вода

HBTU = 2-(1H-Бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат

HOAt = 1-Гидрокси-7-азабензотриазол

HOBT = 1-Гидроксибензотриазол

MeCN = ацетонитрил

35 MeOH = метанол

NaCl = хлорид натрия

NaOH = гидроксид натрия

NMP = N-метилпирролидин-2-он

OEG = (2[2-(амино)этокси]этокси)уксусная кислота

40 OtBu = трет-бутиловый эфир

ТФУ = трифторуксусная кислота

ТГФ = тетрагидрофуран

TIS = триизопропилсилан

Trt = трифенилметил

45 TSTU = O-(N-сукцинимидил)-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат

CDCl₃ = дейтериохлороформ

CD₃OD = тетрадейтериометанол

ДМСО-d₆ = гексадейтериодиметилсульфоксид

TG-аза, используемая в примерах, представляет собой трансклутаминазу микроорганизмов из *Streptoverticillium mobaraense* в соответствии с US 5156956.

Примеры также содержат нижеописанные общие способы:

Капиллярный электрофорез

- 5 Капиллярный электрофорез проводили, используя систему Agilent Technologies 3DCE (Agilent Technologies). Снятие данных и обработку сигнала проводили, используя Agilent Technologies 3DCE ChemStation. Капилляр представлял собой 64,5 см (эффективная длина 56,0 см) 50 мкм i.d. "Extended Light Path Capillary" от Agilent. УФ обнаружение проводили при 200 нм (16 нм Bw, стандарт 380 нм и 50 нм Bw). Электролит пробега представлял собой фосфатный буфер 50 mM pH 7 (способ A). Капилляр уравнивали 0,1 M NaOH в течение 3 мин, затем водой Milli-Q в течение 2 мин и электролитом в течение 3 мин. После каждого пробега капилляр промывали водой Milli-Q в течение 2 мин, затем фосфорной кислотой в течение 2 мин и водой Milli-Q в течение 2 мин. Гидродинамическое впрыскивание осуществляли при 50 мбар в течение 4,0 сек.
- 15 Напряжение составляло +25 кВ. Температура составляла 30°C, и время пробега составляло 10,5 мин.

Масс-спектрометрия Maldi-Tof (времяпролетный спектр с лазерной десорбцией из матрицы)

- Молекулярные массы определяли, используя прибор Autoflex Maldi-Tof (Bruker).
- 20 Образцы готовили, используя альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту в качестве матрицы.

ОФ-ВЭЖХ

- Анализ ОФ-ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1100, используя колонку силикагеля Vydac 218TP54 4,6 мм × 250 мм, 5 мкм C-18 (The Separations Group, Hesperia). Обнаружение проводили с помощью УФ света при 214 нм, 254 нм, 280 нм и 301 нм. Колонку уравнивали 0,1% трифторуксусной кислотой/H₂O, и образец элюировали подходящим градиентом от 0 до 90% ацетонитрила против 0,1% трифторуксусной кислоты/H₂O.

ЖХ-МС

- 30 Анализ ЖХ-МС проводили на масс-спектрометре PE-Sciex API 100 или 150, оборудованном двумя микронасосами Perkin Elmer Series 200, автоматическим дозатором Perkin Elmer Series 200, УФ детектором Applied Biosystems 785A и детектором испарительного светорассеяния Sedex 75. Колонку силикагеля Waters Xterra 3,0 мм × 50 мм 5 мкм C-18 элюировали при 1,5 мл/мин при комнатной температуре. Колонку уравнивали 5% MeCN/0,1% ТФУ/H₂O и элюировали в течение 1,0 мин 5% MeCN/0,1% ТФУ/H₂O, а затем линейным градиентом до 90% MeCN/0,1% ТФУ/H₂O за 7 мин. Обнаружение проводили с помощью УФ при 214 нм и испарительного светорассеяния. Фракцию элюата с колонки вводили в устройство распылительной ионизации масс-спектрометра PE-Sciex API 100. Диапазон массы 300-2000 amu сканировали каждые 2 секунды в течение пробега.

Количественное определение белка

Концентрации белка оценивали путем измерения поглощения при 280 нм, используя УФ спектрофотометр NanoDrop ND-1000.

- 45 Ферментативное картирование пептида для определения сайта(ов) преобразования

Пептидное картирование проводили, используя расщепление Asp-N восстановленного и алкилированного белка. Сначала белок обрабатывали ДТТ и йодацетамидом в соответствии со стандартными методиками. Алкилированный продукт очищали,

используя ВЭЖХ. Затем алкилированный очищенный продукт расщепляли в течение ночи эндопротеазой Asp-N (Boehringer) при соотношении фермент : субстрат 1:100. Продукт расщепления разделяли на ВЭЖХ, используя колонку C-18 и стандартную буферную систему ТФУ/MeCN. Полученную в результате пептидную карту сравнивали с картой не преобразованного hGH, и фракции с различным временем удерживания собирали и дополнительно анализировали, используя спектрометрию Maldi-tof.

Электрофорез в ДСН-ПААГ

Электрофорез в полиакриламидном геле с ДСН проводили, используя 4% -12% бис-трис гели NuPAGE (Invitrogen NP0321BOX). Гели окрашивали серебром (Invitrogen LC6100) или Кумасси (Invitrogen LC6065) и при релевантности также окрашивали на ПЭГ йодидом бария, как описано М. М. Kurfurst в Anal. Biochem. 200(2), 244-248, (1992).

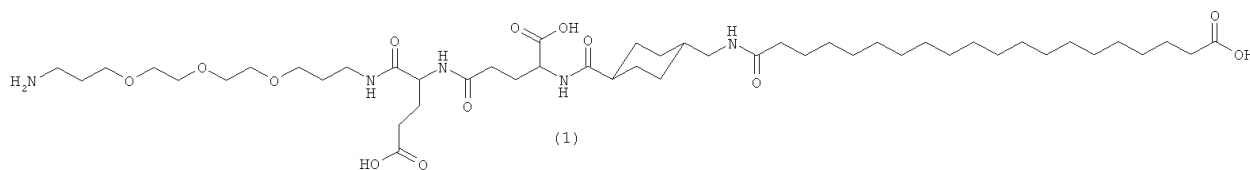
Хроматография белка

Хроматографию белка проводили на хроматографической системе Akta Explorer и колонках от GE Health Care. Анионный обмен осуществляли, используя колонку Q-Sepharose HP 26/10. Исходный буфер представлял собой 20 mM триэтаноламиновый буфер pH 8,5, и буфер элюирования представлял собой исходный буфер + 0,2 M NaCl. Соединения типично элюировали градиентом 0-75% буфера элюирования на 15 объемов колонки. Обессоливание и обмен буфера проводили, используя колонку HiPrep 26/10.

Пример А

Получение конъюгированного фактора Vila

Стадия (а) - Получение альбумин-связывающего вещества (1)



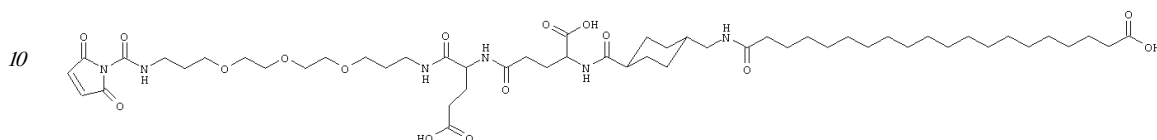
Альбумин-связывающее вещество (1) собирали с помощью общепринятого твердофазного синтеза, используя 2-хлортритилхлоридную смолу: Смолу замачивали для набухания в ДХМ, затем добавляли 10-кратный избыток 4,7,10-триокса-1,13-диамина. После промывания Fmoc-Glu(OtBu)OH, Fmoc-Glu-OtBu и Fmoc-Thex-OH (транс-аминовую кислоту) подвергали последовательному сочетанию и удалению защиты, используя НОВДИС и 30% пиперидин-ДМФ. Наконец, эйкозандикарбоновую кислоту с полностью удаленной защитой подвергали сочетанию при избытке, используя НОАС, ДИС, лутидин. Затем альбумин-связывающее вещество отщепляли от смолы, используя 10% ТФУ в ДХМ.

Стадия (а) - альтернативная методика

2-Хлортритиловую смолу (2,0 г, 2,6 ммоль) замачивали для набухания в ДХМ в течение 0,5 ч. Добавляли раствор 4,7,10-триокса-1,13-диамина в ДХМ (30 мл). Смолу перемешивали при кг в течение 1 ч. Смолу промывали один раз дихлорметаном, затем добавляли раствор DIPEA:MeOH:ДХМ (15 мл: 15 мл:20 мл). Смолу встряхивали в течение 30 мин, затем трижды промывали ДХМ. Затем FmocGlu(OtBu)OH, FmocGluOtBu и FmocThexOH последовательно подвергали сочетанию с помощью стандартной пептидной химии, как описано ниже: 0,5 М раствор каждого из Fmoc-AA-OH/DIC/НОВt в NMP (11,7 мл) - смешивали и через 2 мин добавляли к смоле. Смолу встряхивали в течение 45 мин при кг, а затем промывали 5x NMP и 5x ДХМ. Добавляли раствор AC₂O/DIPEA/NMP (1:1:5), и смолу перемешивали при кг в течение 10 мин. Смолу промывали (5x NMP и 5x ДХМ). Затем смолу обрабатывали 30% пиперидин-NMP в течение 2x10 мин и, наконец, промывали 5x NMP и 5x ДХМ. Затем к пептиду добавляли 0,25 М

раствор эйкозандикарбоновой кислоты (6 экв.), содержащий 0,125 М HOAt (3 экв.), 0,125 М DIC (3 экв.) и 0,125 М лутидин (3 экв.). Смолу встряхивали при кг в течение 2 ч. Смолу промывали 5х NMP и 8х ДХМ. Продукт (1) отщепляли от смолы, используя 10% ТФУ-ДХМ в течение 20 мин. Смолу фильтровали и обрабатывали смолу еще раз 10% ТФУ-ДХМ в течение дополнительных 20 мин. Объединенные фильтраты собирали и доводили до сухости.

Стадия (б) - Получение альбумин-связывающего вещества, функционализированного малеимидом (2)



Альбумин-связывающее вещество дополнительно функционализировали по свободной аминогруппе носителем малеимида путем добавления активированной TSTU 3-малеимидопропионовой кислоты в ДМФ. После окончательного удаления защиты в 95% ТФУ-MilliQ и перекристаллизации в ацетонитриле получили соединение формулы (2) в виде мелкого белого порошка.

Стадия (б) - Альтернативная методика

Продукт со стадии (а) выше растворяли в ДМФ (6 мл) и добавляли TSTU-активированную 3-малеимидопропионовую кислоту (предварительно полученную путем взаимодействия TSTU с 3-малеимидопропионовой кислотой в ДМФ (2 мл) в течение 45 мин) и DIPEA (200 мкл). Смесь перемешивали при кг в течение 1 ч. Затем реакционную смесь доводили до сухости. Остаток растворяли в 95% ТФУ-воде MilliQ и перемешивали при кг в течение 20 мин. Смесь доводили до сухости. К остатку добавляли минимальное количество воды для осаждения твердых веществ. Твердые вещества фильтровали и кристаллизовали в ацетонитриле. Кристаллы собирали и интенсивно промывали диэтиловым эфиром.

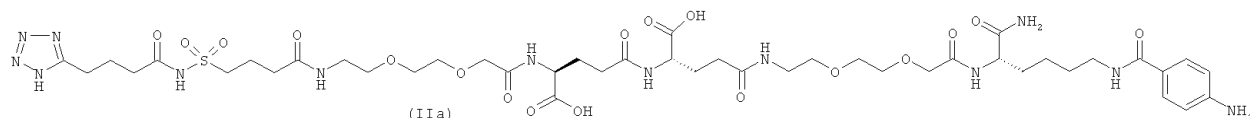
Стадия (в) - Конъюгация функционализированного малеимидом альбумин-связывающего вещества (2) с FVIIa

C407 Фактор VIIa использовали для конъюгации: к scFVIIaC407 в 50 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, pH 7,0 добавляли раствор (2) в 50 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, pH 7,0 + 5% 2-гидроксиэтил-бета-циклодекстрин и давали возможность взаимодействовать при 25°C в течение 1 ч. Образец концентрировали, и буфер заменяли свежим 50 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, pH 7,0, и апоферменту давали возможность самостоятельной активации в течение ночи при 25°C. Самостоятельную активацию и селективную конъюгацию тяжелой цепи подтверждали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ (восстанавливающие условия).

Пример 1

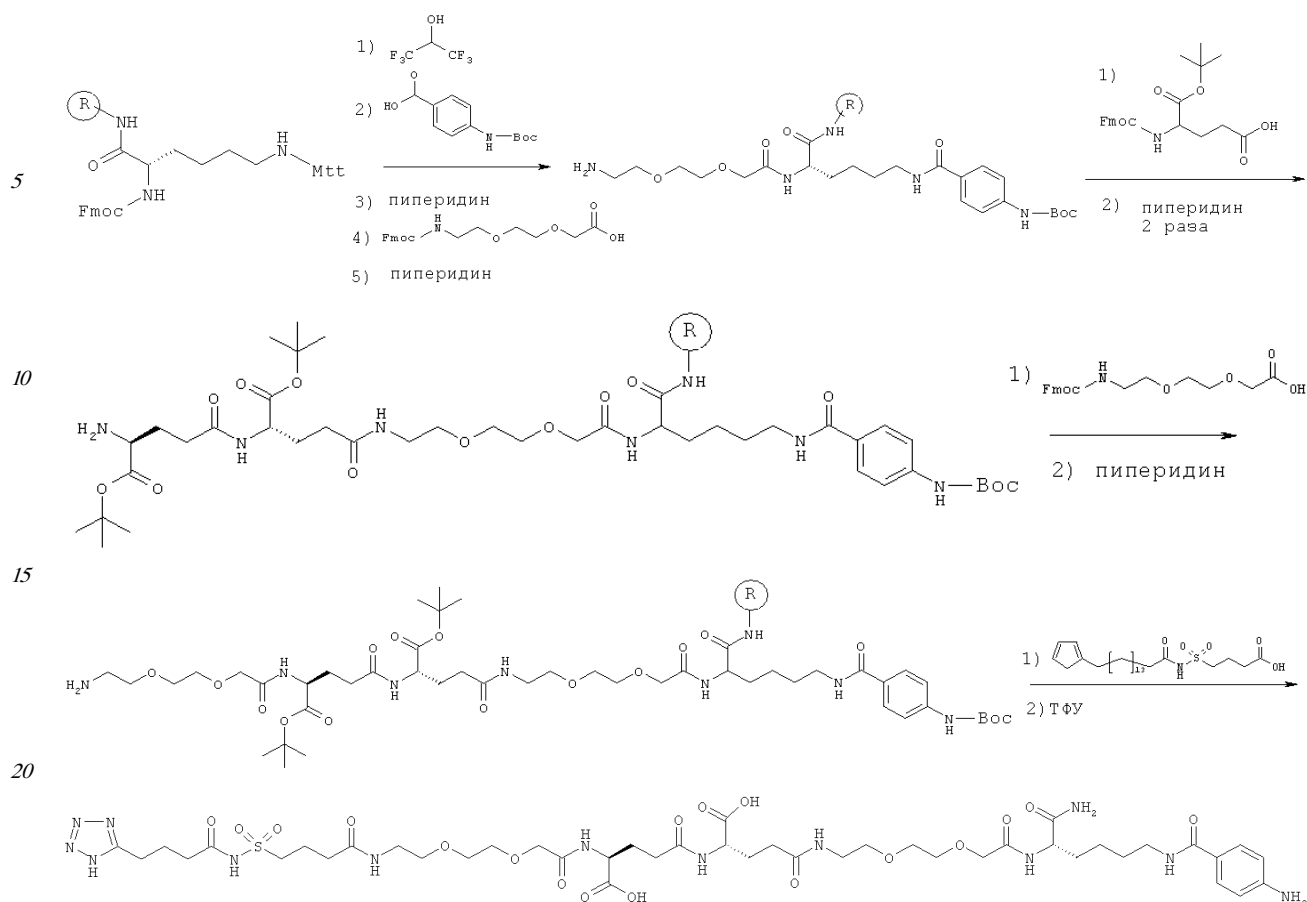
1. Получение альбумин-связывающих веществ (II)

Линкер тетразол OEG (Ha):



Линкер тетразол OEG (Ha) синтезировали в соответствии со схемой 1.

Схема 1



2 г амидной смолы Ринка (2 г, 0,6 ммоль/г) взвешивали в колбе. Смолу подвергали набуханию в NMP (3×30 мл) в течение 2 ч.

Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (30 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (30 мл) в течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×30 мл).

Фмос-Lys(Mtt)-ОН и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (30 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатой смоле, полученной выше, с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 21 ч. Смолу отжимали и промывали NMP (6×30 мл) с последующим промыванием ДХМ (3×30 мл).

Смолу обрабатывали гексафторизопропанолом (20 мл) в течение 10 мин. Встряхивали в течение 10 мин. Смолу отжимали и промывали ДХМ (3×30 мл). Смолу снова обрабатывали гексафторизопропанолом (20 мл) в течение 10 мин. Встряхивали в течение 10 мин. Смолу отжимали и промывали ДХМ (3×30 мл) с последующим отжимом и промыванием NMP (3 x 30 мл).

Вос-4-ABZ-ОН и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (30 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатым смоле, полученной выше, с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды. Смолу отжимали и промывали NMP (6×30 мл).

Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×15 мл).

Гмос-OEG-OH и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатым смолам с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды

в течение 23 ч. Смолу отжимали и промывали NMP (6×15 мл).

Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×15 мл).

5 Fmoc-Glu-O-f-Bu и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатой смоле с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 18ч. Смолу отжимали и промывали NMP (6×15 мл).

10 Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×15 мл).

Fmoc-Glu-O-t-Bu и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в 15 мл 0,5 мМ бромфенолового синего в NMP. Этот раствор добавляли к отжатой смоле с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре 15 окружающей среды в течение 18ч. Смолу отжимали и промывали NMP (6×15 мл).

Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×15 мл).

20 Fmoc-OEG-OH и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатой смоле с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды. Смолу отжимали и промывали NMP (6×15 мл).

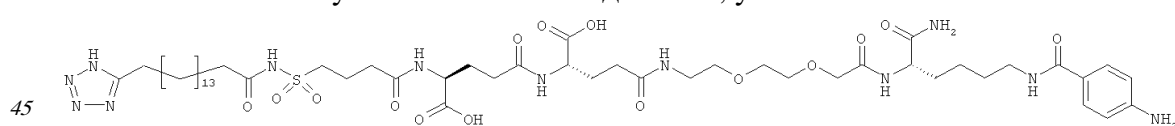
Удаление группы Fmoc: Смолу встряхивали с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Смолу отжимали и обрабатывали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в 25 течение 1 часа с последующим отжимом и промыванием NMP (6×15 мл).

4-(16-1 Н-Тетразол-5-илгексадеканойлсульфамоил)-масляную кислоту и НОВТ взвешивали в колбе, растворяли в бромфеноловом синем в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавляли к отжатой смоле с последующим добавлением DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 21 ч. Смолу отжимали 30 и промывали NMP (6×15 мл NMP) с последующим отжимом и промыванием ДХМ (6×15 мл).

Смолу расщепляли смесью 95% ТФУ в воде (10 мл) + ДХМ (0,25 мл) и TIPS (0,25 мл). Смолу встряхивали в течение 2 часов при температуре окружающей среды. Фильтровали в холодный диэтиловый эфир (75 мл). Полученный в результате осадок выделяли 35 центрифугированием с последующим промыванием диэтиловым эфиром (3 х) и высушивали в вакууме в течение 48 часов с получением 300 мг сырого соединения, указанного в заголовке.

TOF-МС: Rt = 4,7 мин, масса 1268771

40 Сырое соединение, указанное в заголовке, очищали на препаративной ВЭЖХ (GILSON). T2145-10; 30->80% MeCN. Объединенные фракции выпаривали до сухости на ротационном испарителе, и остаток растворяли в H₂O/MeCN 1:1 и лиофилизировали в течение ночи с получением 170 мг соединения, указанного в заголовке.



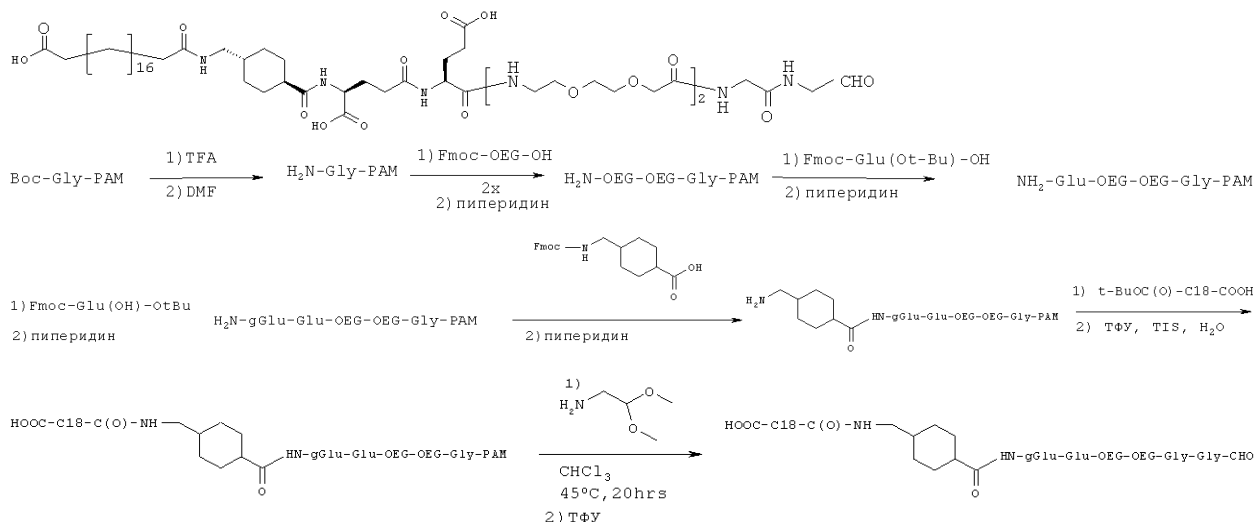
Пример 2

Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолу Ванга.

