

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **019968**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2014.07.30**

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201170242**

(22) Дата подачи заявки  
**2009.07.22**

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЫЧЬИ ПОЛИПЕПТИДЫ G-CSF И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **61/083,132**

(56) US-A-5849883  
WO-A2-2005074650  
US-A1-20050142102

(32) **2008.07.23**

(33) **US**

(43) **2011.10.31**

(86) **PCT/US2009/051388**

(87) **WO 2010/011735 2010.01.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АМБРКС, ИНК.; ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Хэйс Путмэн Анна-Мария А., Кнудсен  
Ник, Норман Теа, Кодер Алан,  
Крайнов Вадим, Скидмор Лиллиан,  
Кеннинг Питер К. (US)**

(74) Представитель:  
**Кондакова Е.В. (RU)**

---

(57) Представлены модифицированные бычьи полипептиды G-CSF и их применение.

---

**B1**

**019968**

**019968**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам колониестимулирующего фактора бычьих гранулоцитов (bG-CSF), необязательно модифицированным по меньшей мере одной не кодируемой в природе аминокислотой.

### Уровень техники

Экономические потери от инфекционных заболеваний при производстве пищевых продуктов животноводства хорошо документированы. Инфекционные заболевания снижают выгоду, повышают стоимость продукции и ухудшают качество пищевых продуктов, также как влияют на производительность, здоровье и общее состояние животного. Заболевания могут снизить производство и ухудшить качество молока, что приводит к большим экономическим потерям владельцев молочных ферм и производителей говядины, в частности, если в некоторых случаях инфекционные микробные заболевания вызывают заболеваемость и смертность новорожденных, молодых (например, ремонтного поголовья) или взрослых животных. Два таких заболевания, как мастит и респираторное заболевание крупного рогатого скота (BRD), могут оказать губительный эффект на производство мясомолочных пищевых продуктов.

Мастит определяют как воспаление молочной железы. Он может поразить любое млекопитающее, например коров, овец и коз. Мастит крупного рогатого скота представляет собой инфекцию вымени жвачных животных, таких как коровы, вызываемую, главным образом, грам-положительными и грам-отрицательными бактериями, и особенно у коров с интенсивной лактацией. Бактериальная инфекция приводит к воспалению молочной железы (т.е. сосков и вымени). Животные могут стать более подверженными маститу из-за нарушенной микробицидной функции нейтрофилов во время периода до и после отела. Заболевание доставляет особенно много беспокойства и является весьма важным с экономической точки зрения, так как патоген легко переносится от одного животного к другому во время процесса дойки. Он часто развивается в течение первых нескольких недель после отела и может повторяться при каждой лактации. Некоторыми из основных патогенных микроорганизмов, вызывающих мастит крупного рогатого скота, являются *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*; см. также Bovine Mastitis, издание Glenys Bloomfield, V&O Publications 1987, включенное в описание путем ссылки. Указанные микроорганизмы проникают в вымя через сосковые каналы и вызывают воспаление вырабатывающих молоко тканей, вызывая образование рубцовой ткани, которая один раз образовавшись, может вызывать постоянное снижение производства молока. Инфекция может также изменять состав, количество, вид и качество молока. Вызывающие мастит патогены делятся на две категории, а именно контагиозные (заразные) и относящиеся к окружающей среде. Контагиозные бактерии, такие как *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*, главным образом, заселяют такие участки тканей хозяйки, как молочные железы, сосковые каналы и поврежденную кожу сосков, и передаются от одной инфицированной коровы к другой в процессе дойки. Относящиеся к окружающей среде бактерии, часто *strep-tococci*, *enterococci* и колиформные организмы, обычно присутствуют в среде обитания коров, в таких источниках, как коровий навоз, почва, растительные материалы, подстилка или вода, и инфицируют при случайном оппортунистическом контакте с животным. Различие между контагиозными и относящимися к окружающей среде патогенами, хотя и не исключительное, является особенно важным, так как особенности содержания молочного поголовья важны для различных групп микроорганизмов. Во всех случаях мастит крупного рогатого скота вызывает, независимо от вызывающего его микроорганизма, способ передачи заражающего патогена внутрь железы вымени через отверстие соска и сосковый канал. Обычные источники вредных микроорганизмов включают антисанитарное состояние доильных установок, доярок, других больных маститом животных, антисанитарное состояние стойл и процессы собственных выделений животных (дефекация/мочеотделение).

Существуют различные формы или типы мастита крупного рогатого скота, характеризующиеся различной тяжестью и симптоматикой, включая следующие: (1) инфекция вымени: заражение полости вымени микроорганизмами, которые размножаются в железе и вызывают воспаление; (2) неклинический или субклинический мастит; форма мастита, при которой не происходит опухания железы или не наблюдается аномальности молока, хотя в молоке происходят изменения, которые можно определить специальными тестами. Такой тип мастита является наиболее часто встречающимся и вызывает наиболее крупные общие потери для большинства стад. Такой мастит часто называют "скрытым" маститом; (3) клинический мастит; это такая форма мастита, при которой наблюдаются аномальное состояние вымени и секреты молока. Легкий клинический мастит включает изменения в молоке, такие как расслаивание, образование сгустков и водянистость или необычный внешний вид. Повышение температуры и чувствительность вымени незначительны или отсутствуют, но могут присутствовать следы набухания. Тяжелый клинический мастит включает внезапное набухание инфицированной четверти вымени, которая становится горячей, твердой и чувствительной. Качество молока ухудшается, и производство молока падает. Иногда, кроме локальных проявлений в вымени, сами коровы становятся больными. Появляются признаки лихорадки, учащенный пульс, депрессия, слабость и потеря аппетита. Комбинацию таких признаков часто называют острым системным маститом, так как поражено не только вымя, но и весь организм животного; и (4) хронический мастит; такую форму мастита вызывает постоянная инфекция выме-

ни, которая существует чаще всего в неклинической форме, но иногда может переходить в активную клиническую форму. После таких "вспышек" неклиническая форма обычно периодически возвращается. (см. Generally Current Concepts of Bovine Mastitis, published by The National Mastitis Council, Inc., 2nd Ed. 1978, p. 5.)