TOF-MC: macca 1124,33

Пример 3

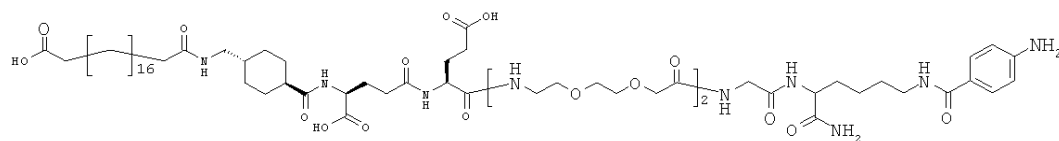
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя смолу Вос-Gly-РАМ в качестве исходного материала.



TOF-MC: massa 1128,38

Пример 4

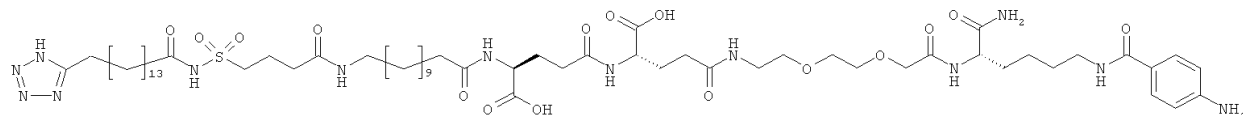
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-MC: macca 1333,64

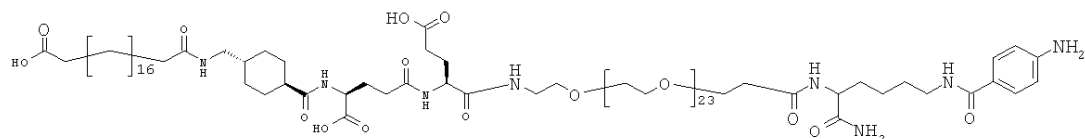
Пример 5

Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 1320,67 Пример 6

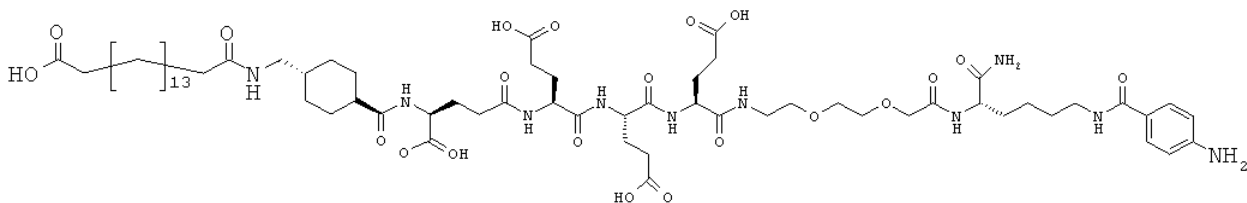
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-MC: macca 2114,64

Пример 6

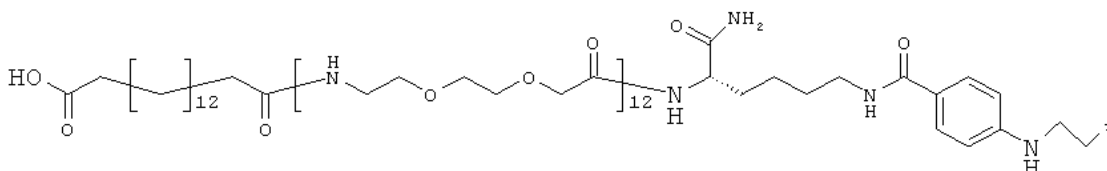
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOС-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 1534,82

Пример 8

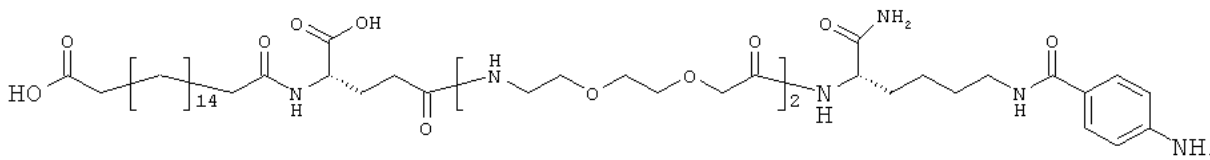
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже 5 соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 823,05

Пример 9

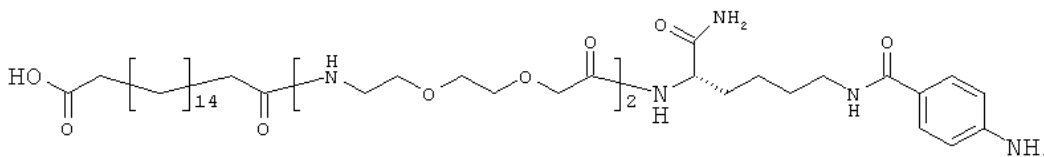
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и смолу Ванга.



TOF-МС: масса 980,22

Пример 10

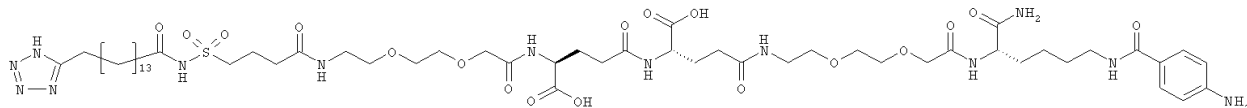
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 851,10

Пример 11

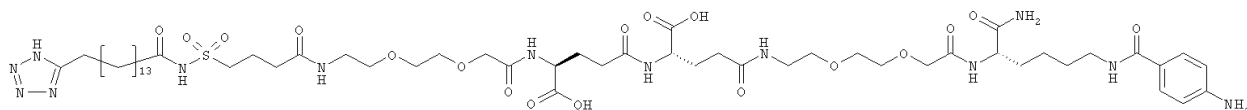
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 1258,51

Пример 12

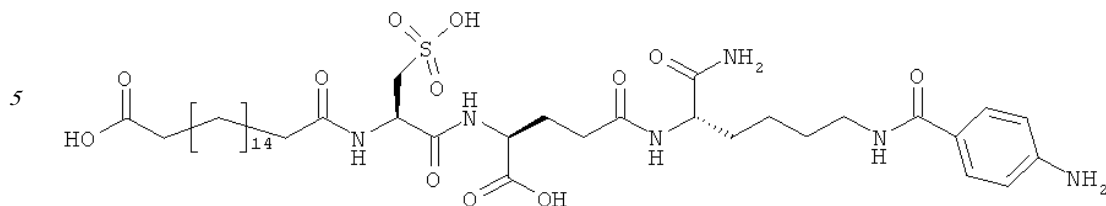
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-ОН и смолу Ванга.



TOF-МС: масса 1269,49

Пример 13

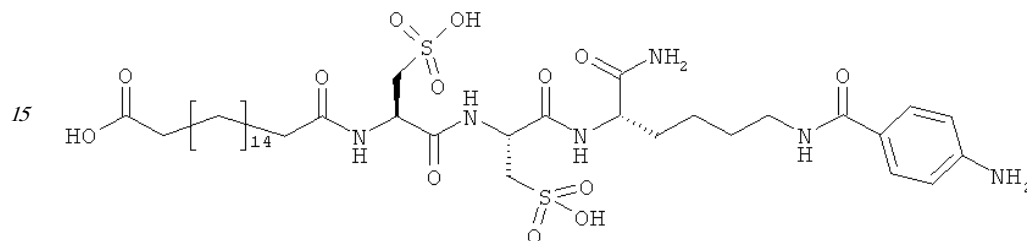
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 841,04

10 **Пример 14**

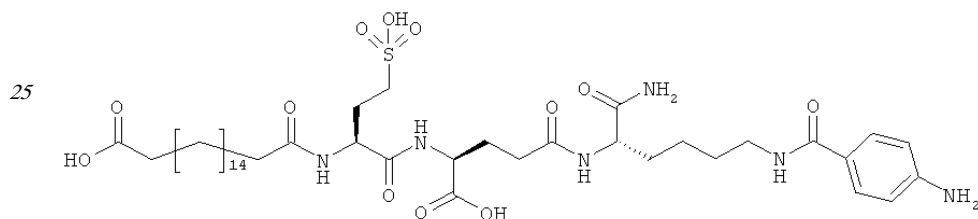
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 863,07

20 **Пример 15**

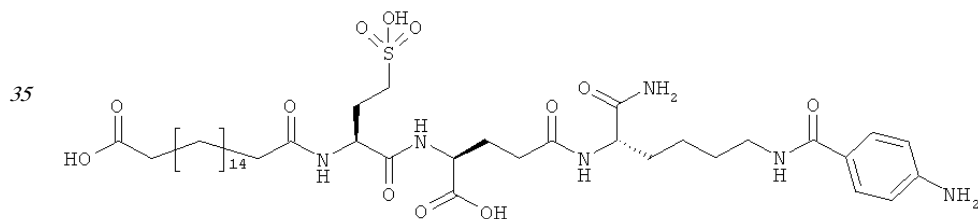
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 855,07

30 **Пример 16**

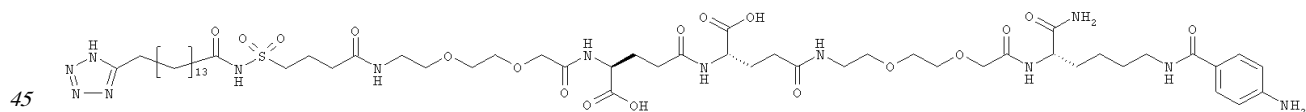
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 883,12

40 **Пример 17**

Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.

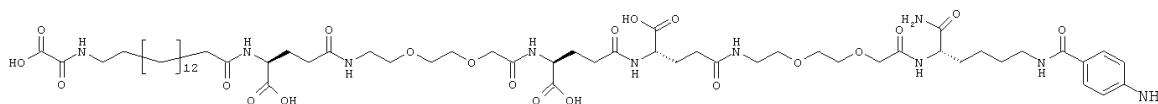


TOF-МС: масса 1123,35

Пример 18

Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение

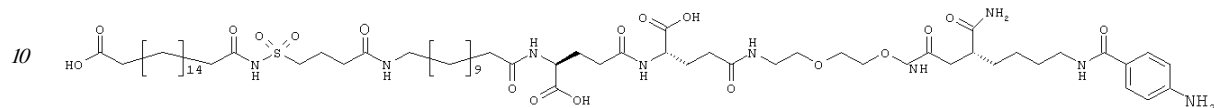
было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



5 TOF-МС: $R_t = 4,7$ мин, масса 1267,45

Пример 19

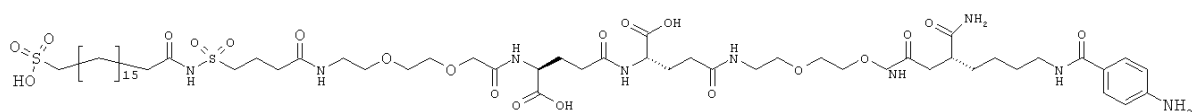
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



10 TOF-МС: масса 1310,67

Пример 20

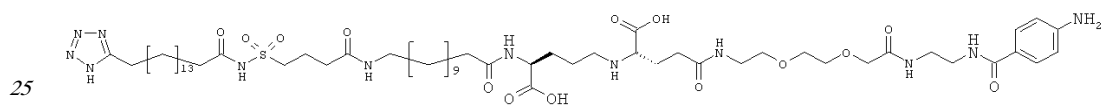
15 Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



20 TOF-МС: масса 1308,58

Пример 21

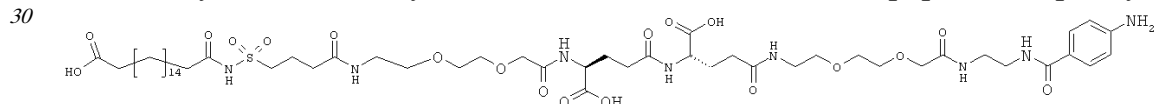
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Glu(ODmab)-OH и 2-хлортритилхлоридную смолу.



25 5 TOF-МС: масса 1235,56

Пример 22

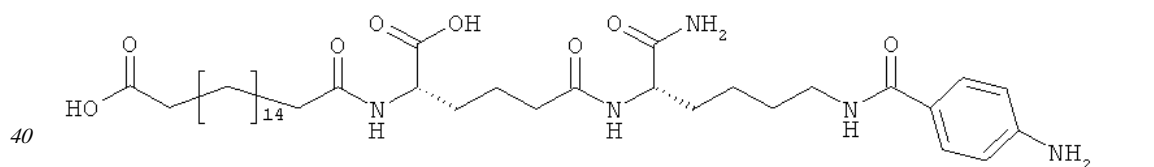
Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Glu(ODmab)-OH и 2-хлортритилхлоридную смолу.



30 TOF-МС: масса 1173,40

Пример 23

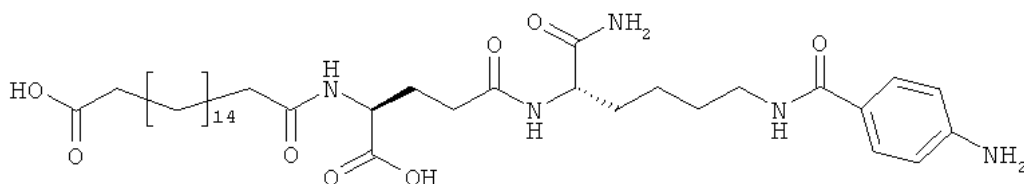
35 Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



40 TOF-МС: масса 703,93

Пример 24

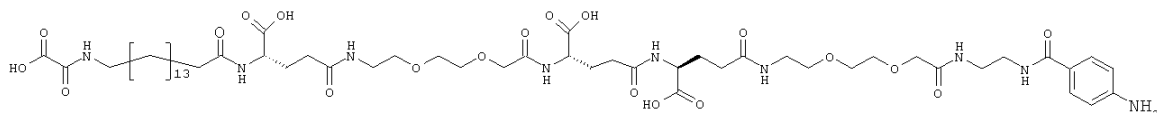
45 Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Lys(Mtt)-OH и амидную смолу Ринка.



TOF-МС: масса 689,90

Пример 25

Подобным путем, как описано в Примере 1 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя FMOC-Glu(ODmab)-ОН и 2-хлортритилхлоридную смолу.



TOF-МС: масса 1182,34

Получение соединений GH и альбумин-связывающего вещества:

Пример 26

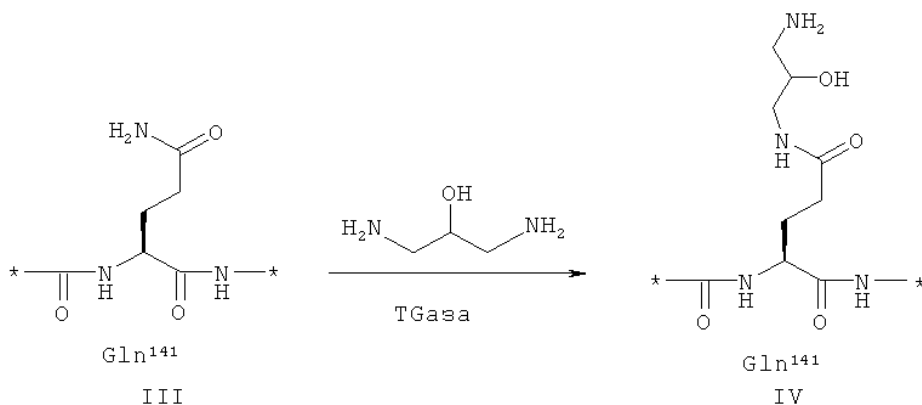
1. Сочетание переаминированного и окисленного соединения GH (I) с альбумин-связывающим веществом (II)

Готовили приведенный ниже раствор:

Буфер А: Триэтаноламин (119 мг, 0,8 ммоль) растворяли в воде (40 мл) и доводили рН до 8,5.

Буфер В: 20 мМ Триэтаноламин; 0,2 М NaCl.

(А) Переаминирование hGH (111) 1,3-диамино-2-пропанолом



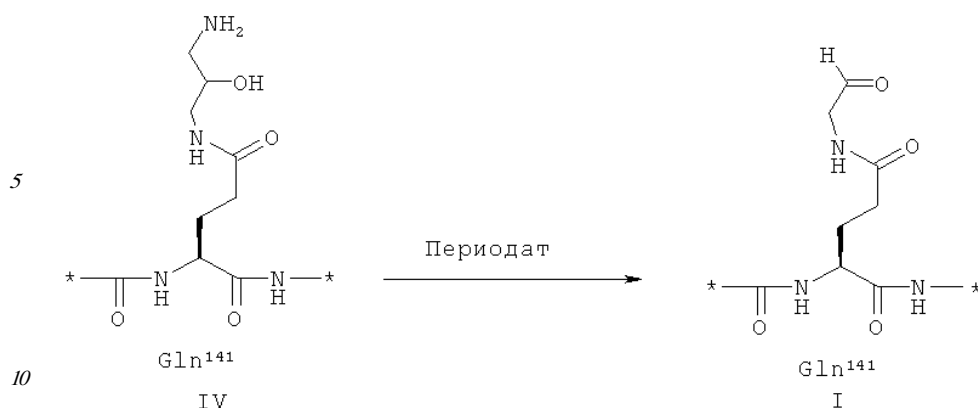
Готовили приведенные ниже растворы:

hGH (8,64 г) в виде порошка растворяли в буфере А (500 мл) при перемешивании. К этому раствору медленно добавляли смесь DAP (8,1 г) в буфере А (50 мл). рН полученной в результате смеси доводили до 8,5 добавлением водной HCl. TGAay (2,8 мл, 1,3 мг/мл) добавляли при перемешивании. Конечную смесь перемешивали в течение ночи при КГ.

Реакционную смесь разбавляли буфером А (1,2 л), и продукт (IV) очищали ионообменной хроматографией. 100 мл/мин - 200 мл/фракция.

Ступенчатый буфер В 40% - градиент 40-100% буфера В за 15 CV = 225 мин.

(Б) Окисление переаминированного hGH (IV)



Готовили приведенные ниже растворы:

Буфер А: Триэтаноламин (119 мг, 0,8 ммоль) растворяли в воде (40 мл) и доводили рН до 8,5.

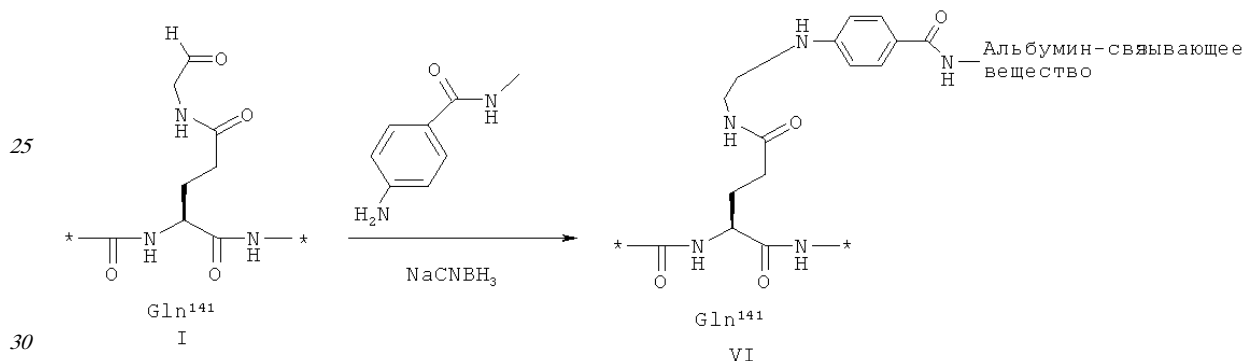
Буфер В: 3-Метилтио-1-пропанол (725 мг, 7,1 ммоль) растворяли в буфере А (10 мл).

Буфер С: HEPES (5,96 г) растворяли в воде (1,0 л) и доводили рН до 7,0.

Периодат: NaIO_4 (48,1 мг, 0,225 ммоль) растворяли в воде (1,0 мл).

К раствору IV (10 мг, 0,5 мкмоль) добавляли буфер В (0,2 мл) с последующим добавлением раствора периодата (0,03 мл). После 20 мин холодной инкубации смесь подвергали диализу 4 раза буфером С. Остаток концентрировали до 1 мл.

(В) Восстановительное аминирование (I) альбумин-связывающим веществом (II)



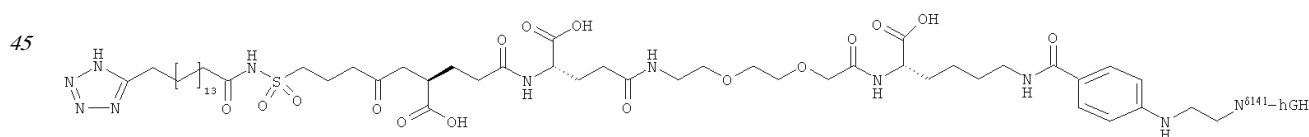
Альбумин-связывающее вещество (II) было получено, как описано в примере 1-26.

Конечный раствор со стадии (Б) (1 мл, 10 мг, 0,45 мкмоль (I)) смешивали с раствором альбумин-связывающего вещества (II) (2 мл, 10 мг, 0,3 мкмоль) в 25 мМ буфере HEPES рН 7,0, и полученную в результате смесь медленно вращали при комнатной температуре в течение 1 ч. После 1 ч добавляли порциями NaCNBH_3 (100 мкл раствора NaCNBH_3 (20 мг) в воде (0,5 мл)). Смесь держали при комнатной температуре в темноте в течение 18-24 часов.

Смесь разбавляли 1 М раствором Трис до конечной концентрации 50 мМ, рН 7,5 и наносили на ионообменную колонку. Продукт (VI) получали путем элюирования с колонки градиентом NaCl .

Пример 27

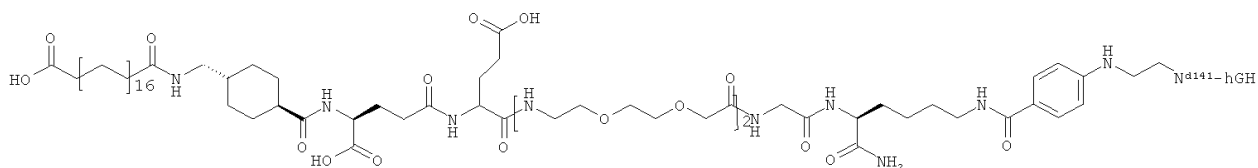
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 2.



TOF-МС: масса 23473,81

Пример 28

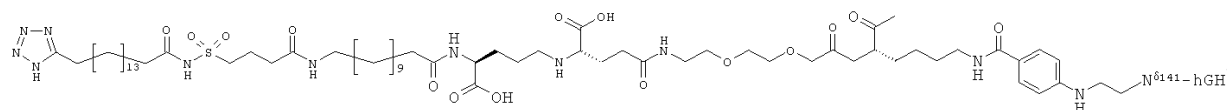
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 4.



TOF-МС: масса 23428

Пример 29

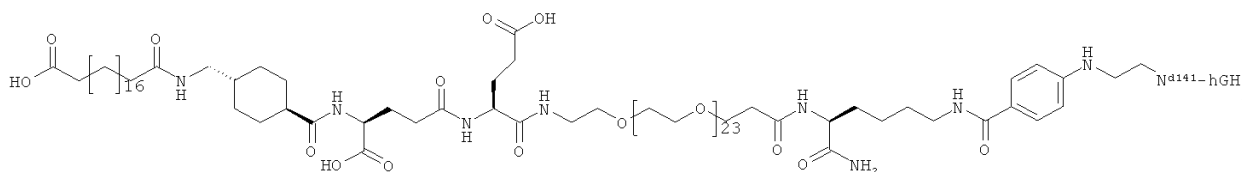
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 5.



TOF-МС: масса 23472,40

Пример 30

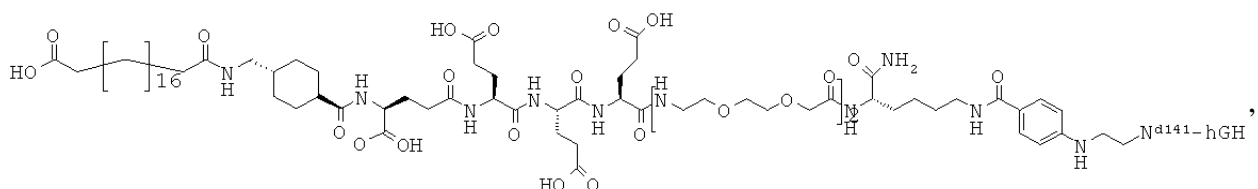
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 6.



TOF-МС: масса 24265,71

Пример 31

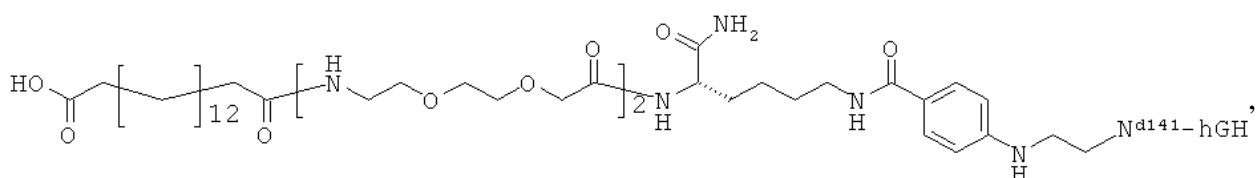
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 7.



TOF-МС: масса 23686,83

Пример 32

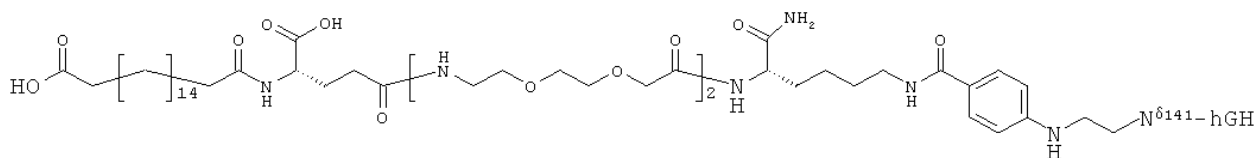
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 8.



TOF-МС: масса 22974,75

Пример 33

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 9.



5

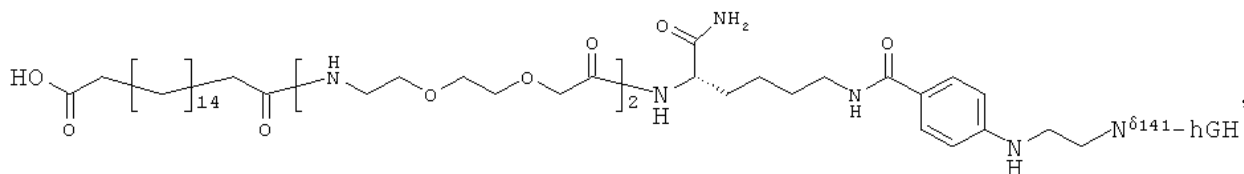
,

TOF-МС: масса 23131,31

Пример 34

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 10.

10



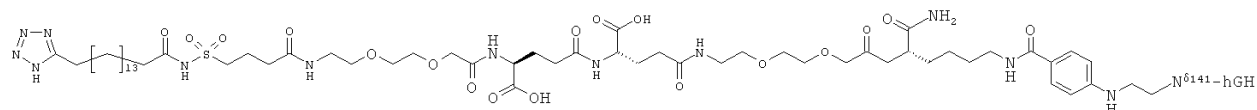
15

TOF-МС: масса 23002

Пример 35

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 11.

20



,

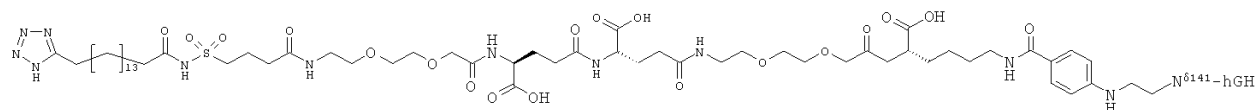
TOF-МС: масса 23419,59

25

Пример 36

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 12.

30



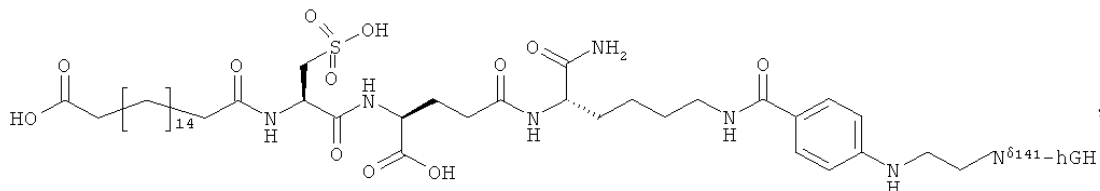
,

TOF-МС: масса 23420,58

Пример 37

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 13.

35



40

TOF-МС: масса 22992,13

Пример 38

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 14.

45



TOF-MC: macca 23015,15

Пример 39

10



TOF-MC: macca 23006,15

Пример 40

20



TOF-MC: macca 23034,18

Пример 41

30



TOF-MC: macca 23273,97

Пример 42

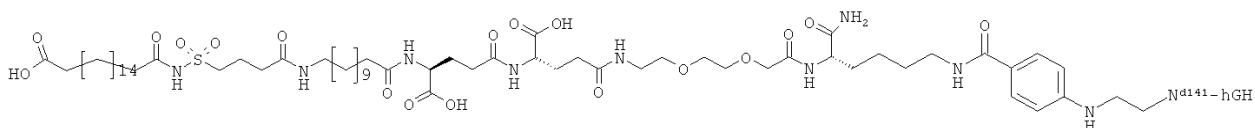
40



TOF-MC: macca 23333

Пример 43

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 19.



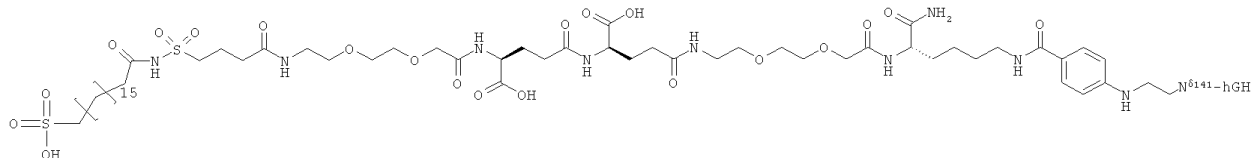
5 ,

TOF-МС: масса 23461,75

Пример 44

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 20.

10



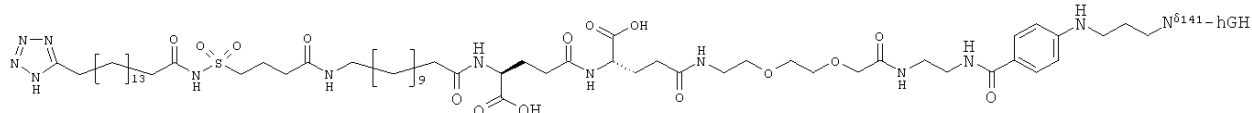
15 ,

TOF-МС: масса 23459,67

Пример 45

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 21.

20



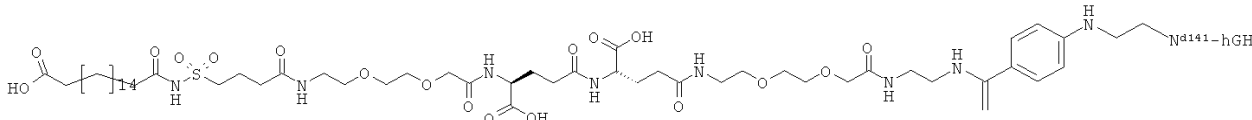
25 ,

TOF-МС: масса 23386,65

Пример 46

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 22.

30



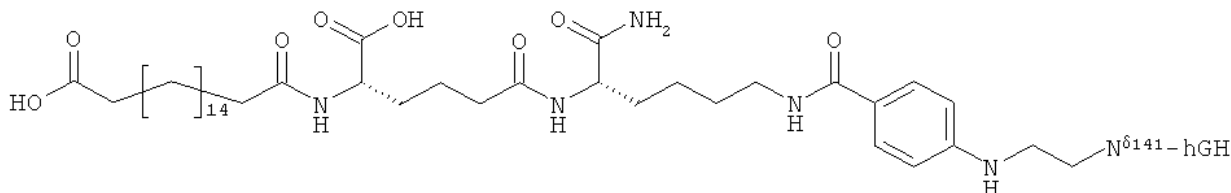
35 ,

TOF-МС: масса 23324,48

Пример 47

Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 23.

40

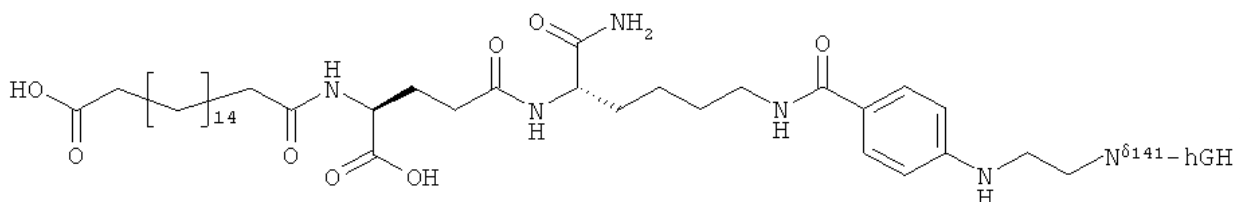


45

TOF-МС: масса 22841

Пример 48

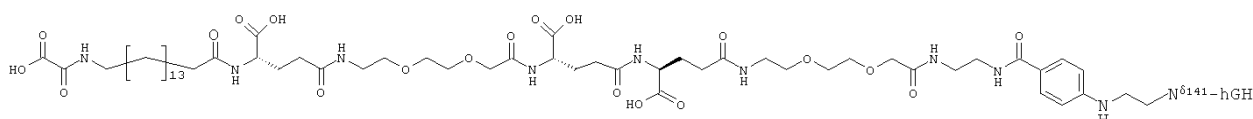
Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 24.



TOF-МС: масса 22826,97

Пример 49

10 Подобным путем, как описано в Примере 26 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 25.



15 TOF-МС: Rt = 4,7 мин, масса 12687051

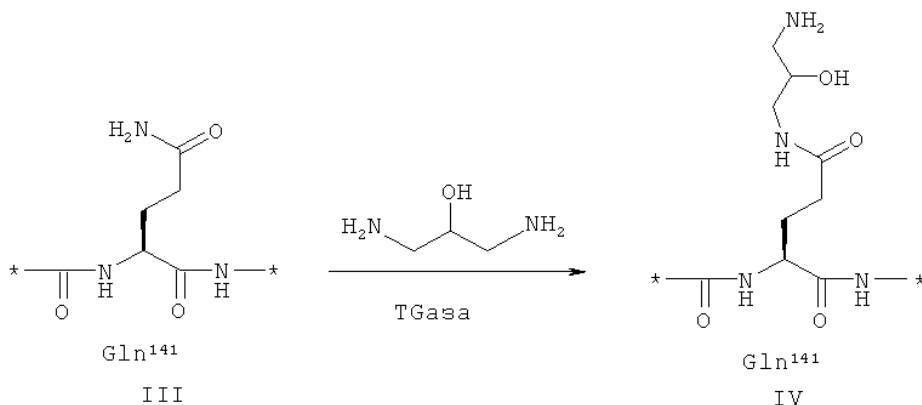
Пример 50

1. Сочетание переаминированного и окисленного соединения GH (I) с альбумин-связывающим веществом (II)

Готовили приведенный ниже раствор:

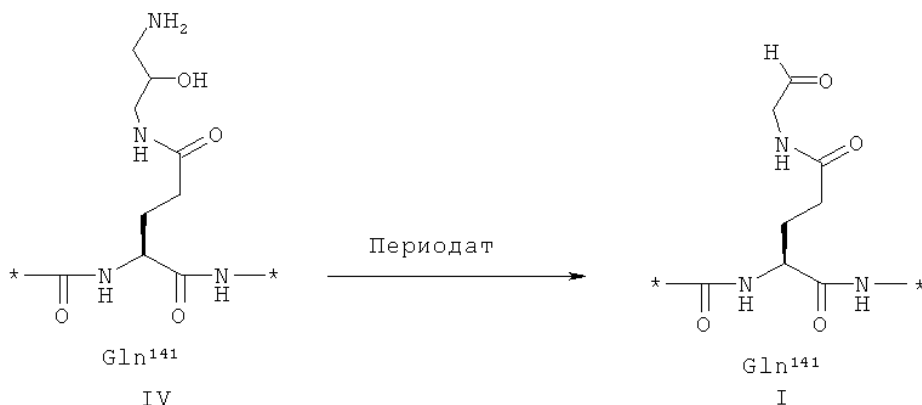
20 Буфер А: Триэтаноламин (119 мг, 0,8 ммоль) растворяли в воде (40 мл) и доводили рН до 8,5.

(А) Переаминирование hGH (III) 1,3-диамино-2-пропанолом



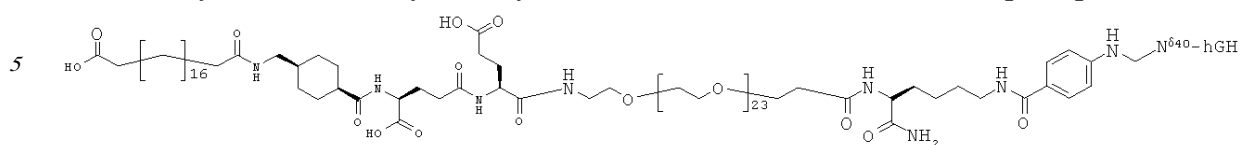
35 Переаминированный hGH Gin⁴⁰ (IV) был получен из Примера 26 в виде бипродукта хроматографической очистки СІЕ.

(Б) Окисление и восстановительное аминирование переаминированного hGH Gin⁴⁰ (IV) осуществляли, как описано в Примере 26:



Готовили приведенные ниже растворы:

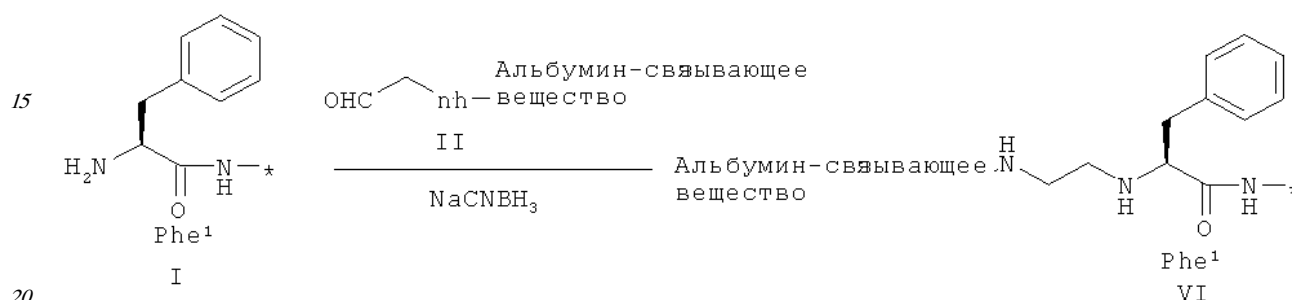
Подобным путем, как описано в Примере 50 выше, приведенное ниже соединение было получено, используя альбумин-связывающее вещество из Примера 6.



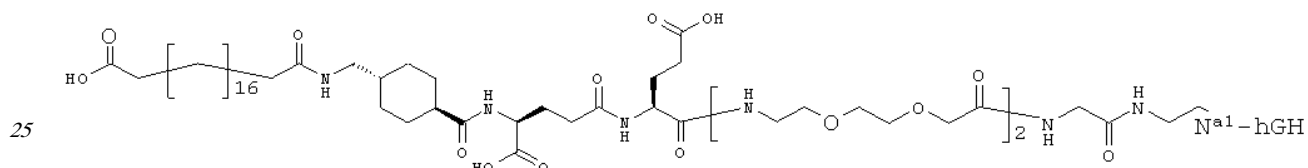
TOF-МС: Rt = 4,7 мин, масса 23473,81

Пример 51

1. Сочетание соединения GH (I) на N-конце с альбумин-связывающим веществом (II) (А) Восстановительное алкилирование (I) альбумин-связывающим веществом в форме альдегида (II)



Альбумин-связывающее вещество (II) было получено, как описано в Примере 3.



2-(C₂₀Дикарбоновая кислота-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-глицинамид)-этил-N^{α1}-hGH hGH (23 мг) растворяли в буфере Hepes (2,3 мл 0,25 мМ pH 7,0).

C₂₀Дикарбоновая кислота-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-диметилацеталь (2 мг, см. пример 3 выше) обрабатывали ТФУ (50 мкл) в течение 6 мин и выпаривали до сухости в вакууме. Остаток десорбировали ЕЮН (200 мкл) и выпаривали до сухости в вакууме, остаток растворяли в ДМФ (100 мкл) и добавляли к раствору hGH. Образовался осадок, который повторно растворяли добавлением ДМФ (1 мл). Через 1 ч добавляли порциями раствор NaCNBH₃ (20 мг, в 0,5 мл MeCN (230 мкл)) и оставляли на 20 ч.

Реакционную смесь гасили добавлением AcOH (2 мл) и разбавляли водой до суммарного объема 20 мл и очищали на препаративной ВЭЖХ на колонке C18 с градиентом MeCN/0, 1% ТФУ от 40-80% против 0,1% ТФУ в воде. Самый последний пик элюирования собирали, разбавляли 70% MeCN до 10% с водой и лиофилизировали с получением 4,51 мг соединения, указанного в заголовке.

TOF-МС: масса 23237,6

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Анализ (I). Анализ BAF-3GHR на определение активности гормона роста

Клетки BAF-3 (мышьяная про-В лимфоидная клеточная линия, выделенная из костного мозга) была исходно зависима от IL-3 в отношении роста и жизнеспособности. IL-3 активирует JAK-2 и STAT, которые являются теми же медиаторами, которые активирует GH при стимуляции. После трансфекции рецептором человеческого гормона роста эта клеточная линия была преобразована в клеточную линию, зависимую от гормона роста.

Этот клон можно использовать для оценки эффекта различных образцов гормона роста на выживание BAF-3GHR.

Клетки BAF-3GHR выращивают в истощенной среде (культуральной среде без гормона роста) в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂.

5 Клетки промывают и ресуспендируют в истощенной среде и высевают в планшеты. К клеткам добавляют 10 мкл соединения гормона роста или гормона роста человека в различных концентрациях, либо контроль, и планшеты инкубируют в течение 68 часов при 37°C, 5% CO₂.

10 В каждую лунку добавляют краситель AlamarBlue®, а затем клетки инкубируют еще в течение 4 часов. AlamarBlue® представляет собой редокс-индикатор, и он восстанавливается реакциями, свойственными клеточному метаболизму, и таким образом обеспечивает косвенную меру числа жизнеспособных клеток.

Наконец, метаболическую активность клеток измеряют во флуоресцентном считывающем устройстве для планшетов. Поглощение в образцах выражают в % клеток, 15 не стимулированных соединением гормона роста, или контроля, и на основании кривых концентрация - ответ можно вычислить активность (количество соединения, которое стимулирует клетки на 50%).

Перечень форм осуществления

20 Форма осуществления 1. Способ получения конъюгированного белка или гликопротеина, который включает стадии взаимодействия белка или гликопротеина с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом в присутствии молекулы возможно замещенного циклодекстрина.

Форма осуществления 2. Способ, как определено в форме осуществления 1, где молекула циклодекстрина включает возможно замещенный α -циклодекстрин.

25 Форма осуществления 3. Способ, как определено в форме осуществления 1 или в форме осуществления 2, где возможно замещенный циклодекстрин включает циклодекстрин, возможно замещенный одним или более чем одним C₁₋₆ алкилом (например, метилом, этилом или пропилом), каждый из которых может быть возможно замещен одной или более чем одной гидроксильной группой (например, 30 гидроксиэтилциклодекстрин или гидроксипропил циклодекстрин).

Форма осуществления 4. Способ, как определено в форме осуществления 3, где возможно замещенный циклодекстрин включает 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрин.