Мастит продолжает вызывать значительные экономические потери в молочной промышленности. Мастит влияет на рентабельность стада разными путями, как прямо, так и косвенно, включая (1) потери производства молока; (2) большее количество отбракованных инфицированных коров; (3) снижение ценности молока; (4) выбраковку молока после обработки антибиотиками; (5) стоимость ветеринарного лечения (антибиотики и визиты ветеринара) и (6) смертность (Bovine Mastitis, Glenys Bloomfield, supra, p. 33.)

Другим общим заболеванием, поражающим скотоводство, является транспортная лихорадка (респираторное заболевание крупного рогатого скота или BRD). Некоторые называют BRD "комплексным заболеванием" по двум причинам: обычно его вызывают различные патогены, как вирусы, так и бактерии, которые взаимодействуют друг с другом, вызывая резко выраженное заболевание, и так как поведение патогенов может проявляться как последовательный процесс, оно шаг за шагом приводит к болезни животных. Бактериальные патогены представляют собой одну из наиболее изученных причин острого синдрома. Такие бактериальные патогены могут заселять респираторный тракт крупного скота после поражения вирусной инфекцией и другие факторы, такие как стресс после отнятия от вымени, стресс при транспортировке, изменение питания и изменение окружающей температуры и влажности, могут предшествовать и внести свой вклад в инфицирование. Во многих случаях эти факторы добавляются к экспонированию скота патогенам во время транспортировки животных, когда они смешиваются с животными другого происхождения в грузовиках, стойлах и аукционных сараях, что приводит к большому числу заболеваний животных, доставляемых на площадки для откорма.

Были выделены и связаны с BRD некоторые виды бактерий, и некоторыми из наиболее часто встречающихся являются *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* и/или *Histophilus somni*. *Haemophilus somni* представляет собой вирулентный патоген, который вызывает септицемию у скота и иногда приводит к проявлениям, которые называют "гемофилический *somni* комплекс", одной из форм которого является респираторное заболевание; вирусы, такие как инфекционный бычий ринотрахеит (IBR), вирусная диарея крупного рогатого скота (BVD) и респираторный синцитиальный вирус крупного рогатого скота (BRSV), также могут участвовать в иницировании BRD комплекса, часто открывая дверь вторичной бактериальной инфекции.

Так как практически невозможно исключить указанные организмы из окружающей среды, к BRD комплексу следует подходить с точки зрения профилактики указанных заболеваний, предотвращая возможность контактирования с вызывающими заболевания агентами и детектируя или обрабатывая клинические случаи, насколько возможно, быстро и эффективно. Респираторные заболевания являются основной причиной потерь от заболеваний мясного поголовья. Обычно считают, что окончательной причиной гибели в большинстве случаев транспортной лихорадки является бактериальная (обычно *pasteurella*) пневмония. *Pasteurella haemolytica*, особенности типа IA, является наиболее часто встречающейся бактерией, выделенной при случаях респираторного заболевания в Северной Америке. Вакцинация против некоторых из инфекционных агентов, проводимая против транспортной лихорадки, иногда помогает, но вакцины доступны и эффективны только против нескольких из агентов, которые, как известно, участвуют в комплексе заболевания.

Лечение антибиотиками было основным компонентом стратегии борьбы с маститом и BRD. В патенте США № 7182948, который включен в описание посредством ссылки во всей своей полноте, указано, что противомикробные обработки сосков вымени содержащими йод растворами, как было показано, являются эффективными против инфекций млекопитающих и вызывающих мастит бактерий (Pankey, J.W. et al., (1983) J. Dairy Sci., 66 (1), 161, 167). Указанными композициями обычно обрабатывают вымя путем его погружения или опрыскивания перед дойкой, а также после удаления доильной чашки. Для уменьшения случаев мастита созданы коммерческие растворы для сосков, содержащие различные противомикробные агенты, включая йодофоры, четвертичные соединения аммония, соединения, выделяющие хлор (например, щелочные гипохлориды), окисляющие соединения (например, перекись водорода, перациды), протонированные карбоновые кислоты (например, гептановая, октановая, нонановая, декановая, ундекановая кислоты), анионные кислоты (например, алкиларилсульфоновые кислоты), диоксид хлора (из хлорита) и бисбигуаниды, такие как хлоргексидин. Такие агенты, которые обладают различными степенями эффективности, ограничивают распространение мастита за счет уменьшения популяций патогенов на сосках. Однако существуют проблемы, связанные с использованием противомикробных агентов. Чаще всего встречаются раздражение сосков и растрескивание сосков. Для облегчения указанных проблем в такие композиции включали смягчающие добавки, такие как глицерин и ланолин. Однако даже при использовании указанных смягчительных средств кожные раздражения все еще могут возникать.