35 Форма осуществления 5. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-4, где молекулу возможно замещенного циклодекстрина добавляют в концентрации от 1% до 10% (например, 5%).

Форма осуществления 6. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-5, который включает взаимодействие в водном буферном растворе, таком как буфер HEPES (например, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl и 10 mM CaCl₂).

40 Форма осуществления 7. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-6, который включает взаимодействие при постоянном pH (например, pH 7,0) и постоянной температуре (например, 25°C).

Форма осуществления 8. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-7, где белковый конъюгат представляет собой белковый конъюгат формулы (I):

45 (A-W-B)_y-P (I)

где P представляет собой белок или гликопротеин;

B представляет собой гидрофильный спейсер;

W представляет собой химическую группу, связывающую A и B;

А представляет собой альбумин-связывающий остаток; и
у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;
или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, так что
группировка А-В- включает нерастворимую в воде группировку.

5 Форма осуществления 9. Способ, как определено в форме осуществления 8, где белок имеет молекулярную массу выше 20000 Да.

Форма осуществления 10. Способ, как определено в форме осуществления 8 или в форме осуществления 9, где белок представляет собой фактор свертывания крови, такой как FVII, FX, FII, FV, белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор, FXI, FXII и
10 FXIII, а также варианты последовательности FVIII, FIX.

Форма осуществления 11. Способ, как определено в форме осуществления 10, где фактор свертывания крови представляет собой FVII, такой как FVIIa.

Форма осуществления 12. Способ, как определено в форме осуществления 8 или в форме осуществления 9, где белок представляет собой гормон роста (GH).

15 Форма осуществления 13. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-12, где у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3.

Форма осуществления 14. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-13, где у представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 или 6.

Форма осуществления 15. Способ, как определено в форме осуществления 14, где у
20 представляет собой 2.

Форма осуществления 16. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-12, где у представляет собой 1.

Форма осуществления 17. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-16, где гидрофильный спейсер имеет $cLogP < 0$.

25 Форма осуществления 18. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-17, где гидрофильный спейсер имеет формулу
-X₁-X₂-X₃-X₄-

где X₁ представляет собой -W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}-,

30 X₂ представляет собой -[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}-,

X₃ представляет собой -[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-,

X₄ представляет собой F-D1-(CH₂)₁₆-D2-,

11, 12, 13, 14, 15 и 16 независимо выбраны из 0-16,

35 m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F представляет собой арил, гетероарил, пирролидин-2,5-дион, где арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂,

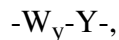
40 -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила,

R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из атом водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; где алкильная, арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,
45

D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- или валентной связи; где R⁶ и R⁷ независимо представляют собой атом водорода или C₁₋₆-алкил,

W_1 - W_6 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или валентной связи; где $s2$ равно 0 или 1.

Форма осуществления 19. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-18, где W имеет формулу



где

Y представляет собой $-(CH_2)_{l7}-C_{3-10}$ -Циклоалкил- W_8 - или валентную связь,

$l7$ равно 0-6,

W_7 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-C(=O)CH_2-$, $-C(=O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или валентной связи;

где $s3$ равно 0 или 1,

W_8 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(=O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или валентной связи;

где $s4$ равно 0 или 1.

Форма осуществления 20. Способ, как определено в форме осуществления 18 или в форме осуществления 19, где 11, 12, 13, 14, 15 и 16 независимо представляют собой 0-6.

Форма осуществления 21. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-20, где $m1$, $m3$, $m4$, $m6$ и $m7$ независимо представляют собой 0-6.

Форма осуществления 22. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-21, где $m2$ и $m5$ независимо представляют собой 0-10.

Форма осуществления 23. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-22, где $n1$, $n2$, $n3$ и $n4$ независимо представляют собой 0-10, как, например, 0-6.

Форма осуществления 24. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-23, где $D1$ и $D2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-NR^6-$ или валентной связи.

Форма осуществления 25. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-24, где $D1$ и $D2$ оба представляют собой $-O-$.

Форма осуществления 26. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-25, где $D1$ и $D2$ оба представляют собой $-NR^6-$.

Форма осуществления 27. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-26, где $E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-NR^6-$ или валентной связи.

Форма осуществления 28. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-27, где $E1$ и $E2$ оба представляют собой $-O-$.

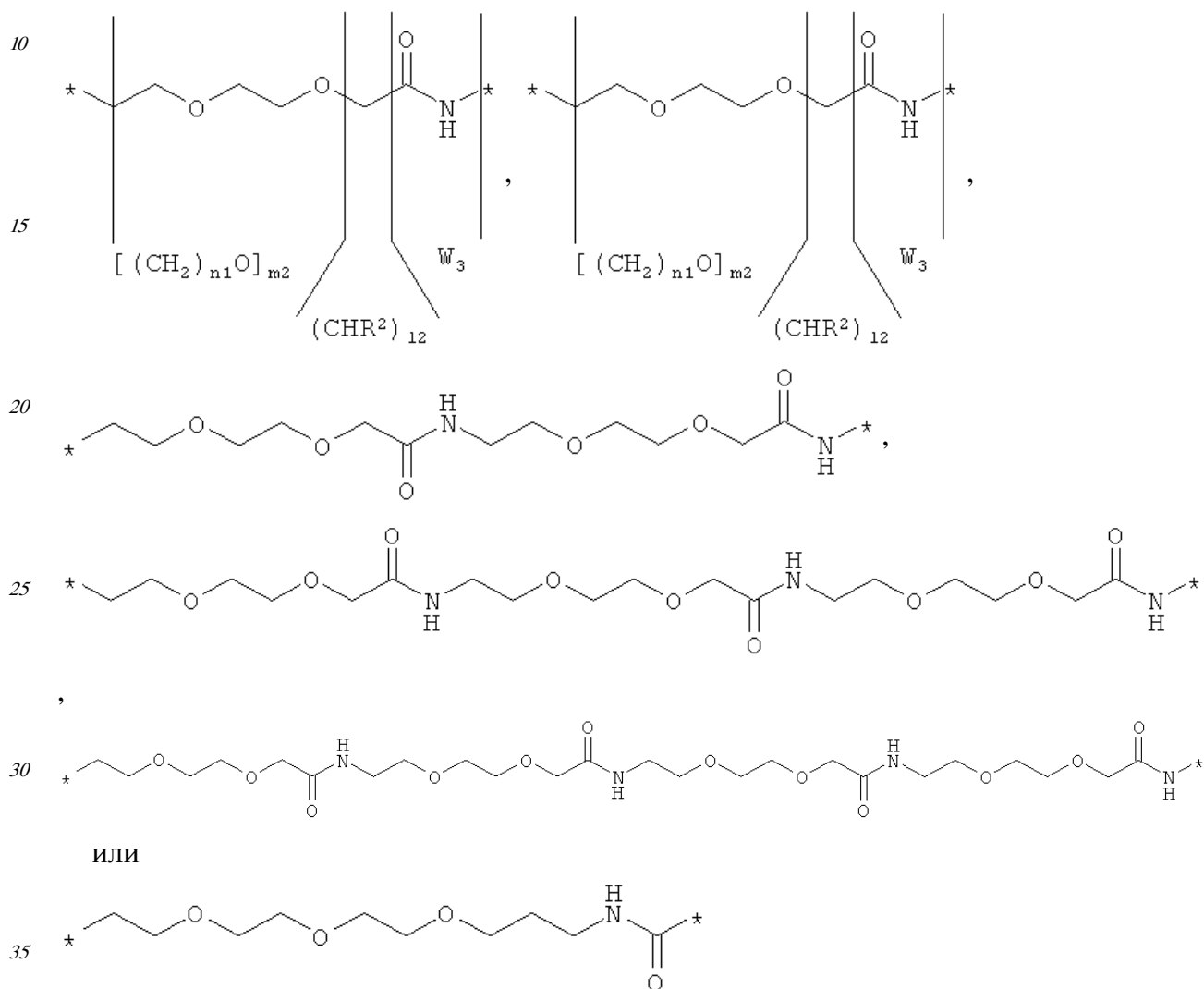
Форма осуществления 29. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-27, где $E1$ и $E2$ оба представляют собой $-NR^6-$.

Форма осуществления 30. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-29, где W_1 - W_8 независимо выбраны из группы, состоящей из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или валентной связи.

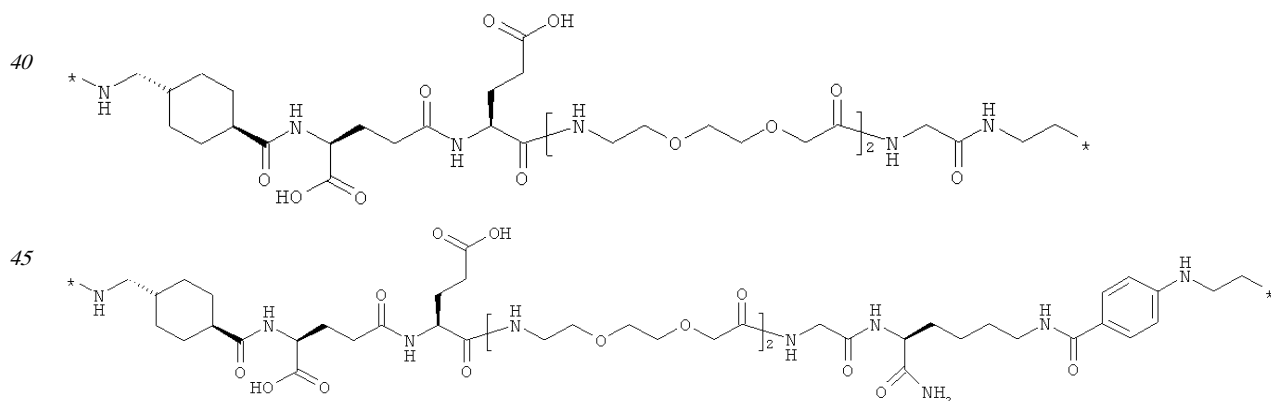
Форма осуществления 31. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-30, где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо выбраны из атома водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)$

NH_2 , $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ или C_{1-6} -алкила; где алкильная группа возможно замещена $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$.

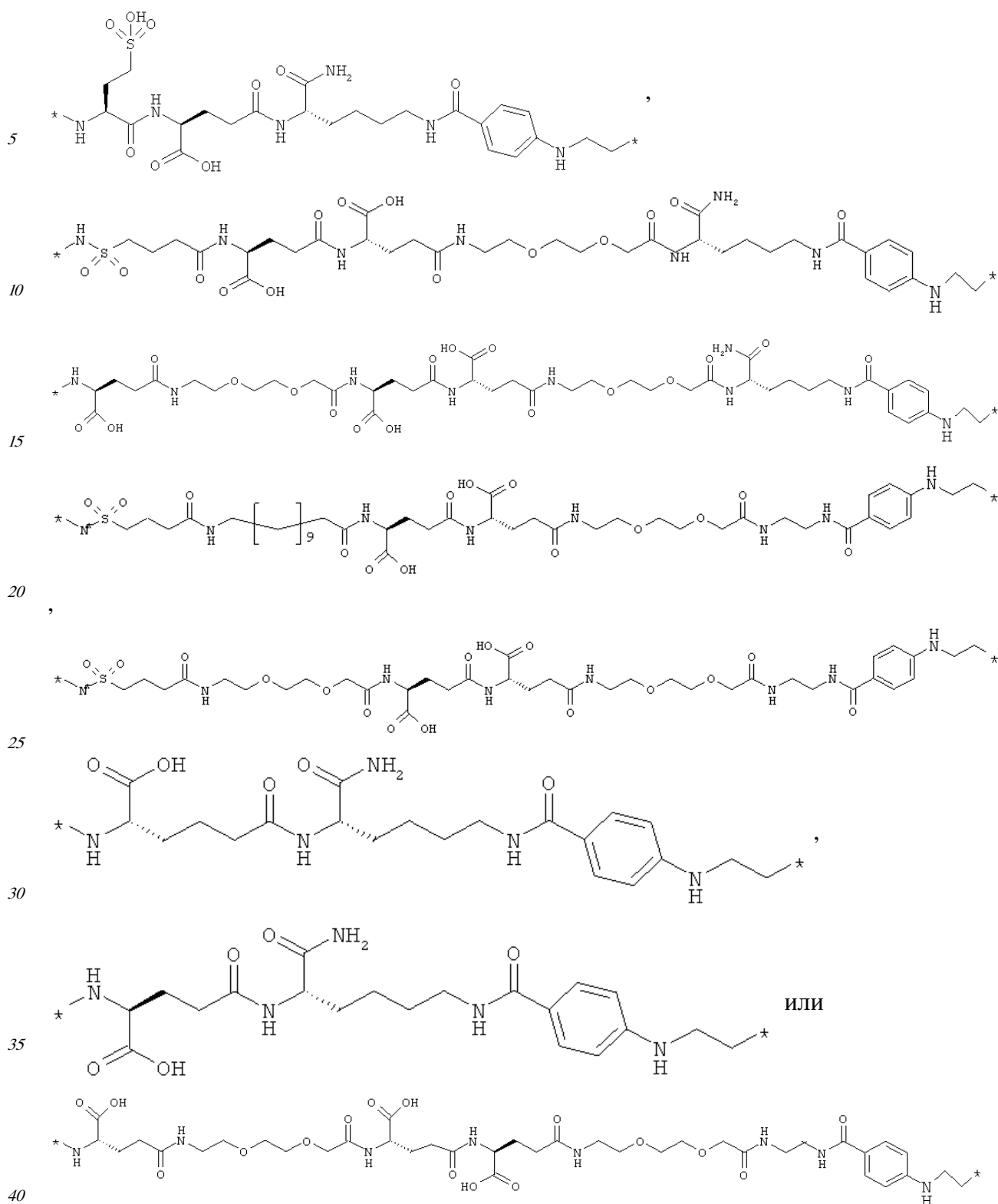
Форма осуществления 32. Способ, как определено в любой из форм осуществления 18-31, где X_1 представляет собой $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^1)_{11}-\text{W}_2]_{m1}-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}[(\text{CHR}^2)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}$ и X_2 представляет собой $-\{[(\text{CHR}^3)_{13}-\text{W}_4]_{m4}-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-, \text{ где } -[(\text{CHR}^5)_{15}-\text{W}_6]_{m7}- \text{ and F-D1-}(\text{CH}_2)_{16}\text{-D2-}$ выбраны из



Форма осуществления 33. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-32, где гидрофильный спейсер выбран из:







Форма осуществления 34. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-33, где молярная масса гидрофильного спейсера находится в интервале от 80 Да до 1500 Да или в интервале от 500 Да до 1100 Да.

Форма осуществления 35. Способ, как определено в любой из форм осуществления 1-34, где альбумин-связывающий остаток представляет собой липофильный остаток.

Форма осуществления 36. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-35, где альбумин-связывающий остаток нековалентно связывается с альбумином.

Форма осуществления 37. Способ, как определено в любой форме осуществления

1-36, где альбумин-связывающий остаток отрицательно заряжен при физиологическом pH.

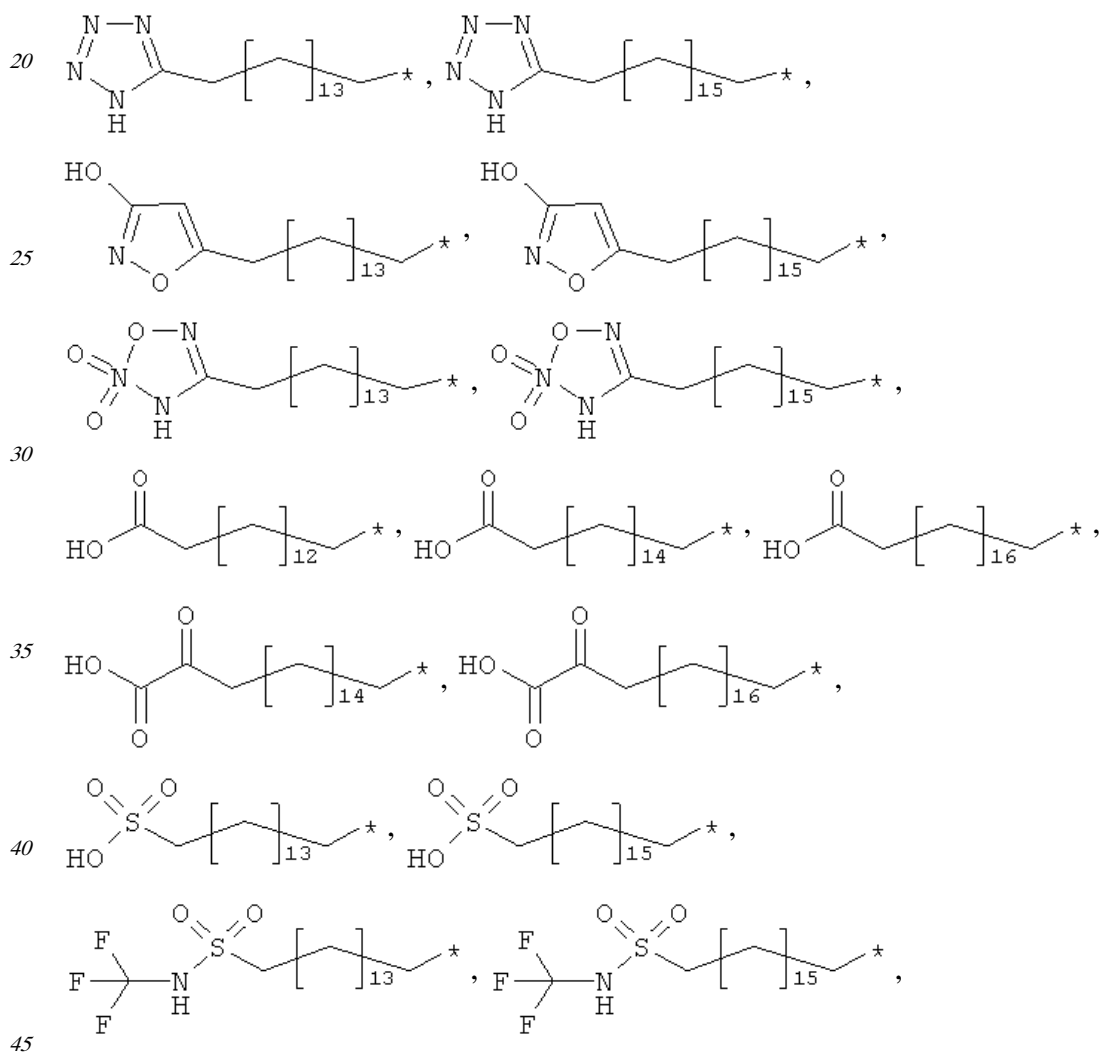
Форма осуществления 38. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-37, где альбумин-связывающий остаток обладает связывающим сродством к сывороточному альбумину человека, которое составляет ниже примерно 10 мкМ или ниже примерно 1 мкМ.

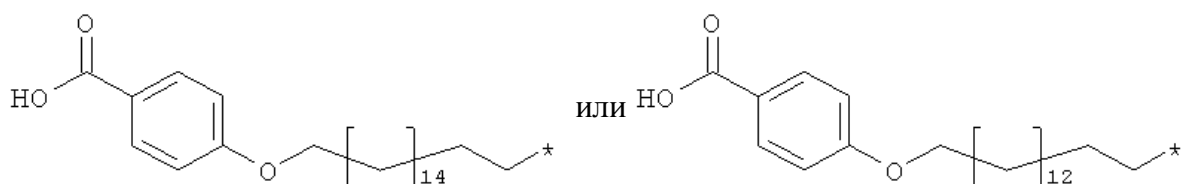
Форма осуществления 39. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-38, где альбумин-связывающий остаток выбран из прямоцепочечной алкильной группы, разветвленной алкильной группы, группы, которая имеет группу ω-карбоновой кислоты или изоостера ω-карбоновой кислоты.

Форма осуществления 40. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-39, где альбумин-связывающий остаток имеет от 6 до 40 атомов углерода, от 8 до 26 атомов углерода или от 8 до 20 атомов углерода.

Форма осуществления 41. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-40, где альбумин-связывающий остаток представляет собой пептид, такой как пептид, содержащий менее 40 аминокислотных остатков.

Форма осуществления 42. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-41, где альбумин-связывающее вещество выбрано из





где * обозначает присоединение к В через W.

Форма осуществления 43. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку глутамина белка Р через гидрофильный спейсер В.

Форма осуществления 44. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку цистеина белка Р через гидрофильный спейсер В.

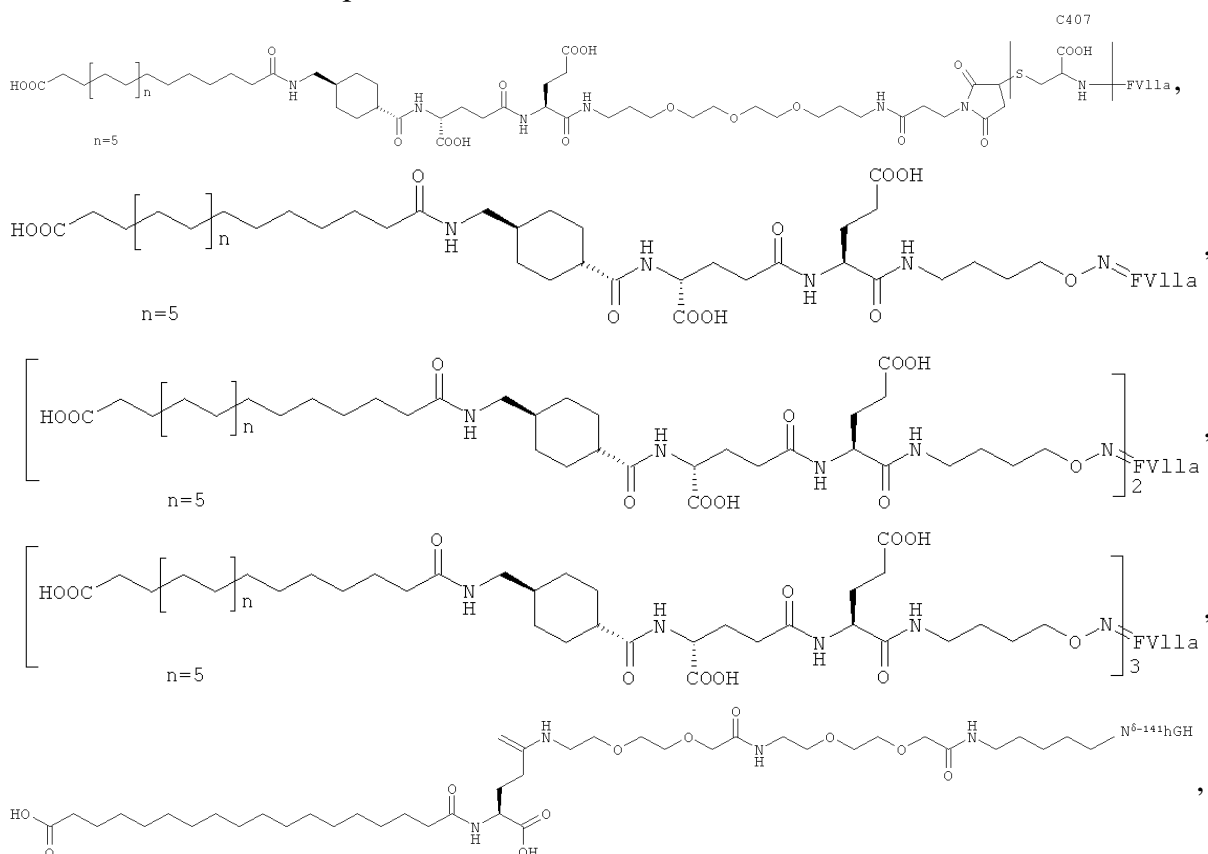
Форма осуществления 45. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к N-концевому остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

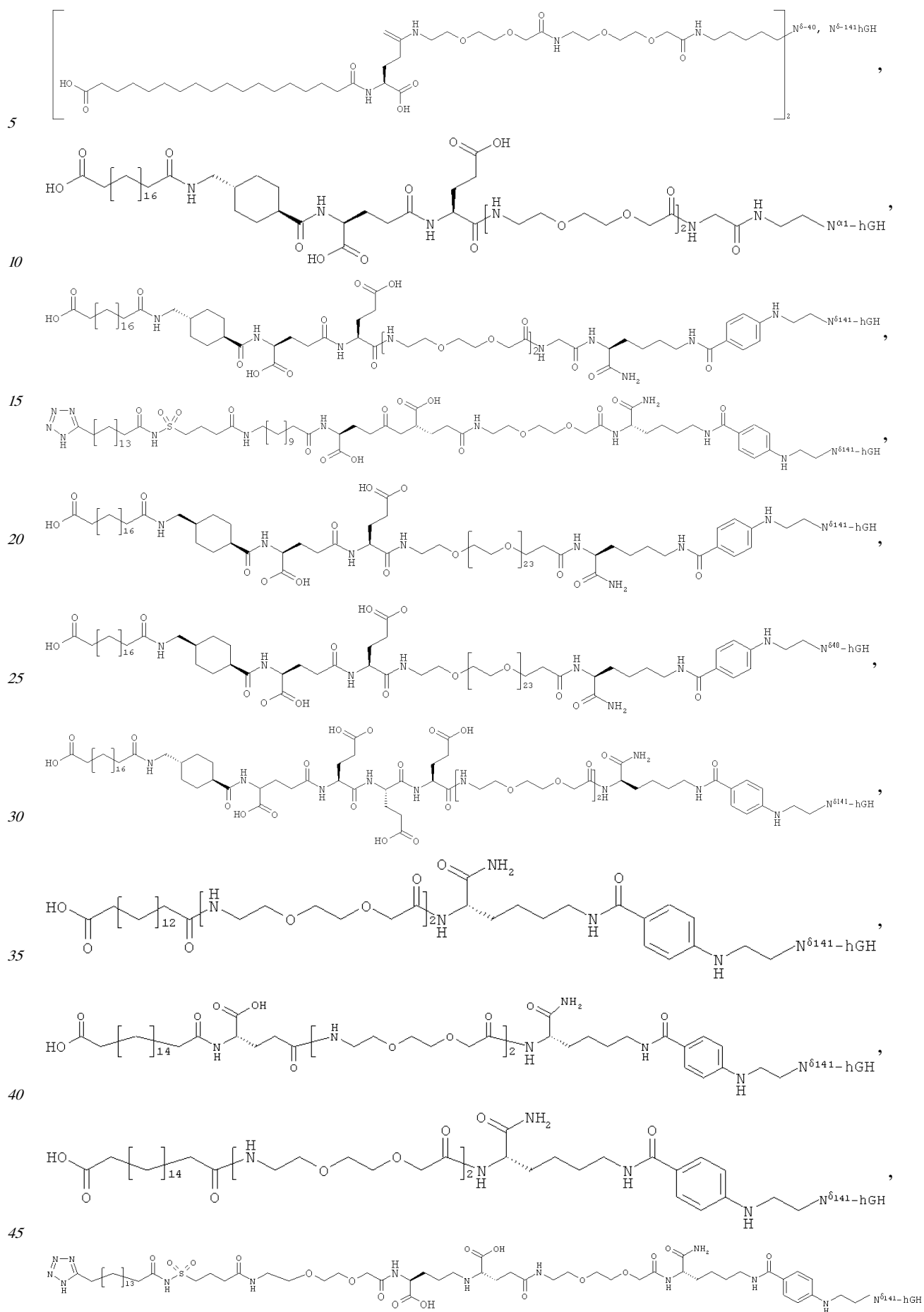
Форма осуществления 46. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к С-концевому остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

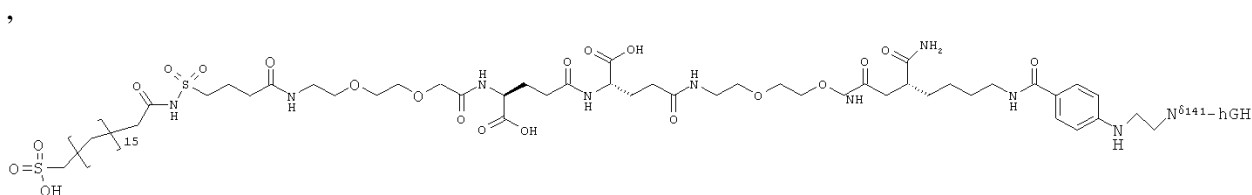
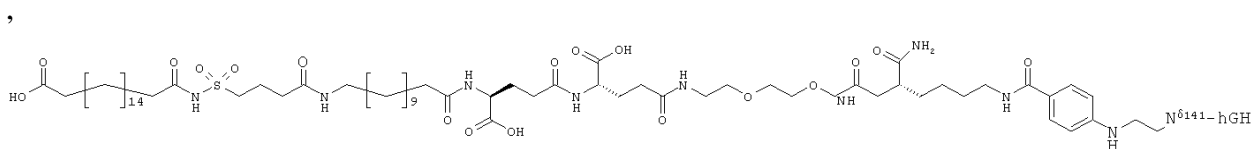
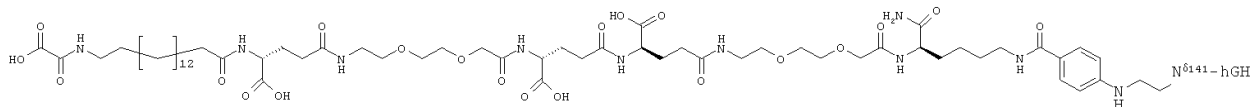
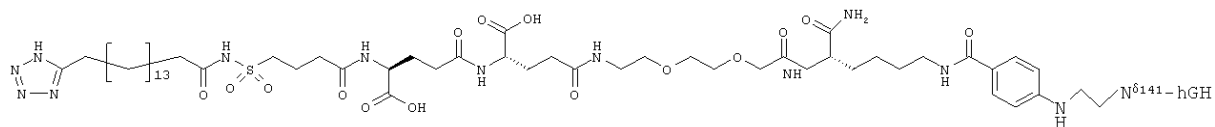
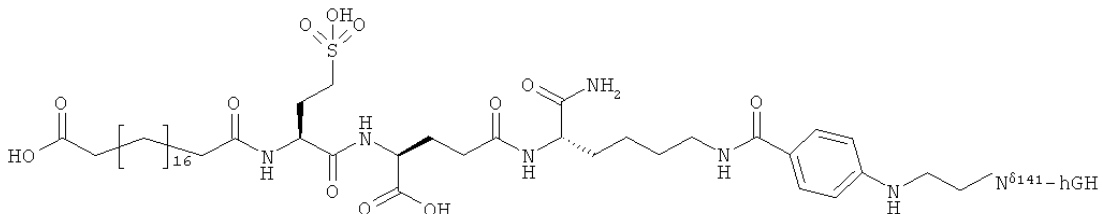
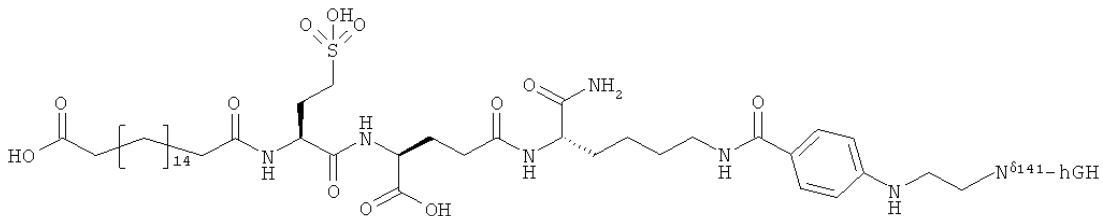
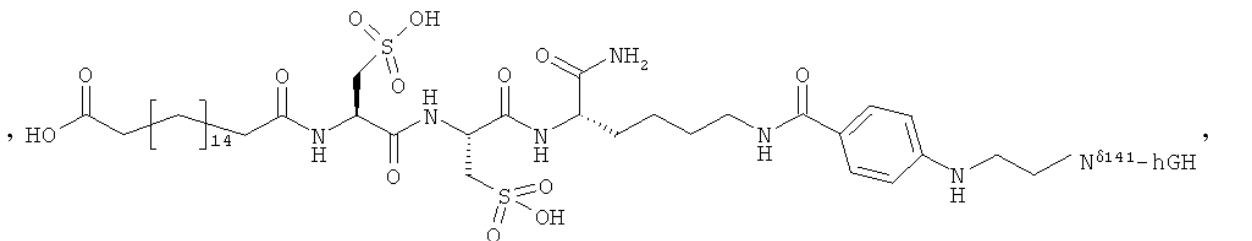
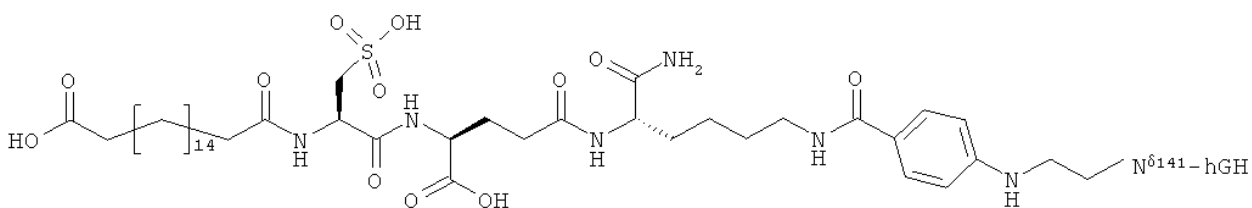
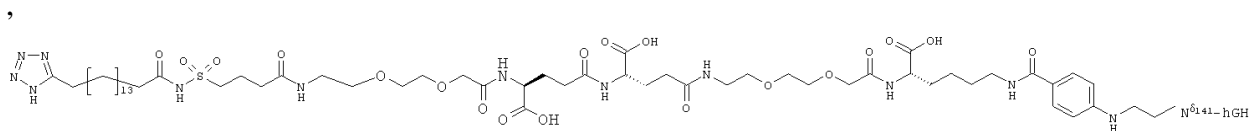
Форма осуществления 47. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку лизина белка Р через гидрофильный спейсер В.

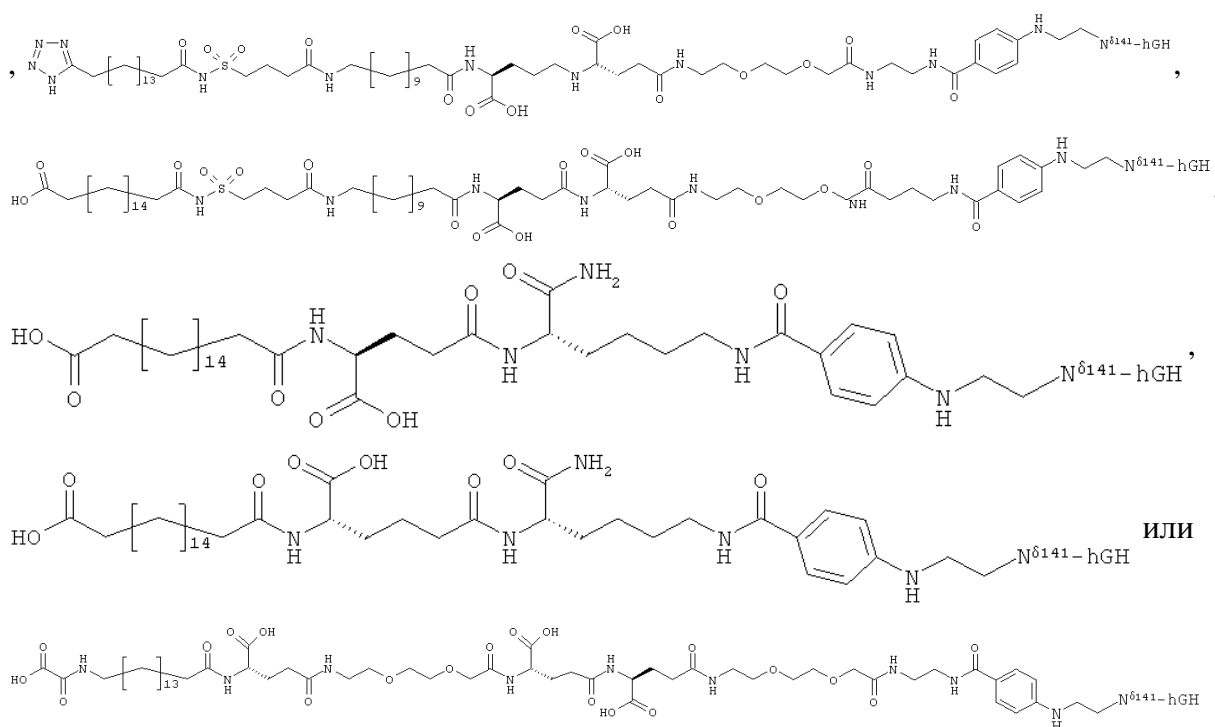
Форма осуществления 48. Способ, как определено в любой из форм осуществления 8-42, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к окисленному остатку гликана гликобелка Р через гидрофильный спейсер В.

Форма осуществления 49. Способ, как определено в любой форме осуществления 1-48, где конъюгат выбран из





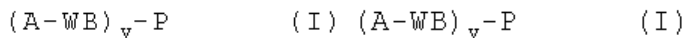




Форма осуществления 50. Конъюгированный белок, который может быть получен способом, как определено в любой форме осуществления 1-49.

Форма осуществления 51. Белковый конъюгат, который содержит белок или гликопротеин, связанный с альбумин-связывающим остатком через гидрофильный спейсер, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или пролекарство.

Форма осуществления 52. Белковый конъюгат формулы (I):



где P представляет собой белок или гликопротеин;

W представляет собой гидрофильный спейсер;

B представляет собой химическую группу, связывающую A и B;

A представляет собой альбумин-связывающий остаток; и

y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или пролекарство.

Форма осуществления 53. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 51 или в форме осуществления 52, где белок имеет молекулярную массу выше 20000 Да.

Форма осуществления 54. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 51-53, где белок представляет собой фактор свертывания крови, такой как FVII, FX, FII, FV, белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор, FXI, FXH и FXIII, а также варианты последовательности FVIII, FIX.

Форма осуществления 55. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 54, где фактор свертывания крови представляет собой FVII, такой как FVIIa.

Форма осуществления 56. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 52 или в форме осуществления 53, где белок представляет собой гормон роста (GH).

Форма осуществления 57. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 52-56, где y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3.

Форма осуществления 58. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм

осуществления 52-57, где у представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 или 6.

Форма осуществления 59. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 58, где у представляет собой 2.

5 Форма осуществления 60. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 52-57, где у представляет собой 1.

Форма осуществления 61. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 52-60, где гидрофильный спейсер имеет $cLogP < 0$.

10 Форма осуществления 62. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 52-61, где гидрофильный спейсер имеет формулу
 $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

где X_1 представляет собой $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$

X_2 представляет собой $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$

15 X_3 представляет собой $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$,

X_4 представляет собой $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$,

l1, l2, l3, l4, l5 и l6 независимо выбраны из 0-16,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

20 m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F представляет собой арил, гетероарил, пирролидин-2,5-дион,

где арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила,

25 R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из атома водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; где алкильная, арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

30 D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- или валентной связи; где R⁶ и R⁷ независимо представляют собой атом водорода или C₁₋₆-алкил,

35 W_1-W_6 независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или валентной связи; где s2 равно 0 или 1.

Форма осуществления 63. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 52-62, где W имеет формулу

40 $-W_7-Y-$,

где

Y представляет собой $-(CH_2)_{l7}-C_{3-10}$ -циклоалкил- W_8- или валентную связь, l7 равно 0-6,

45 W_7 выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или валентной связи; где s3 равно 0 или 1,

W_8 выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S

(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или валентной связи; где s₄ равно 0 или 1.

Форма осуществления 64. Белковый конъюгат, как определено в форме осуществления 62 или в форме осуществления 63, где l1, l2, l3, l4, l5 и l6 независимо представляют собой 0-6.

Форма осуществления 65. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-64, где m1, m3, m4, m6 и m7 независимо представляют собой 0-6.

Форма осуществления 66. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-65, где m2 и m5 независимо представляют собой 0-10.

Форма осуществления 67. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-66, где n1, n2, n3 и n4 независимо представляют собой 0-10, как, например, 0-6.

Форма осуществления 68. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-67, где D1 и D2 независимо выбраны из -O- или -NR⁶- или валентной связи.

Форма осуществления 69. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-68, где D1 и D2 оба представляют собой -O-.

Форма осуществления 70. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-68, где D1 и D2 оба представляют собой -NR⁶-.

Форма осуществления 71. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-70, где E1 и E2 независимо выбраны из -O- или -NR⁶- или валентной связи.

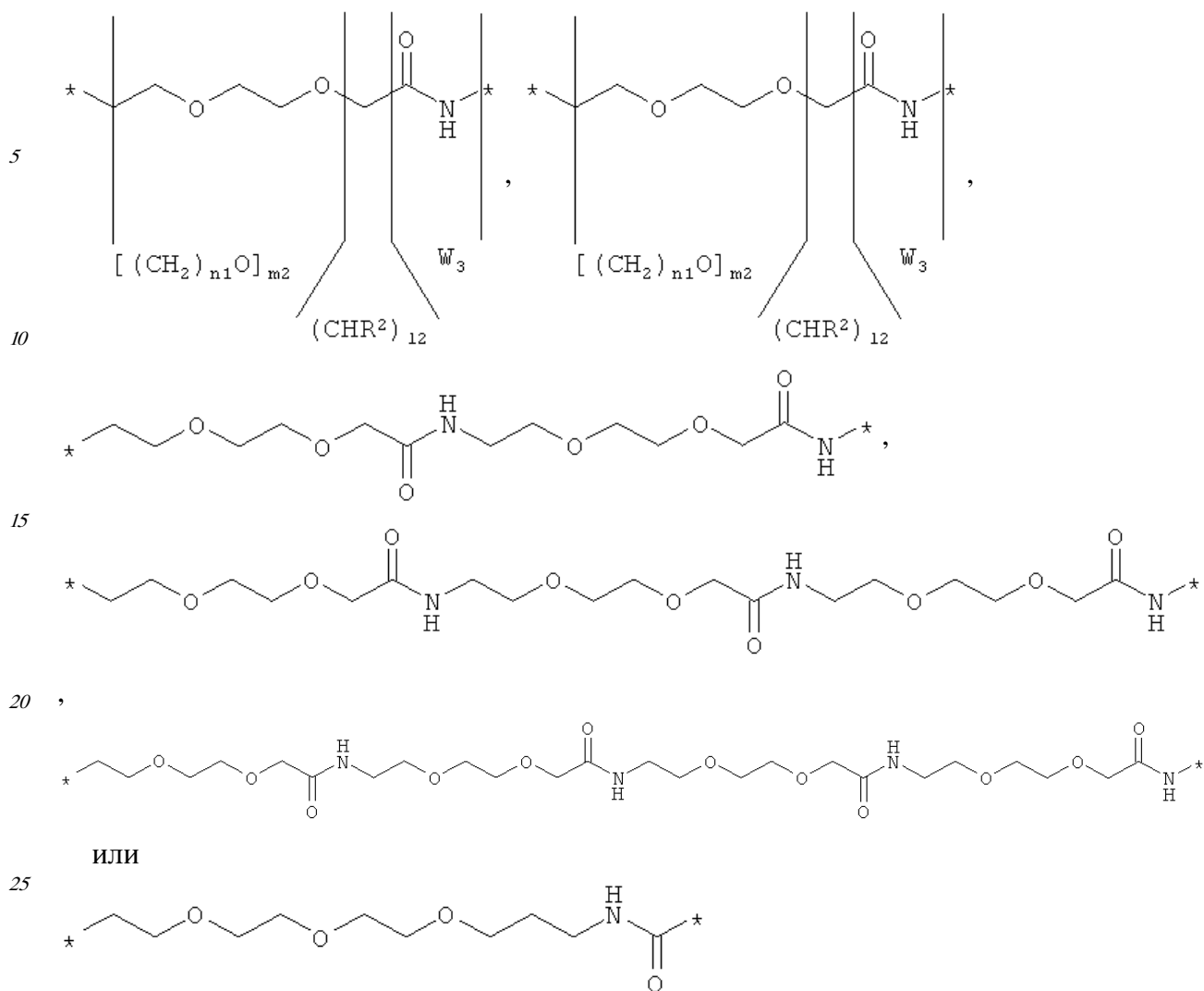
Форма осуществления 72. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-71, где E1 и E2 оба представляют собой -o-.