В патенте США № 6790867, который полностью включен в описание посредством ссылки, указывается, что подкожные инъекции композиций, включающих нестероидные противовоспалительные ле-

карственные средства (NSAID), такие как флуниксин, с фторированным хлорамфениколом или антибиотиком - производным тиамфеникола, таким как флорфеникол, можно использовать для лечения BRD. В патентной публикации заявки США № 20070155799, которая полностью включена в описание посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыты новые соединения феникола, которые можно использовать в качестве антибиотиков-пролекарств и в комбинации с NSAID или другими антибиотиками.

NMC (ранее National Mastitis Council), некоммерческая организация, занимающаяся уменьшением случаев мастита и повышением качества молока, акцентирует внимание на важности правильной санации сосков, но также и на лечебной обработке для профилактики мастита. Экономический вред, причиняемый маститом, привел к многочисленным исследованиям по борьбе с ним. Сообщалось, что физические стрессы так же, как относящиеся к окружающей среде условия, вносят значительный вклад в маститные инфекции; см. патентную публикацию США № 20020051789, которая включена в описание посредством ссылки. Так как было документировано, что субклинический мастит непосредственно связан с плохим состоянием сосков (Neijenhuis P., et al. (2001) J. Dairy Sci., (84) 2664 2672), был предложен ряд коммерческих растворов для омывания сосков, включающих кондиционеры (National Mastitis Council, Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since, 1980; January 2002). Было показано, что затверделость и шероховатость кончиков сосков имеет прямое отношение к клиническому маститу (Neijenhuis F., et al. (2001) J. Dairy Sci., (84) 2664 2672). Уменьшение растрескивания и раздражения сосков так же, как сохранение эластичности сосков, являются очень важными факторами в борьбе с инфекциями молочной железы. В качестве кондиционера для сосков также использовали глицерин в растворах для омывания сосков. Однако исследования показали, что не происходит значительного уменьшения количества вызывающих мастит бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* или *Coliforms*, если содержание глицерина повышают с 2 до 10% в 1% йодном растворе для обработки сосков (National Mastitis Council, Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since, 1980; January 2002). Таким образом, хотя такие продукты, как растворы для омывания сосков, доступны, все еще существует неудовлетворенная потребность в уменьшении случаев возникновения, рецидивов и/или снижения тяжести мастита.

В патенте США № 5849883, который полностью включен в описание посредством ссылки, раскрыт ряд антибиотиков, которые использовали для лечения мастита, включая, без ограничения, бета-лактамы антибиотики, такие как пенициллин (ампициллин, клоксациллин, гетациллин, нафциллин, пенициллин G, (бензил-пенициллин), прокаинпенициллин) и цефалоспорины (цефоперазон, цефуроксим, цефалоний, цефаприн, цефоксазол, цефравцетрил); аминогликозидные антибиотики (фрамицетин, неомицин, новобиоцин, стрептомицин); антибиотики макролиды (эритромицин); тетрациклины (хлортетрациклин, окситетрациклин) и полипептидные антибиотики (полимиксин В). Лечение мастита антибиотиками обычно проводят, используя интрамаммарные вливания, или коровам в период лактации, если у них диагностирован клинический мастит, или в сухостойный период (когда корову не доят) (*Bovine Mastitis*, supra, p. 69). В тех случаях, когда присутствует тяжелое клиническое заболевание, антибиотики необходимо вводить парентерально, так как интрамаммарные вливания неэффективны из-за блокировки каналов.

Существовавшие ранее надежды на то, что антибиотики позволят полностью победить заболевание, не реализовались. Ни один из вышеперечисленных антибиотиков не оказался полностью удовлетворительным. Кроме того, было обнаружено, что было бы весьма желательно заменить лечение антибиотиками лечением неантибиотическими химиотерапевтическими лекарственными соединениями по следующим причинам: (1) антибиотики, эффективные в медицине для людей, нельзя использовать в ветеринарии, чтобы не выработать штаммовую устойчивость бактерий, проявляющихся при заболеваниях людей; (2) антибиотики следует приберечь для таких заболеваний, для которых недоступны химиотерапевтические лекарственные соединения, так как было доказано, что штаммы бактерий вырабатывают устойчивость к антибиотикам после длительного использования таких антибиотиков; и (3) *Staphylococcus aureus*, один из вышеуказанных патогенов, уже выработал устойчивость к большинству антибиотиков, которые использовали при лечении мастита крупного рогатого скота.

Один из таких способов лечения неантибиотическим химиотерапевтическим лекарственным соединением раскрыт в патенте США № 4610993, который включен в описание посредством ссылки, в котором заявлен способ лечения животных от мастита крупного рогатого скота эффективным количеством по меньшей мере одного пиридин-N-оксиддисульфидного соединения. Другой способ тех же авторов раскрыт в патенте США № 4401666, который включен в описание посредством ссылки, где заявлен способ лечения животных от мастита крупного рогатого скота эффективным количеством по меньшей мере одной соли металла пиридин-2-тион-N-оксида. Несмотря на несколько опубликованных способов, все еще остается очень важным найти рентабельные, но эффективные способы использования соединений, отличных от антибиотиков, которые смогли бы, по существу, преодолеть недостатки использованных до настоящего времени антибиотиков и при этом были бы эффективны при лечении и профилактике мастита.