Форма осуществления 73. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-71, где E1 и E2 оба представляют собой -NR⁶-.

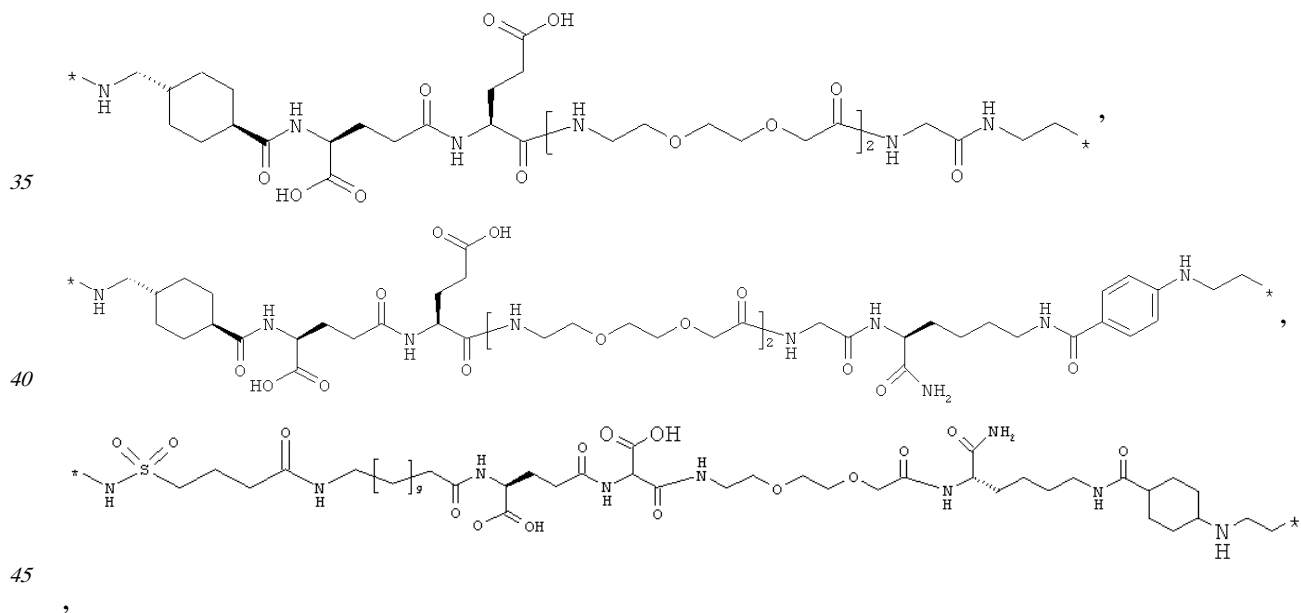
Форма осуществления 74. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-73, где W₁-W₈ независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-или валентной связи.

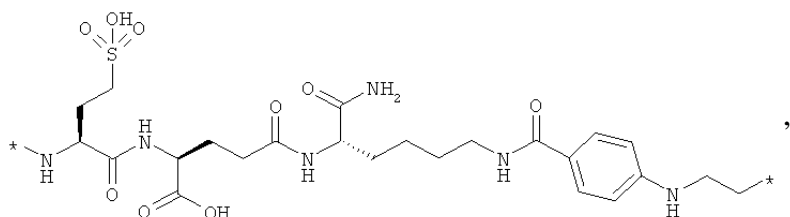
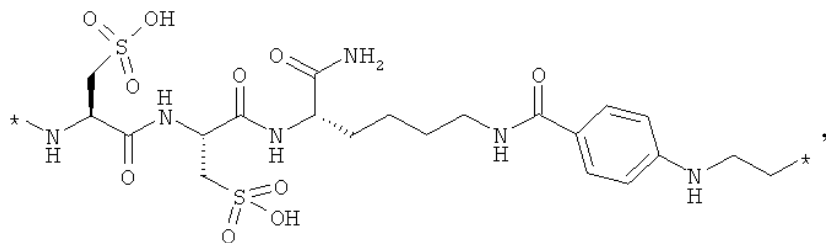
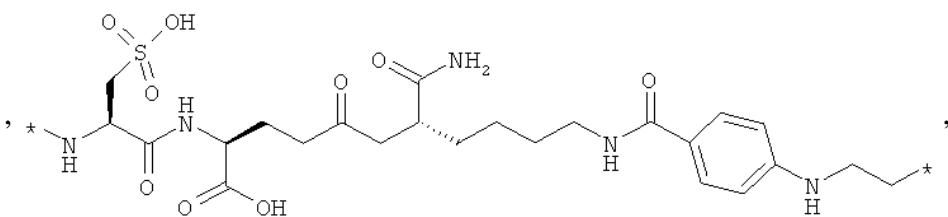
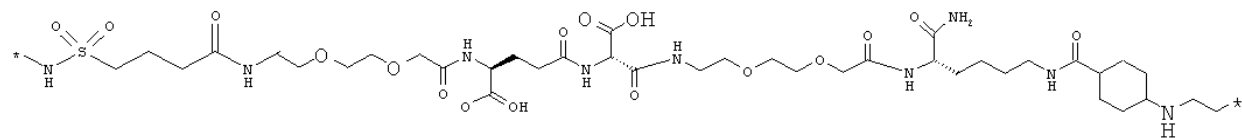
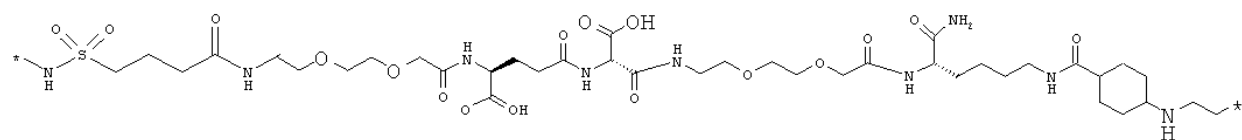
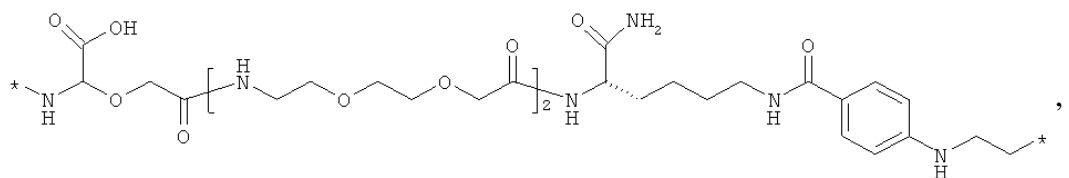
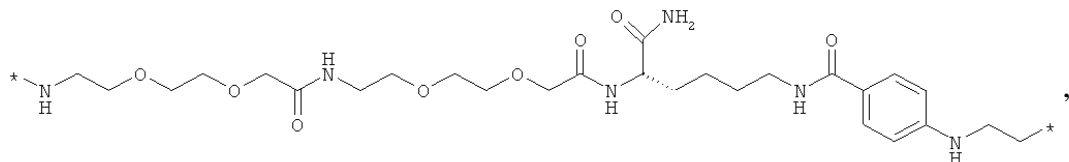
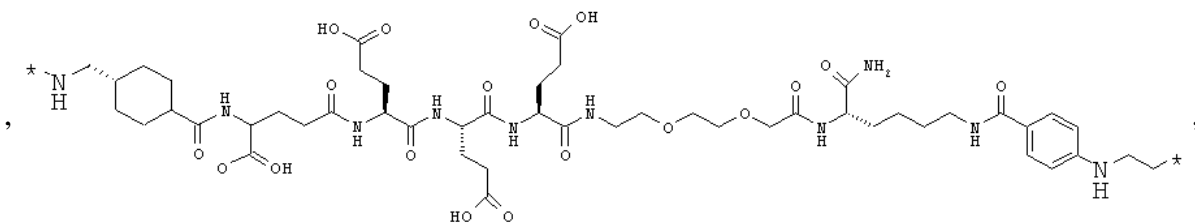
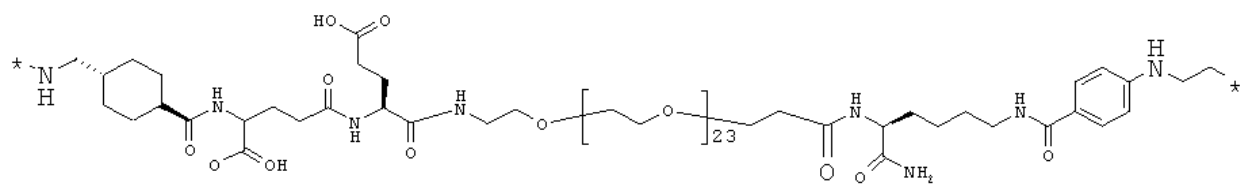
Форма осуществления 75. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-74, где R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из атома водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила; где алкильная группа возможно замещена -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH.

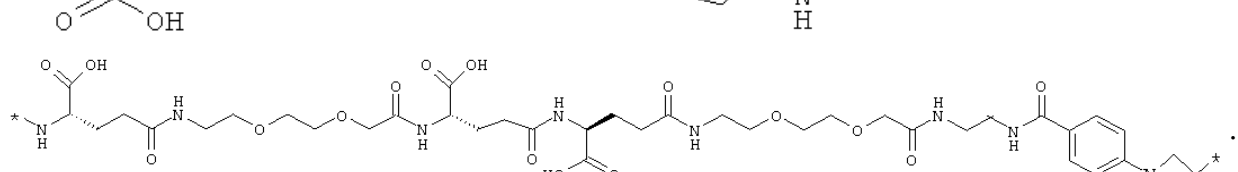
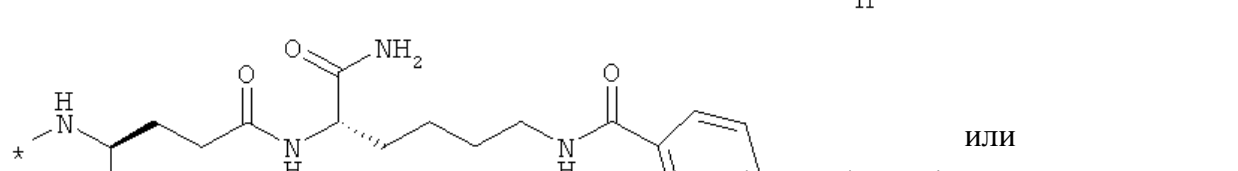
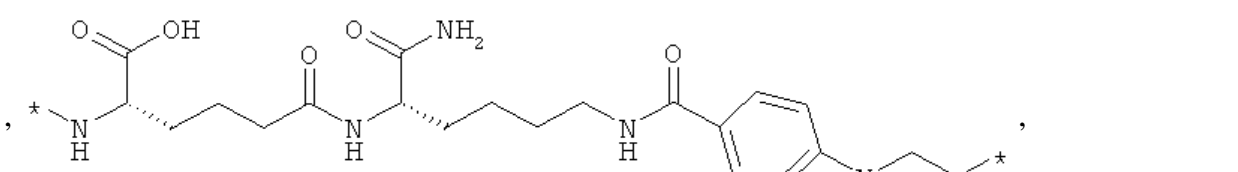
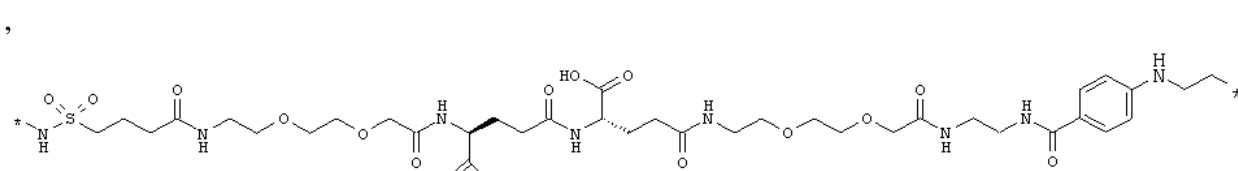
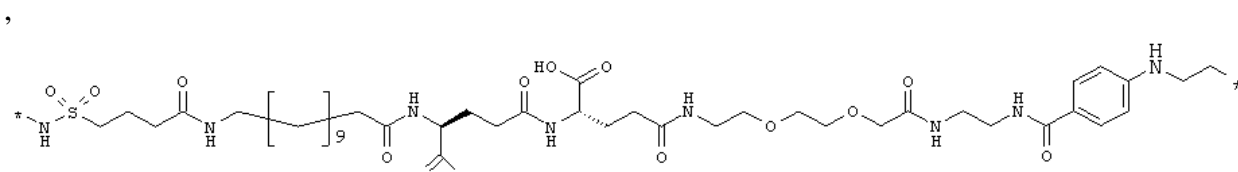
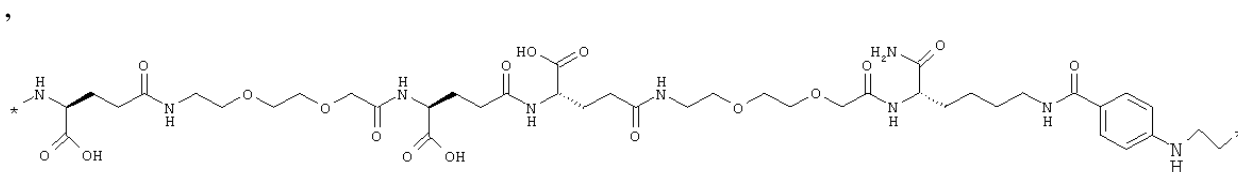
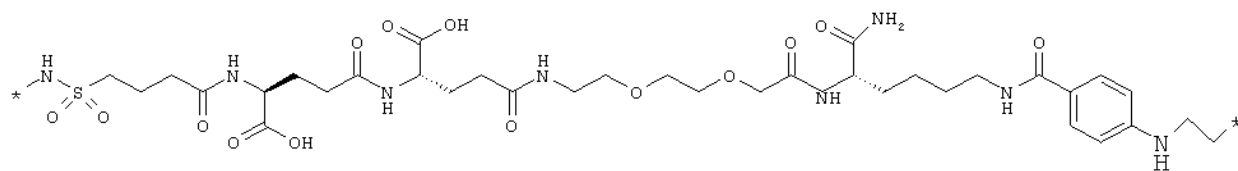
Форма осуществления 76. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 62-75, где X₁ представляет собой -W₁-(CHR¹)_{l1}-W₂]-{[(CH₂)_{n1}O]_{m2}[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}]_{n2}- и X₂ представляет собой -{[(CHR³)_{l3}-W₄]_{m4}}-{[(CH₂)_{n3}O]_{m5}[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}]_{n4}-, где -{[(CH₂)_{n1}O]_{m2}[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}]_{n2}- и -{[(CH₂)_{n3}O]_{m5}[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}]_{n4}- выбраны из



30 Форма осуществления 77. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-76, где гидрофильный спейсер выбран из:







Форма осуществления 78. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-77, где молярная масса гидрофильного спейсера находится в интервале от 80 Да до 1500 Да или в интервале от 500 Да до 1100 Да.

Форма осуществления 79. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-78, где альбумин-связывающий остаток представляет собой липофильный остаток.

Форма осуществления 80. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-79, где альбумин-связывающий остаток нековалентно связывается с альбумином.

Форма осуществления 81. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-80, где альбумин-связывающий остаток отрицательно заряжен при физиологическом pH.

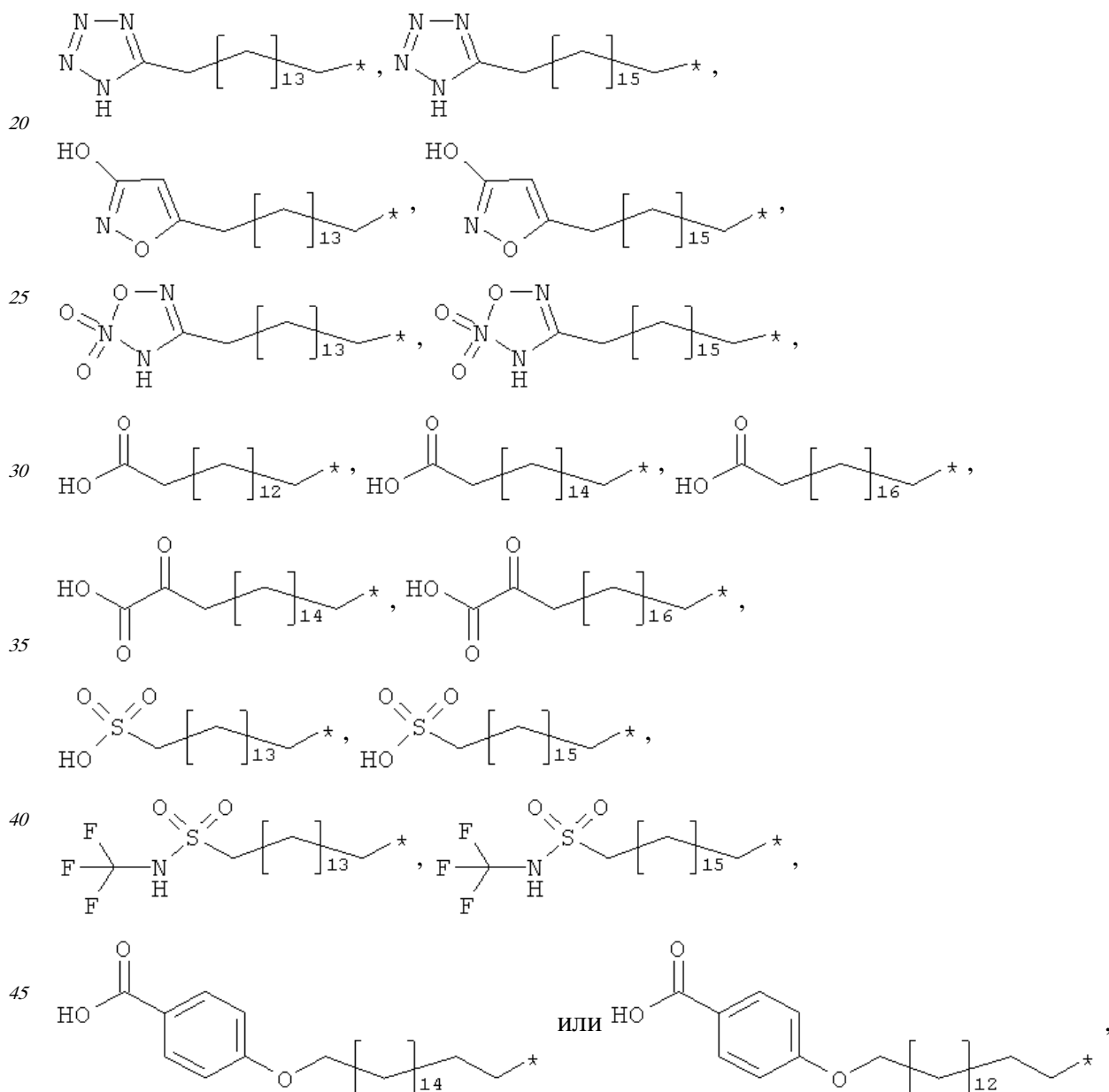
Форма осуществления 82. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-81, где альбумин-связывающий остаток обладает связывающим сродством к сывороточному альбумину человека, которое составляет ниже примерно 10 мкМ или ниже примерно 1 мкМ.

5 Форма осуществления 83. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-82, где альбумин-связывающий остаток выбран из прямоцепочечной алкильной группы, разветвленной алкильной группы, группы, которая имеет группу ω-карбоновой кислоты или изостера ω-карбоновой кислоты.

10 Форма осуществления 84. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-83, где альбумин-связывающий остаток имеет от 6 до 40 атомов углерода, от 8 до 26 атомов углерода или от 8 до 20 атомов углерода.

Форма осуществления 85. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-84, где альбумин-связывающий остаток представляет собой пептид, такой как пептид, содержащий менее 40 аминокислотных остатков.

15 Форма осуществления 86. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-85, где альбумин-связывающее вещество выбрано из



где * обозначает присоединение к В через W.

Форма осуществления 87. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку глутамина белка Р через гидрофильный спейсер В.

5 Форма осуществления 88. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку цистеина белка Р через гидрофильный спейсер В.

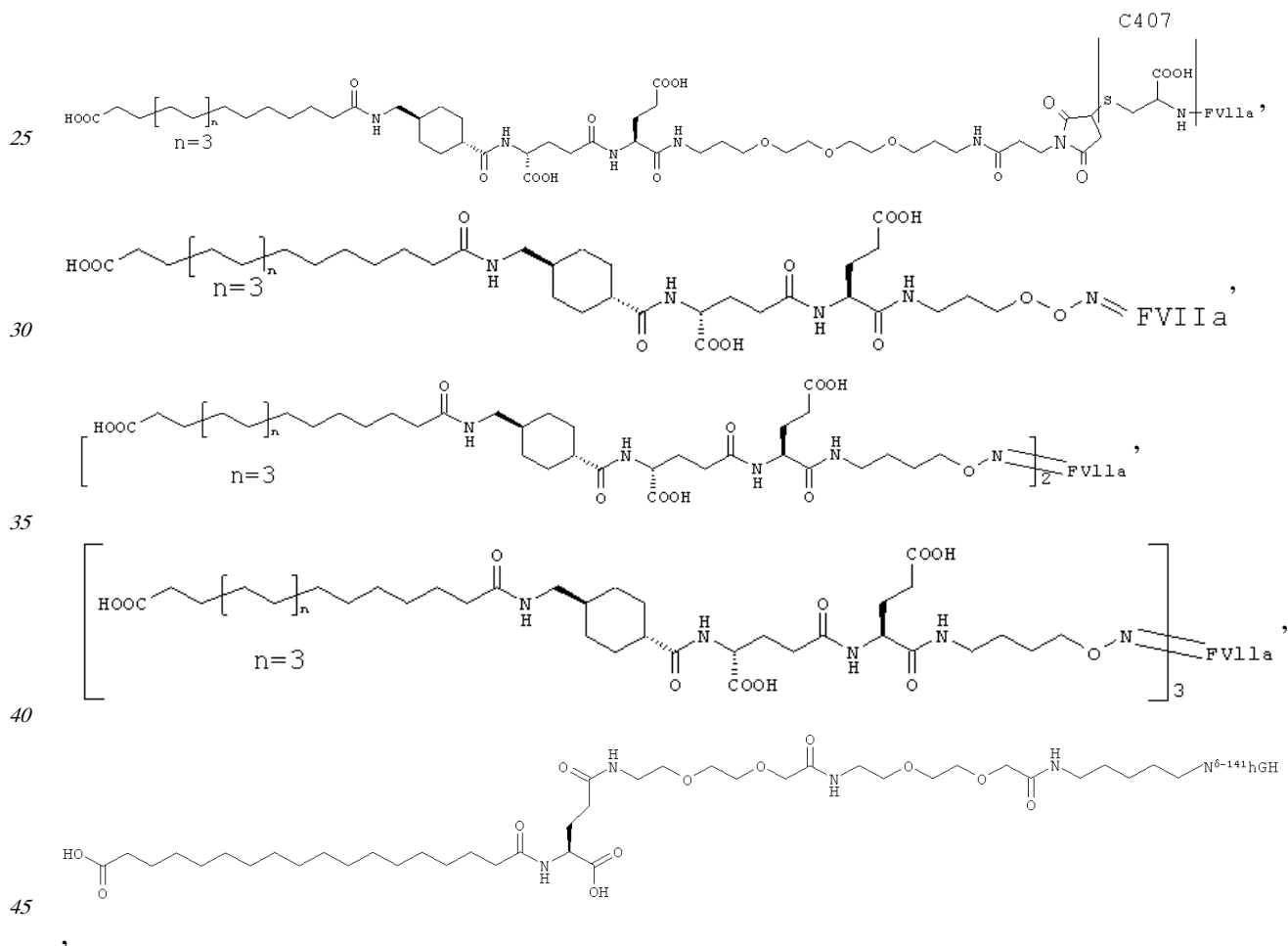
Форма осуществления 89. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к N-концевому
10 остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

Форма осуществления 90. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к С-концевому остатку белка Р через гидрофильный спейсер В.

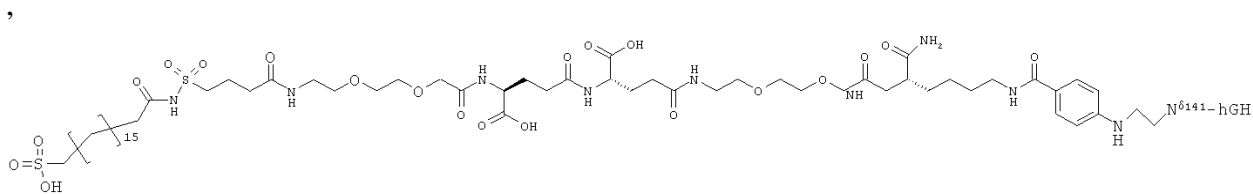
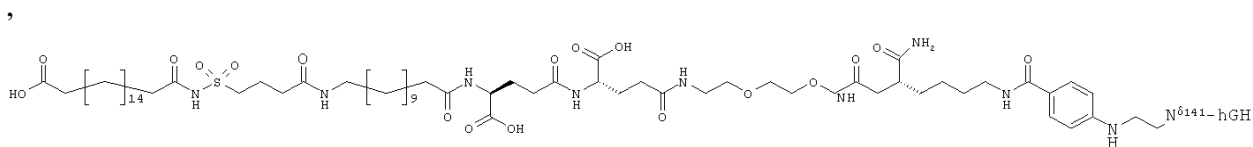
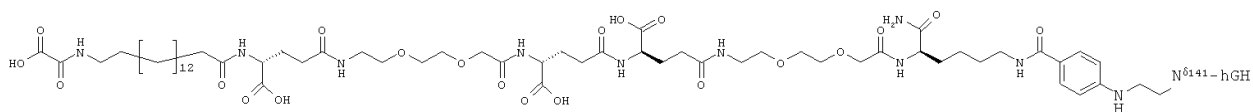
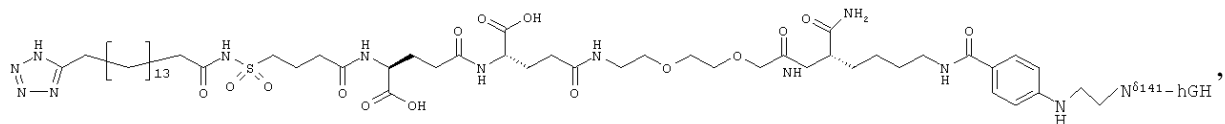
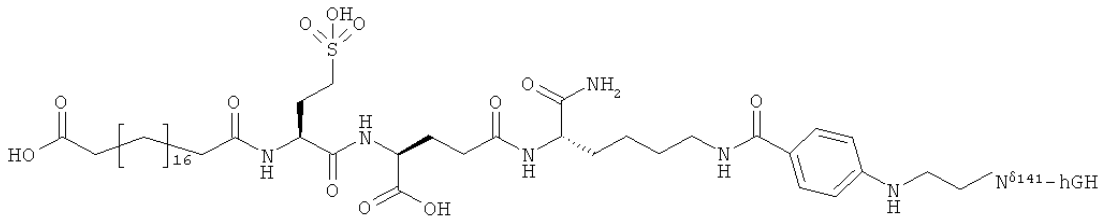
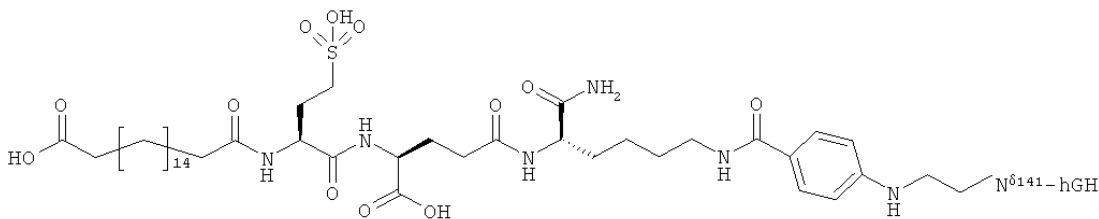
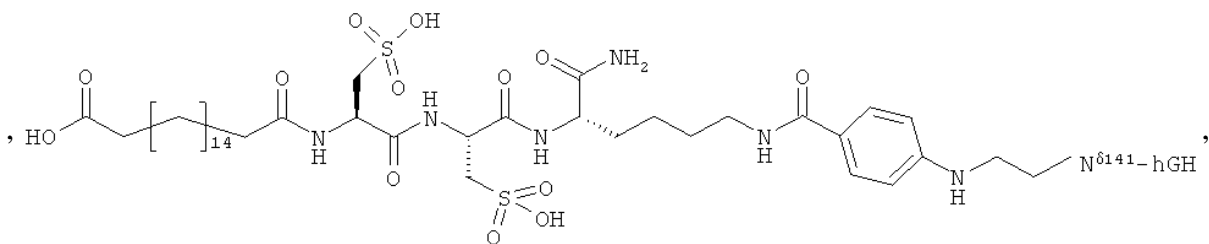
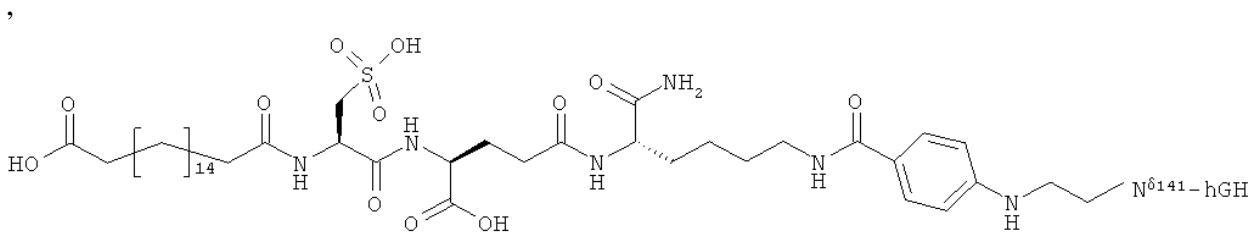
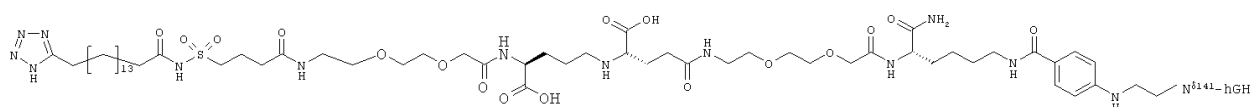
Форма осуществления 91. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм
15 осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к остатку лизина белка Р через гидрофильный спейсер В.

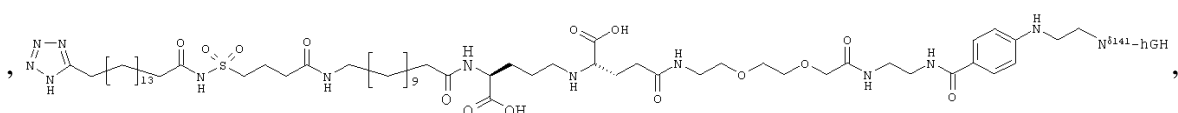
Форма осуществления 92. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-86, где альбумин-связывающий остаток А присоединен к окисленному остатку гликана гликобелка Р через гидрофильный спейсер В.

20 Форма осуществления 93. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 51-92, где конъюгат выбран из







OC(=O)CC1CCC(CC1)CC(=O)NS(=O)(=O)OCCCC(=O)NCC2CCC(CC2)CC(=O)N[C@@H](C(=O)O)CC(=O)N[C@H](C(=O)O)CC(=O)NCCOCOCOC(=O)NCCCCNC(=O)c3ccc(NCCN⁶¹⁴¹-hGH)cc3O=C(O)CC([CH2])14CC(=O)N[C@@H](C(=O)CCC(=O)NC(C(N)=O)CCCCNC(=O)c1ccc(NCC[N+](=O)[O-])cc1)C(=O)OCCCCNC(=O)c1ccc(cc1)NCCC[C@H](C(N)=O)NC(=O)CC[C@@H](C(=O)O)NC(=O)CC(C)[CH2]14C(=O)O

N^{δ141-hGH}

OC(=O)CC1CCCCCCCCCCCCCCC1CC(=O)N[C@@H](CCCCC(=O)N[C@@H](CCCCC(=O)N[C@@H](Cc1ccc(cc1)NCCCN⁺[delta]141-hGH)C(=O)N)C(=O)N)C(=O)O

ИЛИ

[illegible]

Форма осуществления 94. Белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 50-93, для применения в терапии.

Форма осуществления 95. Фармацевтическая композиция, содержащая белковый конъюгат, как определено в любой из форм осуществления 50-93, возможно в комбинации с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Форма осуществления 96. Способ профилактического лечения гемофилии, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированного фактора свертывания крови, как определено в форме осуществления 11.

Форма осуществления 97. Конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в форме осуществления 11, для применения при профилактическом лечении гемофилии.

Форма осуществления 98. Применение конъюгированного фактора свертывания крови, как определено в форме осуществления 11, при получении лекарства для профилактического лечения гемофилии.

Форма осуществления 99. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в форме осуществления 11, для применения при профилактическом лечении гемофилии.

Форма осуществления 100. Фармацевтический препарат, содержащий конъюгированный фактор свертывания крови, как определено в форме осуществления 11.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патент и патенты, цитируемые в данной заявке, полностью включены в данную заявку посредством ссылки до той степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно указана как включенная посредством ссылки и полностью изложена в данной заявке (до максимальной степени, допустимой законом) независимо от какого-либо отдельно приведенного включения конкретных документов, сделанного в данной заявке где-либо еще.

Использование терминов в единственном числе в контексте описания изобретения следует рассматривать как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в данной заявке не указано иное, или явно не противоречит контексту.

Например, выражение "соединение" следует понимать как относящееся к различным "соединениям" по изобретению или конкретно описанному аспекту, если не указано иное.

Если не указано иное, все точные значения, приведенные в данной заявке, являются репрезентативными для соответствующих примерных значений (например, все точные значения, приведенные в качестве примеров в отношении конкретного фактора или измерения, можно рассматривать как представляющие собой соответствующие примерные измерения, модифицированные как "примерно", где пригодно).

Описание в данной заявке любого аспекта или аспекта изобретения с использованием терминов, таких как "содержащий", "имеющий", "включающий" или "содержащийся" в отношении элемента или элементов, предназначено для подтверждения подобного аспекта или аспекта изобретения, который "состоит из", "по существу состоит из" или "по существу содержит" этот конкретный элемент или элементы, если не указано иное, или явно не противоречит контексту (например, композицию, описанную в данной заявке как содержащая конкретный элемент, следует понимать как также описывающую композицию, состоящую из этого элемента, если не указано иное, или явно не противоречит контексту).

Формула изобретения

1. Способ получения конъюгированного белка или гликопротеина, который включает стадии взаимодействия белка или гликопротеина с нерастворимым в воде альбумин-связывающим веществом в присутствии молекулы циклодекстрина.

2. Способ по п.1, где молекула циклодекстрина представляет собой молекулу β -циклодекстрина.

3. Способ по п.1 или 2, где молекулу циклодекстрина добавляют в концентрации от 1% до 10%.

4. Способ по п.1 или 2, который включает взаимодействие в водном буферном растворе.

5. Способ по п.1 или 2, где альбумин-связывающее вещество имеет $cLog P > 1$ в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP).

6. Способ по п.1 или 2, где белковый конъюгат представляет собой белковый конъюгат формулы (I):



где

P представляет собой белок или гликопротеин; и

(A-W-B) представляет собой нерастворимое в воде альбумин-связывающее вещество;

W представляет собой гидрофильный спейсер;

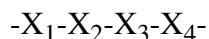
W представляет собой химическую группу, связывающую A и B;

A представляет собой альбумин-связывающий остаток; и

у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;
или его фармацевтически приемлемую соль, или сольват, так что группировка А-
W-B- включает нерастворимую в воде группировку.

7. Способ по п.1 или 2, где белок представляет собой фактор свертывания крови.

8. Способ по п.6, где гидрофильный спейсер имеет формулу



где

X_1 представляет собой $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 представляет собой $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 представляет собой $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$,

X_4 представляет собой $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$,

$l1, l2, l3, l4, l5$ и $l6$ независимо выбраны из 0-16,

$m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо выбраны из 0-10,

$m2$ и $m5$ независимо выбраны из 0-25,

$n1, n2, n3$ и $n4$ независимо выбраны из 0-16,

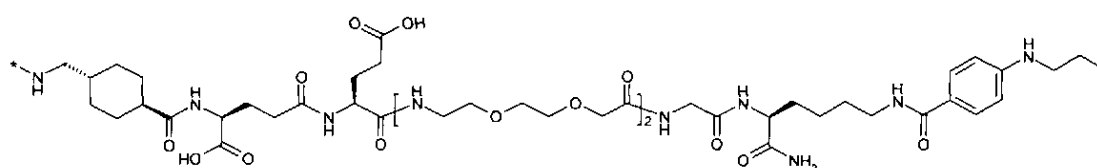
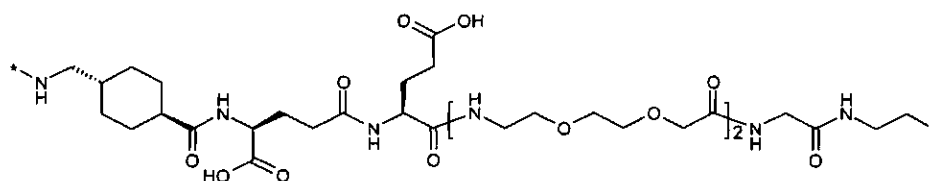
F представляет собой арил, гетероарил, пирролидин-2,5-дион, где арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂,
, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкилом,

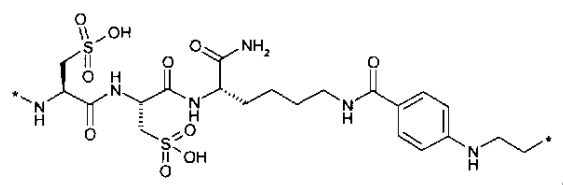
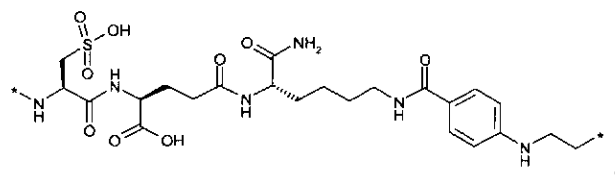
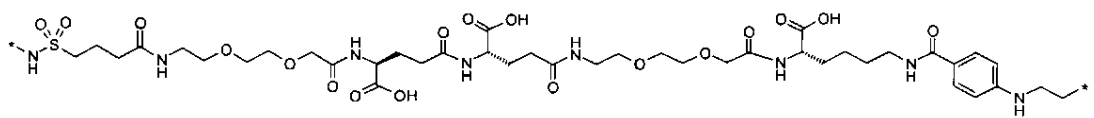
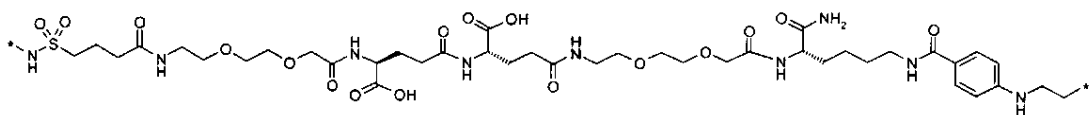
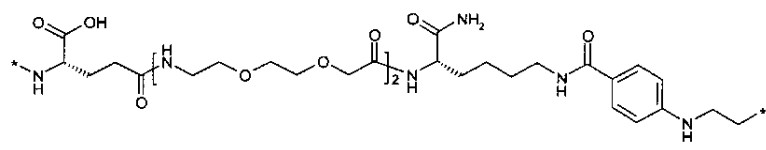
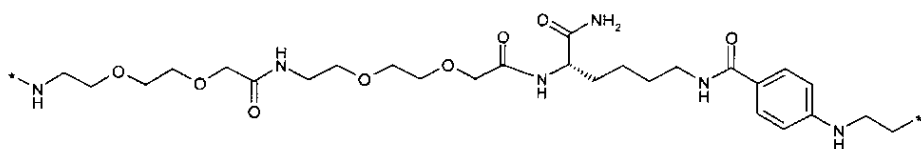
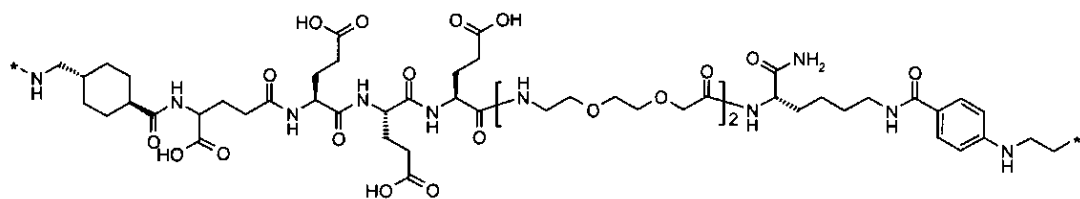
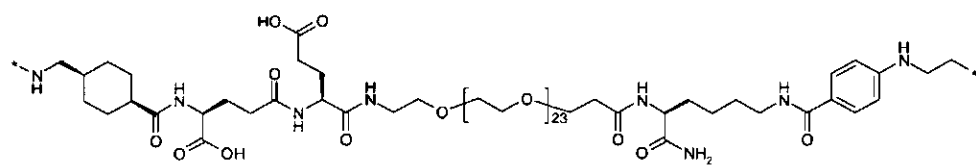
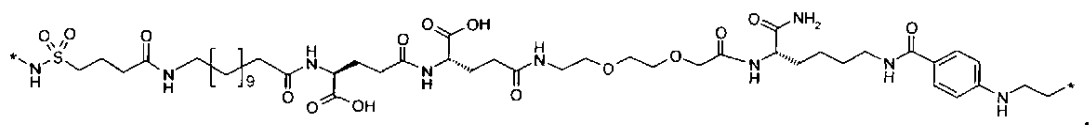
R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из атома водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; где алкильная, арильная и гетероарильная группы возможно замещены галогеном, -C(O)OH, -C(O)NH₂,
, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

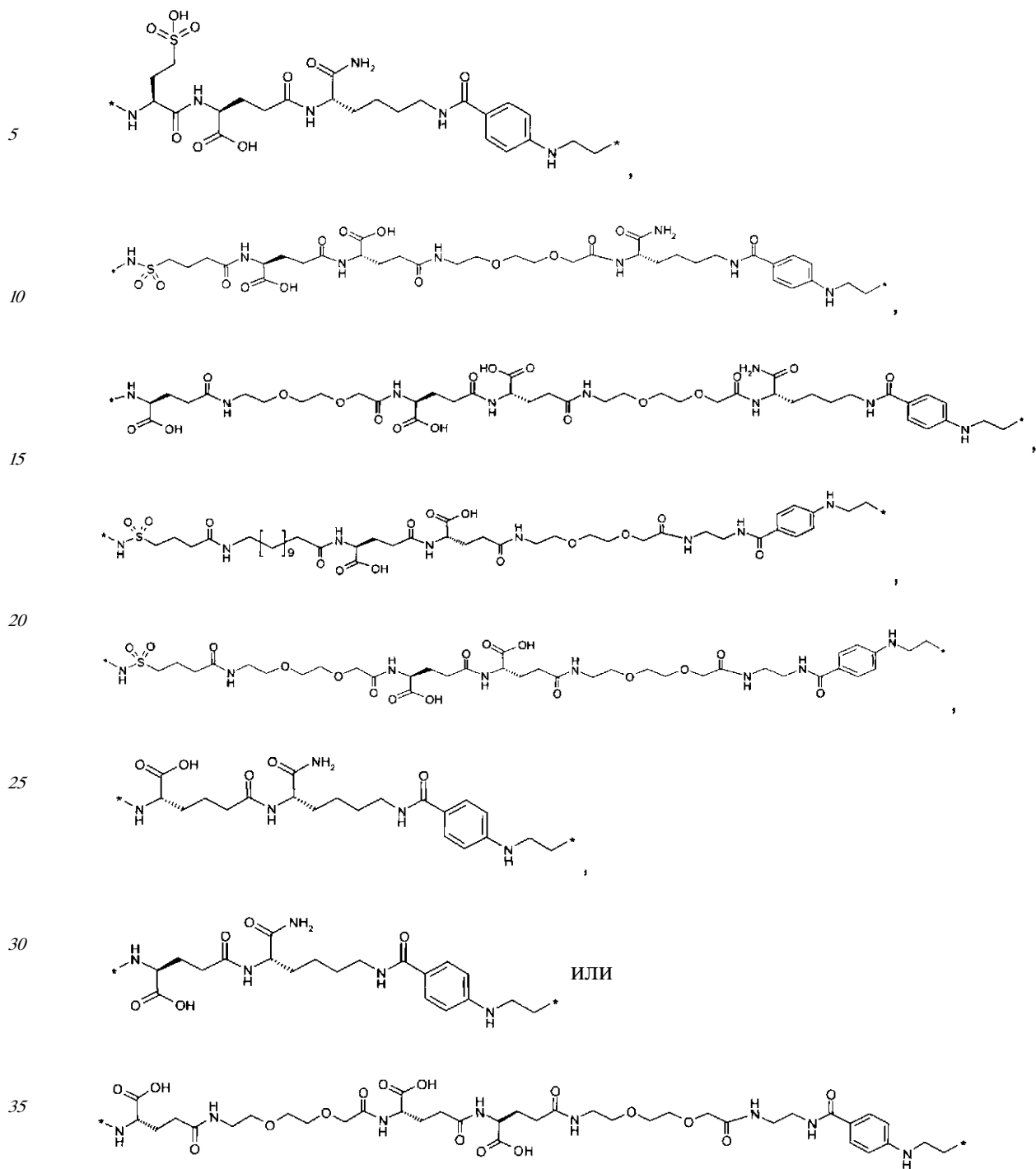
D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- или валентной связи, где R⁶ и R⁷ независимо представляют собой атом водорода или C₁₋₆-алкил,

W₁-W₆ независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или валентной связи; где s2 равно 0 или 1.