Другим общим заболеванием, поражающим скотопромышленность, являются транспортные лихо-

радки (респираторное заболевание крупного рогатого скота). Респираторные заболевания являются основной причиной потерь мясного скота. Термин "транспортная лихорадка" используют для описания комплекса респираторных заболеваний, наблюдаемых у животных в возрасте 6 месяцев или старше после перевозки или на площадке для откорма скота либо на пастбищах. Стрессы при отлучении от матери, кастрация, удаление рогов, голодная выдержка, чрезмерная скученность, экспонирование инфекционным агентам, изменения кормежки, транспортировка, относящиеся к окружающей среде температурные экстримы и другие причины стрессов, наряду с вирусной, бактериальной, микоплазменной и/или хламидийной инфекциями, составляют комплекс транспортной лихорадки. Перемешивание телят из различных ферм и/или в предпродажных сараях приводит к значительному экспонированию инфекционным агентам. В патенте США № 6497869, который включен в описание посредством ссылки, описаны некоторые первичные инфекционные агенты, которые могут воздействовать на скот. Смешивание популяций может быть наиболее важным провоцирующим фактором, вызывающим транспортную лихорадку, нежели стресс-факторы, хотя заболевание может проходить без перемешивания и без стресс-факторов, обычно резко ухудшающих респираторное заболевание. Попытки уменьшить стрессы при отлучении от матери, при кастрации, при удалении рогов и т.д. и при приучении скота к новому корму за несколько дней или неделю до перевозки иногда бывают успешными (но могут оказаться нерентабельными) для уменьшения случаев транспортной лихорадки. Вакцинация против некоторых инфекционных агентов, принимающих участие в транспортной лихорадке, иногда помогает, но вакцины доступны и эффективны только для нескольких из агентов, которые, как известно, включены в комплекс заболевания.

Общепринято считать, что конечной причиной, вызывающей гибель в большинстве случаев транспортной лихорадки, является бактериальная (обычно *Pasteurella*) пневмония. *Pasteurella haemolytica*, особенно типа IA, является наиболее общей, выделенной из случаев респираторных заболеваний в Северной Америке. Попытки экспериментально воспроизвести бактериальную пневмонию у скота обычно являются безуспешными без сильного стресса и предрасполагающего повреждения респираторного тракта. Обычно принято считать, что во время стресса вирусы, микоплазмы и/или хламидии чаще всего осуществляют начальное повреждение респираторного тракта, что и провоцирует тяжелую бактериальную инфекцию и заболевание.

Вспышка типичного клинического респираторного заболевания обычно начинается в течение нескольких часов или дней по прибытии скота в загон для откорма. Недавно прибывший скот весом в интервале от 180 до 225 кг обычно дает от 10 до 80% заболеваемости и от 1 до 10% смертности или более из-за заболеваний респираторного тракта. Когда проводят анализ сыворотки скота в отношении четырехкратного увеличения антител (серологическая конверсия) и респираторный тракт и его секрецию подвергают микробиологическому выделению, можно идентифицировать мириад этиологических агентов. Можно показать, что многие животные, те, которые больны, и те, которые, по-видимому, здоровы, подверглись инфицированию одним или более из агентов (заболевание респираторного тракта, вероятно, редко связано с только одним инфекционным агентом). Хотя комплекс респираторного заболевания крупного рогатого скота распознается клинически в пункте откорма после прибытия, инфекции, вызывающие клиническое заболевание, по-видимому, начинаются в торговых помещениях, где скот вначале собирают из различных ферм; см. также Bovine Respiratory Disease, Loan, R.W. Texas A&M University Press, 1984, что включено в описание посредством ссылки.

Введение соединения, которое лечит или модулирует возникновение, возврат, длительность и/или тяжесть мастита или респираторного заболевания у скота или другие инфекции у нечеловеческих животных, включая, без ограничения, крупный рогатый скот, птицу, свиней, лошадей, собак и кошек, должно пригодиться в ветеринарии. Примеры таких инфекций включают, без ограничения, неонатальную септицемию у лошадей, пиеропневмонию у свиней и пневмонии у нечеловеческих животных. Такие соединения могут сохранять или модулировать функцию нейтрофилов в организме животных.

Семейство супергенов гормона роста (GH) (Bazan, F. *Immunology Today*, 11: 350-354 (1991); Mott, H.R. and Campbell, I.D. *Current Opinion in Structural Biology*, 5: 114-121 (1995); Silvennoinen, O. и Ihle, J.N. (1996) SIGNALING BY THE NEMATOPHOETIC CYTOKINE RECEPTORS) представляет собой набор белков с аналогичными структурными характеристиками. Каждый член этого семейства белков включает четырехспиральный узел. Хотя до сих пор не обнаружены другие члены указанного семейства, некоторые члены указанного семейства включают следующие: гормон роста, пролактин, плацентарный лактоген, эритропоэтин (ЕРО), тромбопоэтин (ТРО), интерлейкин-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (p35 субъединица), IL-13, IL-15, онкостатин М, цилиарный нейротрофический фактор, ингибирующий лейкемию фактор, альфа-интерферон, бета-интерферон, гамма-интерферон, омега-интерферон, тау-интерферон, эпсилон-интерферон, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и кардиотропин-1 (СТ-1) ("семейство супергенов GH"). Члены семейства супергенов GH обладают аналогичными вторичными и третичными структурами, несмотря на тот факт, что они вообще отличаются ограниченной идентичностью аминокислот или ДНК последовательностей. Общие структурные характеристики позволяют легко идентифицировать новые члены генного семейства. Четырехспиральный узел полипептидов описан в публикации WO 2005/074650, озагла-

ленной "Modified Human Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses", которая полностью включена в описание посредством ссылки.

Член супергенного семейства GH представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) представляет собой один из факторов роста гликопротеинов, известных как колониестимулирующие факторы (CSF), так как они поддерживают пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников. G-CSF стимулируют пролиферацию и дифференцирование специфических клеток-предшественников костного мозга в гранулоциты. Они отличаются от других CSF своей способностью как стимулировать образование колоний нейтрофильных гранулоцитов, так и стимулировать образование колоний нейтрофилов в полутвердом агаре и индуцировать терминальное дифференцирование мышинных миеломоноцитарных лейкоэмических клеток *in vitro*. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор является эффективным стимулом для пролиферации и созревания нейтрофилов *in vivo* (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1987; 84: 2484-2488, см. также Heidari et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 2001; 81:45-57). G-CSF также способны индуцировать функциональную активацию или "прайминг" зрелых нейтрофилов *in vitro* (Weisbart, R.H., Gasson, C.G. и D.W. Golde. Annals of Internal Medicine, 1989; 110:297-303). Было показано, что G-CSF примиряют человеческие гранулоциты и усиливают выделение супероксида, стимулируемое хемотактическим пептидом, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (S. Kitagawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987; 144: 1143-1146 и C.F. Nathan, Blood, 1989; 74:301-306), и активируют фагоцитоз, опосредованный человеческими нейтрофильными IgA (Weisbart, R.H., et al., Nature, 1988; 332: 647-649).

Нейтрофилы являются критическим компонентом защитного механизма хозяина против бактериальных и грибковых инфекций. G-CSF способны индуцировать увеличение абсолютного числа циркулирующих нейтрофилов и усиление функций нейтрофилов.

Были описаны клонирование кДНК и экспрессия рекомбинантных человеческих G-CSF (hG-CSF), было подтверждено, что рекомбинантные hG-CSF проявляют большинство, если не все, биологические свойства природной молекулы (Souza, L. et al. Science, 232, 61-65 (1986)). Анализ последовательностей кДНК и клонов геномной ДНК позволяет дедуктивно определить аминокислотную последовательность и показывает, что указанный белок состоит из 204 аминокислот в длину с сигнальной последовательностью в 30 аминокислот. Зрелый белок состоит из 174 аминокислот в длину и не содержит потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования кроме нескольких возможных сайтов O-связанного гликозилирования.

Клонирование и экспрессия кДНК, кодирующей человеческий G-CSF, были описаны двумя группами (Nagata, S. et al., Nature, 319, 415-418 (1986); Souza, L.M. et al., Science, 232, 61-65 (1986)). В первой работе, посвященной G-CSF кДНК клону, высказано предположение, что зрелый белок состоит из 177 аминокислот в длину. Авторы сообщали, что они также идентифицировали клон кДНК G-CSF, которая кодирует белок, в котором отсутствует участок из трех аминокислот. Эта более короткая форма G-CSF кДНК экспрессирует ожидаемую G-CSF активность. Во втором сообщении описывается кДНК последовательность, идентичная указанной короткой форме, и нет никаких указаний на другие варианты. Так как указанные авторы подтверждают, что короткая кДНК экспрессирует G-CSF с ожидаемым профилем биологической активности, возможно, что это и есть важная форма G-CSF и что более длинная форма является или минорным вариантом сплайсинга, или результатом артефакта клонирования.

Matsumoto et al., in Infection and Immunity, Vol. 55, № 11, p. 2715 (1987) обсуждает защитное действие человеческого G-CSF в отношении микробных инфекций у нейтропеничных мышей.

Следующие патентные публикации относятся к G-CSF: WO 8703689, который включен в описание посредством ссылки, раскрывает гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфические для человеческого G-CSF, и их использование при очистке G-CSF; в WO 8702060, который включен в описание посредством ссылки, раскрыты полипептиды, подобные человеческому G-CSF, и способы их получения; в патенте США № 4810643, который включен в описание посредством ссылки, раскрыты полипептиды, подобные человеческому G-CSF, кодирующие их последовательности и способы их получения; в WO 8604605 и WO 8604506, которые включены в описание посредством ссылки, описан ген, кодирующий человеческий G-CSF, и ингибиторы инфекций, содержащие человеческий G-CSF. Выделение h-GCSF и продуцирование G-CSF в клетках-хозяевах, таких как *E. coli*, раскрыты, например, в патентах США №№ 4810643; 4999291; 5580755 и 6716606, которые включены в описание посредством ссылки.

G-CSF представляет собой фармацевтически активный белок, который регулирует пролиферацию, дифференциацию и функциональную активацию нейтрофильных гранулоцитов (Metcalf, et al. Blood, 67:257 (1986); Yan, et al. Blood, 84(3): 795-799 (1994); Bensinger, et al. Blood, 81(11): 3158-3163 (1993); Roberts, et al., Expt'l Hematology, 22: 1156-1163 (1994); Neben, et al. Blood, 81(7): 1960-1967 (1993); Welte, et al. PNAS-USA, 82: 1526-1530 (1985); Souza, et al. Science, 232: 61-65 (1986) и Gabrilove, J. Seminars in Hematology, 26:2 1-14 (1989)). G-CSF очищают до гомогенности из надосадочной жидкости клеточной культуры клеточной линии карциномы мочевого пузыря человека 5637 (Welte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1985), 82:1526-30). Последовательность кДНК, кодирующая природный hG-CSF, известна из работы Souza et al., Science (1986), 232:61-65. Вследствие альтернативного сплайсинга в указанном втором интроне существуют две природные формы hG-CSF, содержащие 204 или 207 аминокислот, из которых

первые 30 представляют собой сигнальный пептид (Lymphokines, IRL Press, Oxford, Washington D.C., Editors D. Male и С. Rickwood). Было показано, что зрелый белок имеет молекулярную массу около 19 кДа и имеет 5 цистеиновых остатков, которые могут образовывать межмолекулярные или внутримолекулярные дисульфидные мостики. Исследования связывания показали, что hG-CSF связывается с нейтрофильными гранулоцитами. Слабое связывание или его отсутствие наблюдаются с эритроидами, лимфоидными эозинофильными клеточными линиями, так же, как с макрофагами.