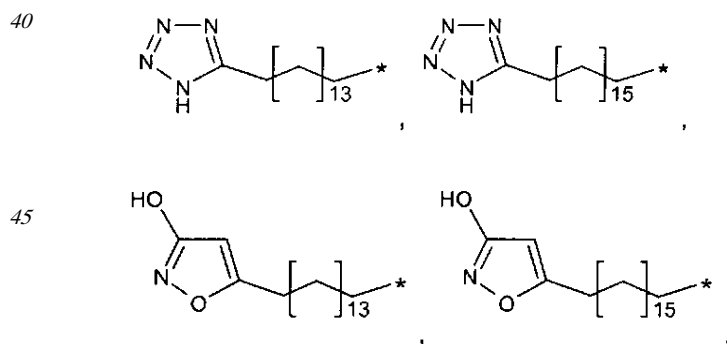
9. Способ по п.6, где гидрофильный спейсер выбран из

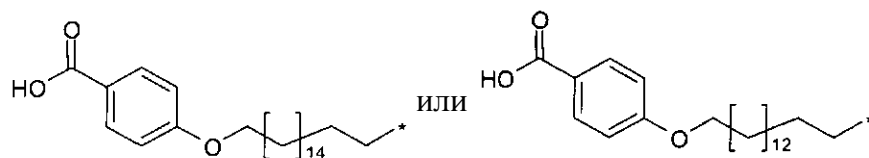
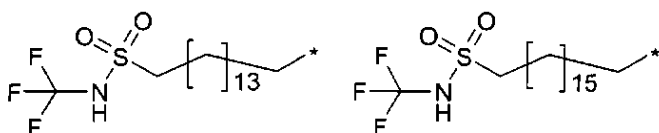
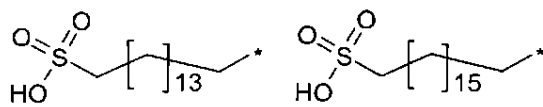
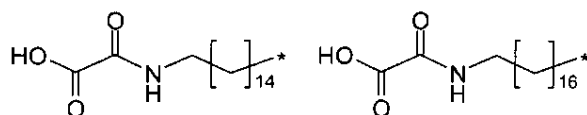
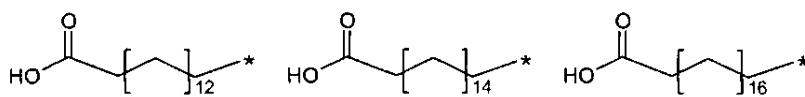
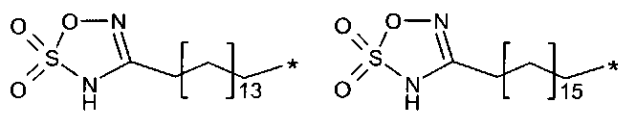






10. Способ по п.6, где альбумин-связывающее вещество выбрано из





где * обозначает присоединение к В через W.

11. Способ по п.5, где альбумин-связывающее вещество имеет $\text{sLog } P > 5$ в любом из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана и пропиленгликольдипеларгоната (PGDP).

12. Способ по п.1, где молекула циклодекстрина является замещенной.

13. Способ по п.12, где молекула циклодекстрина замещена одним или более C1-балкилом, каждый из которых может быть замещен одной или более гидроксильными группами.

14. Способ по п.13, где один или более C1-6 алкил выбран из группы, состоящей из метила, этила и пропила.

15. Способ по п.13, где одна или более гидроксильных групп выбрана из такой как гидроксиэтил или гидроксипропил.

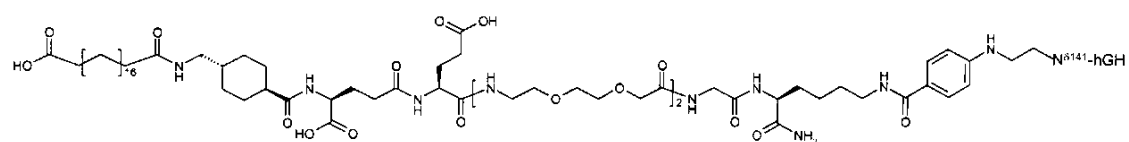
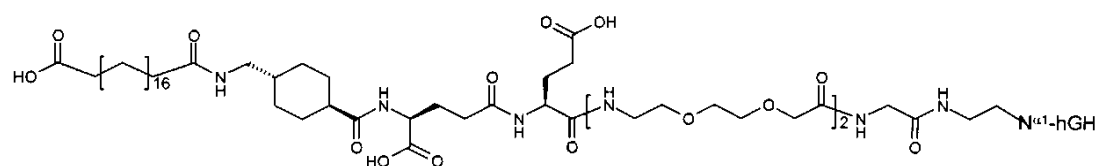
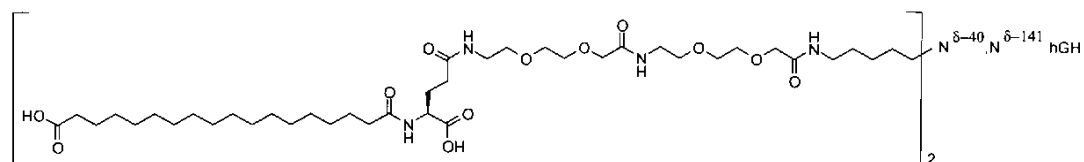
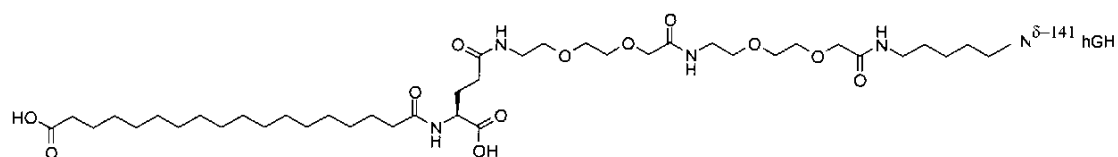
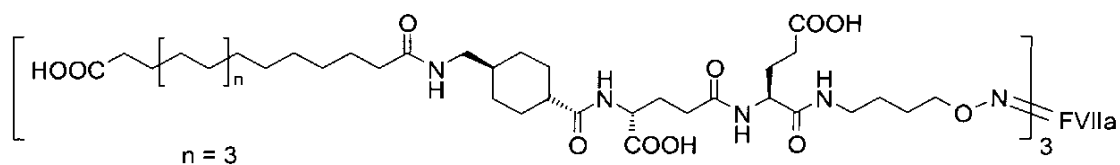
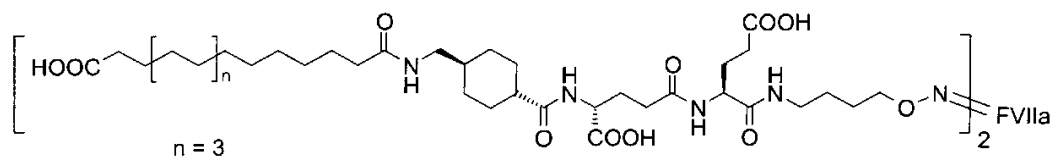
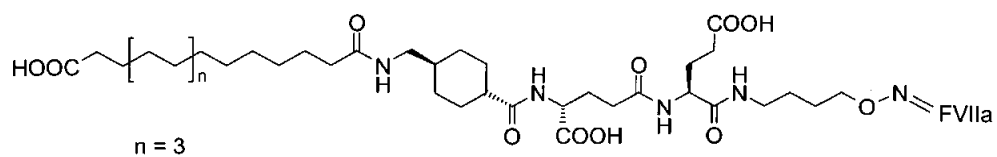
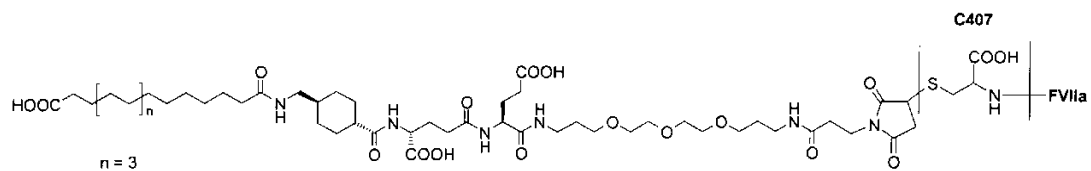
16. Способ по п.12, где молекула циклодекстрина представляет собой 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрин.

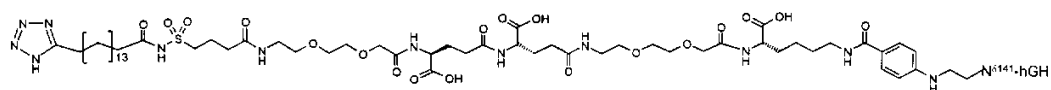
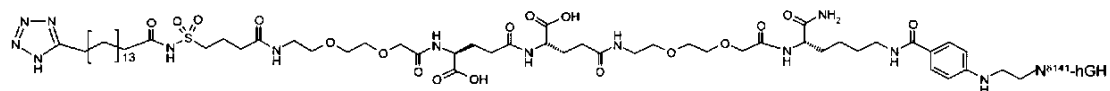
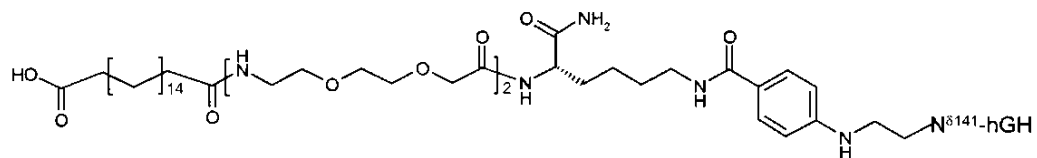
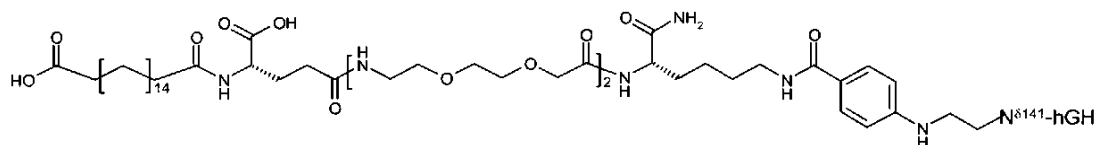
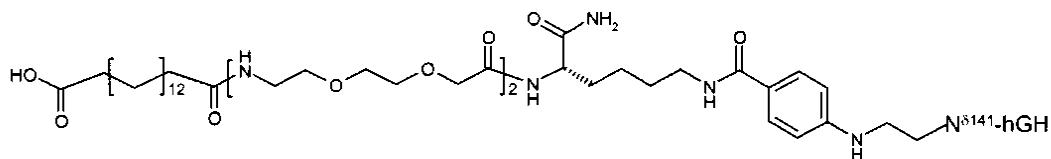
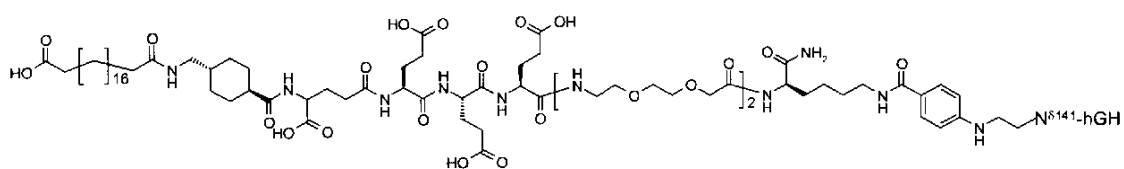
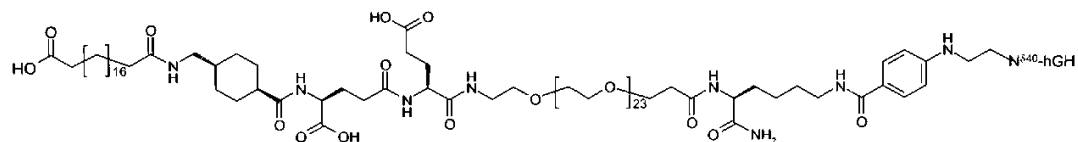
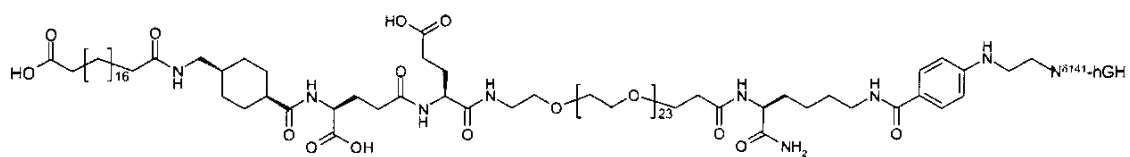
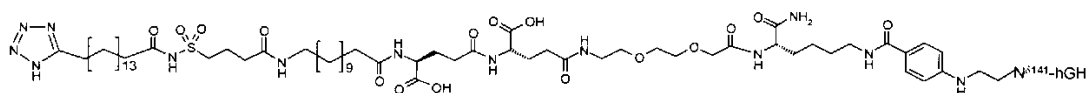
17. Способ по п.4, где буфер выбран из группы, состоящей из 50 mM Hepes, 100 mM NaCl и 10 mM CaCl_2 .

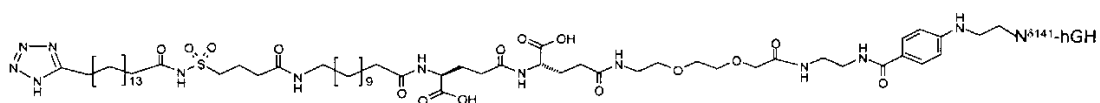
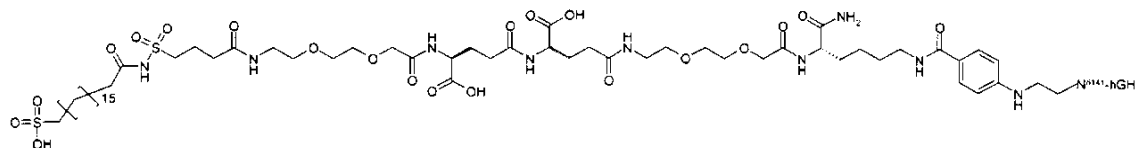
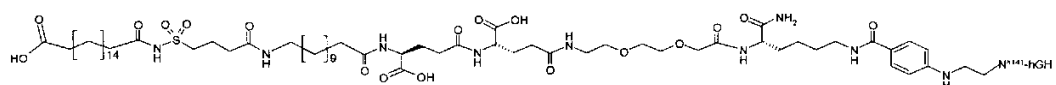
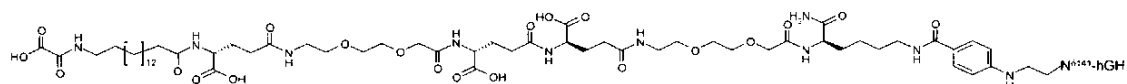
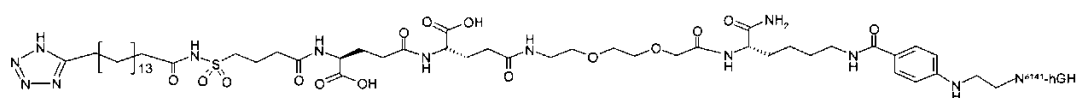
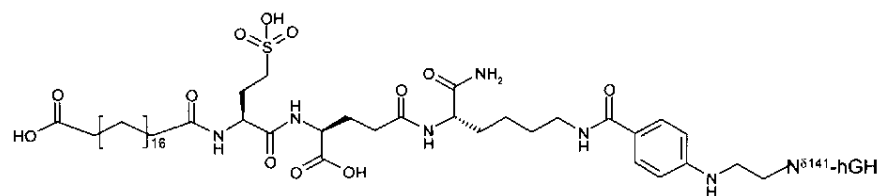
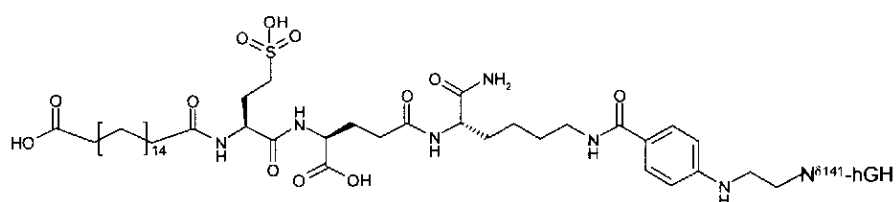
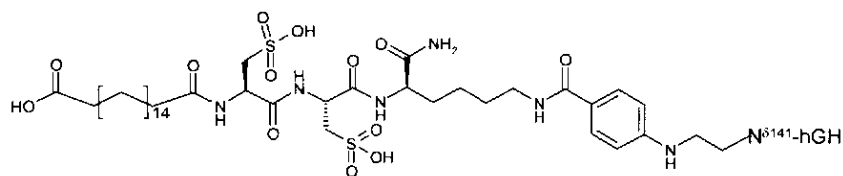
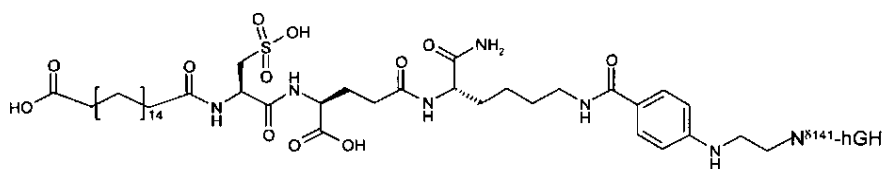
18. Способ по п.7, где белок выбран из FVII, FX, FII, FV, белок C, белок S, tPA, PAI-1, тканевой фактор, FVIII, FIX, FXI, FXII и FXIII.

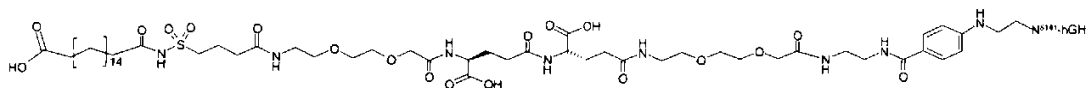
19. Конъюгированный белок, полученный способом по любому из пп.1-18 и способный нековалентно связываться с сывороточным альбумином человека для применения при изготовлении лекарственного средства.

20. Конъюгированный белок, выбранный из

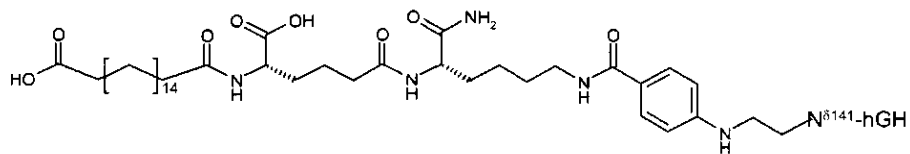




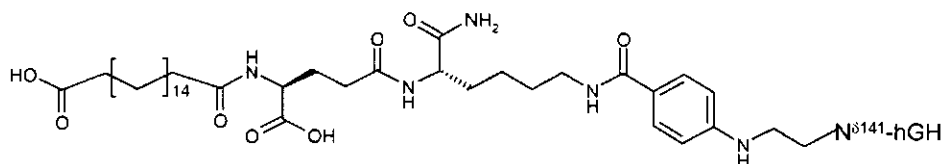




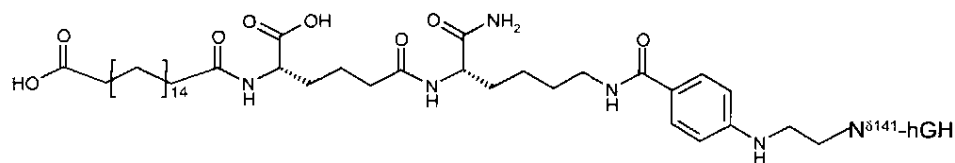
5



10

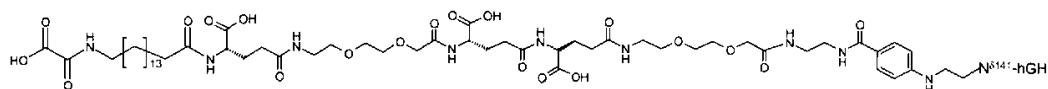


15



20

ИЛИ



25

который способен нековалентно связываться с сывороточным альбумином человека для применения при изготовлении лекарственного средства.

21. Конъюгированный белок по п.19 или 20 для применения в терапии.

30

35

40

45