У людей эндогенный G-CSF детектируется в плазме крови (Jones et al. *Bailliere's Clinical Hematology*, 2:1 83-111 (1989)). hG-CSF продуцируется фибробластами, макрофагами, Т-клетками, трофобластами, эндотелиальными клетками и эпителиальными клетками и представляет собой продукт экспрессии одной копии гена, включающего четыре эксона и пять интронов, расположенных на хромосоме семнадцать. Транскрипция указанного локуса продуцирует тип мРНК, которая дифференциально процессируется, что приводит к двум формам hG-CSF мРНК, причем одна версия кодирует белок из 177 аминокислот, а другая кодирует белок из 174 аминокислот (Nagata et al. *EMBO J.*, 5: 575-581 (1986)), и было обнаружено, что форма, содержащая 174 аминокислоты, обладает наибольшей специфической *in vivo* биологической активностью. hG-CSF представляют собой виды перекрестноакционноспособные, так что, когда человеческие G-CSF вводят другим млекопитающим, таким как мыши, собаки или обезьяны, вырабатывается устойчивый нейтрофильный лейкоцитоз (Moore, et al. *PNAS-USA*, 84: 7134-7138 (1987)).

G-CSF можно получить и выделить из многих источников. Природные человеческие G-CSF (nhG-CSF) можно выделить из надосадочных жидкостей культивируемых клеточных линий опухолей человека. Создание технологии рекомбинантных ДНК, см., например, патент США № 4810643 (Souza), который включен в описание посредством ссылки, обеспечил получение в промышленных количествах G-CSF в гликозилированной форме как продукт экспрессии эукариотных клеток-хозяев и G-CSF в негликозилированной форме как продукт экспрессии прокариотных клеток-хозяев.

Было обнаружено, что G-CSF можно использовать для лечения таких показаний, при которых увеличение количества нейтрофилов оказывает положительное действие. G-CSF может мобилизовывать стволовые клетки и клетки-предшественники из костного мозга и его используют для лечения пациентов, гранулоциты которых истощены в результате химиотерапии, или как подготовку к трансплантации костного мозга. Например, для больных раком пациентов G-CSF является хорошим средством для селективной стимуляции продуцирования нейтрофилов для компенсации гематопозитического дефицита, возникшего в результате химиотерапии или радиационной терапии. Другие показания включают лечение различных инфекционных заболеваний и родственных состояний, таких как сепсис, которые обычно вызываются за счет метаболизма бактерий. G-CSF можно использовать отдельно или в комбинации с другими соединениями, такими как другие цитокины, для роста или размножения клеток в культуре, например для трансплантатов костного мозга.

G-CSF рецептор (G-CSFR) является членом семейства рецепторов факторов роста гематопозитических цитокинов, которое включает некоторые другие рецепторы факторов роста, такие как рецепторы интерлейкина (IL)-3, -4 и -6 рецепторы, рецепторы гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), рецептор эритропоэтина (ЕРО), также как рецепторы пролактина и гормона роста; см. Vazan, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87: 6934-6938 (1990). Члены семейства рецепторов цитокинов содержат четыре консервативных цистеиновых остатка и мотив триптофан-серин-Х-триптофан-серин, расположенный непосредственно вне трансмембранного участка. Считают, что консервативные последовательности участвуют во взаимодействиях белок-белок; см., например, Chiba et al., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 184: 485-490 (1992). Рецептор G-CSF состоит из одной пептидной цепи с молекулярной массой около 150 кДа (Nicola, *Immunol. Today*, 8 (1987), 134).

Гликозилированный hG-CSF сравнивают с дегликозилированным hG-CSF, полученным *in vitro* в результате ферментативного гидролиза нейраминидазой и эндо- $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазой, в отношении его стабильности как функции pH и температуры (Oh-eda et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265 (20): 11432-35). Дегликозилированный hG-CSF, растворенный в концентрации 1 мкг/мл в 20 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,2 М NaCl и 0,01% Tween 20, быстро инактивируется в интервале значений pH от около 7 до около 8 после двух дней инкубирования при 37°C. Напротив, гликозилированный hG-CSF сохраняет более 80% своей активности в тех же условиях. Кроме того, оценка термостабильности обеих форм hG-CSF, определенная в биологическом анализе и в колориметрическом анализе, показывает, что дегликозилированный hG-CSF был менее термостабилен, чем нативная форма hG-CSF.

Было предпринято несколько попыток получить стабильную фармацевтически приемлемую G-CSF композицию. Одна из попыток повышения стабильности композиции G-CSF включает синтез производных белка. В патенте США № 5665863 раскрыто получение рекомбинантных химерных белков, содержащих G-CSF, соединенных с альбумином, которые обладают новыми фармакокинетическими свойствами. В патентах США №№ 5824784 и 5320840 описано химическое присоединение водорастворимых полимеров к белкам для повышения стабильности и обеспечения защиты против протеолитического разложения и, более конкретно, N-терминально модифицированные G-CSF молекулы, содержащие химически присоединенные полимеры, включая полиэтиленгликоль.

Структуры ряда цитокинов, включая G-CSF (Zink et al., FEBS Lett, 314:435 (1992); Zink et al., Biochemistry, 33:8453 (1994); Hill et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5167 (1993)), GM-CSF (Diederichs, K., et al. Science, 154: 1779-1782 (1991); Walter et al., J. Mol. Biol., 224:1075-1085 (1992)), IL-2 (Bazan, J.F. Science, 257: 410-411 (1992); McKay, D.B. Science, 257: 412 (1992)), IL-4 (Redfield et al., Biochemistry, 30: 11029-11035 (1991); Powers et al., Science, 256:1673-1677 (1992)) и IL-5 (Milburn et al., Nature, 363: 172-176 (1993)), были определены с помощью дифракции рентгеновских лучей и ЯМР исследований и продемонстрировали поразительный консерватизм GH структуры, несмотря на отсутствие существенной гомологичности основной последовательности.

Альтернативный подход к повышению стабильности G-CSF в композиции включает изменение аминокислотной последовательности белка. В патенте США № 5416195 раскрыты генетически сконструированные аналоги G-CSF, обладающие повышенной композиционной стабильностью, где цистеиновый остаток, обычно расположенный в положении 17 цепи зрелого полипептида, остаток аспарагиновой кислоты, расположенный в положении 27, и по меньшей мере один из tandemных остатков пролина, расположенных в положениях 65 и 66, все заменены сериновым остатком. В патенте США № 5773581 раскрыты генетически сконструированные аналоги G-CSF, которые были ковалентно конъюгированы с водорастворимым полимером.

Различные формы человеческого G-CSF, включая их получение и очистку, которые можно использовать в способе лечения или профилактики мастита, подробно раскрыты в патенте США № 4810643, который включен в описание посредством ссылки. В патенте США № 4810643 раскрыты и заявлены новые генные сегменты, биологически функциональные рекомбинантные плазмиды и вирусные ДНК векторы и прокариотные и эукариотные клетки-хозяева, которые содержат G-CSF ген или генетически сконструированный вариант G-CSF гена. Клетки-хозяева экспрессируют биологически активные G-CSF или генетически сконструированный вариант G-CSF. В патентах США № 5849883 и WO 89/10932 раскрыты различные исследования человеческого G-CSF в крупном рогатом скоте. Указанные исследования проводились для оценки респираторных заболеваний (*Pasteurella hemolytica*), реакций на бактериальные заражения (*Klebsiella pneumonia*) или колиформного мастита (*E. coli*) у скота.

В патенте США № 5849883, который полностью включен в описание посредством ссылки, представлен полинуклеотид и полипептидная последовательность зрелого бычьего G-CSF (bG-CSF) и раскрыты способы клонирования, выделения и очистки указанного полипептида и его аналогов. Зрелый bG-CSF состоит из 174 аминокислот в длину (SEQ ID NO: 1) и на 82% гомологичен с hG-CSF. Полипептид bG-CSF с начальным аминокислотным остатком метионином представлен как SEQ ID NO: 2. Полинуклеотидная последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 1, представлена как SEQ ID NO: 3. Полинуклеотидная последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 2, представлена как SEQ ID NO: 4. Heidar et al. описывают экспрессию, очистку и биологическую активность bG-CSF в *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57.

Ковалентное присоединение гидрофильного полимера поли(этиленгликоля), сокращенно ПЭГ, представляет собой способ повышения растворимости в воде, биодоступности, увеличения времени полужизни в сыворотке, повышения времени терапевтической полужизни, модулирования иммуногенности, модулирования биологической активности или продления времени циркуляции многих биологически активных молекул, включая белки, пептиды и особенно гидрофобные молекулы. ПЭГ интенсивно используют в фармацевтических препаратах, в искусственных имплантатах и в других применениях, где важным являются биосовместимость, отсутствие токсичности и отсутствие иммуногенности. Для достижения максимума желательных свойств ПЭГ полная молекулярная масса и гидратационное состояние ПЭГ полимера или полимеров, присоединенных к биологически активной молекуле, должны быть достаточно высоки, чтобы придать выгодные характеристики, обычно связанные с присоединением PEG полимера, такие как повышенная растворимость в воде и увеличение циркуляционного времени полужизни, при этом не оказывая вредного воздействия на биоактивность исходной молекулы.

Производные ПЭГ часто связаны с биологически активными молекулами через реакционноспособные химические функциональности, такие как лизиновый, цистеиновый и гистидиновый остатки, N-конец и углеводные молекулы. Белки и другие молекулы часто имеют ограниченное число реакционноспособных сайтов, доступных для присоединения полимера. Часто сайты, которые наиболее подходят для модификации через присоединение полимера, играют значительную роль в рецепторном связывании и необходимы для сохранения биологической активности молекулы. В результате беспорядочного присоединения полимерных цепей к таким реакционноспособным сайтам биологически активной молекулы часто происходит значительное ослабление или даже полная потеря биологической активности модифицированной полимером молекулы. R. Clark et al. (1996), *J. Biol. Chem.*, 271: 21969-21977. Для создания конъюгатов, обладающих достаточной молекулярной массой полимера для придания необходимых преимуществ мишени молекуле, применявшийся ранее подход обычно состоял в произвольном присоединении множества полимерных ветвей к молекуле, тем самым повышая риск ослабления или даже полной потери биоактивности исходной молекулы.

Реакционноспособные сайты, которые образуют локусы для присоединения производных ПЭГ к белкам, определяются структурой белков. Белки, включая ферменты, состоят из различных последова-



тельностей альфа-аминокислот, которые имеют общую структуру  $H_2N-CHR-COOH$ . Альфа-аминомолекула ( $H_2N-$ ) аминокислоты присоединяется к карбоксильной молекуле ( $-COOH$ ) соседней аминокислоты с образованием амидной связи, что можно представить как  $-(NH-CHR-CO)_n-$ , где подстрочное "n" может принимать значения сотен или тысяч. Фрагмент, представленный как R, может содержать реакционноспособные сайты для биологической активности белка и для присоединения производных ПЭГ.

Например, в случае аминокислоты лизин существует  $-NH_2$  молекула в эpsilon положении, также как в альфа положении. Эpsilon  $-NH_2$  свободен для реакции в условиях щелочных значений pH. Множество работ в области получения производных белка, содержащих ПЭГ, были направлены на создание производных ПЭГ для присоединения к эpsilon  $-NH_2$  молекуле лизиновых остатков, присутствующих в белках. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, p. 1-17. Все указанные производные ПЭГ имеют, однако, общее ограничение, состоящее в том, что их нельзя включить селективно среди множества лизиновых остатков, расположенных на поверхности белков. Это является существенным ограничением в случае, когда лизиновый остаток важен для активности белка, существующей в сайте ферментной активности, например, или в случае, когда лизиновый остаток играет роль в опосредовании взаимодействия белка с другой биологической молекулой, как в случае сайтов рецепторного связывания.

Вторая и одинаково важная сложность существующих способов ПЭГилирования белков состоит в том, что производные ПЭГ могут претерпевать нежелательные побочные реакции с другими остатками, отличающимися от желательных. Гистидин содержит реакционноспособную имино-молекулу, представленную структурно как  $-N(H)-$ , но многие химически реакционноспособные виды, которые реагируют с эpsilon  $-NH_2$ , могут также реагировать с  $-N(H)-$ . Аналогично, боковая цепь аминокислоты цистеина содержит свободную сульфгидрильную группу, представленную структурно как  $-SH$ . В некоторых случаях производные ПЭГ, направленные по  $-NH_2$  группе лизина, также реагируют с цистеиновым, гистидиновым или другими остатками. Это создает сложные, гетерогенные смеси ПЭГ-производных биоактивных молекул и риск нарушения активности биоактивной молекулы, являющейся целью. Было бы желательно создать такие производные ПЭГ, которые позволили бы вводить химически функциональную группу в один сайт в белке, что обеспечило бы селективное присоединение одного или более из ПЭГ полимеров к биоактивной молекуле по специфическим сайтам на поверхности белка, которые являются одновременно хорошо известными и предсказуемыми.

Кроме лизиновых остатков, значительные попытки специалистов были направлены на создание активированных ПЭГ реагентов на другие боковые цепи аминокислот, включая цистеин, гистидин и N-конец; см., например, патент США № 6610281, который включен в описание посредством ссылки, и "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, p. 1-17. Цистеиновый остаток можно вводить сайт-селективно в структуры белков, используя сайт-направленный мутагенез и другие методы, известные специалистам, и полученную свободную сульфгидрильную молекулу можно подвергнуть взаимодействию с производным ПЭГ, которое содержит тиол-реакционноспособные функциональные группы. Такой подход, однако, сложен в том, что введение свободной сульфгидрильной группы может осложнить экспрессию, укладку (фолдинг) и стабильность полученного белка. Поэтому было бы желательно иметь средства для введения химически функциональной группы в биоактивные молекулы, которые обеспечили бы селективное присоединение одного или более из ПЭГ полимеров к белку, который одновременно оставался бы совместимым с (то есть не участвовал бы в нежелательных побочных реакциях с) сульфгидрилами и другими химически функциональными группами, обычно присутствующими в белках.

Как видно из обзора, многие из указанных производных, которые были созданы для присоединения к боковым цепям белков, особенно  $-NH_2$  молекулы на боковой цепи аминокислоты лизина и  $-SH$  молекулы на боковой цепи цистеина, была доказана проблематичность их синтеза и применения. Некоторые образуют нестабильные связи с белком, которые подвержены гидролизу и поэтому разрушаются, или оказываются другим образом нестабильными в водной среде, такой как кровоток. Некоторые образуют более стабильные связи, но подвергаются гидролизу прежде, чем связь образуется, что означает, что реакционноспособная группа на ПЭГ производном может быть инактивирована прежде, чем белок может быть присоединен. Некоторые являются в некоторой степени токсичными и поэтому менее подходящими для применения *in vivo*. Некоторые реагируют слишком медленно, чтобы иметь практическое значение. Некоторые приводят к потере активности белка, присоединяясь к сайтам, ответственным за активность белка. Некоторые не являются специфическими в сайтах, к которым они должны присоединиться, что также может привести к утрате желательной активности и к отсутствию воспроизводимости результатов. Для преодоления проблем, связанных с модифицированием белков молекулами поли(этиленгликоля), были созданы производные ПЭГ, которые были более стабильными (например, см. патент США 6602498, который включен в описание посредством ссылки) или которые селективно реагируют с тиольными молекулами на молекулах и на поверхности (например, см. патент США 6610281, который включен в описание посредством ссылки). Существует настоятельная необходимость в ПЭГ производных, которые были бы химически инертными в физиологической среде до селективной реакции с

образованием стабильных химических связей.

Применение конъюгатов гидроксилалкилкрахмала и, в частности, применение гидроксипропилкрахмала (HES), ковалентно связанного с полипептидом, было раскрыто для потенциального изменения иммуногенности полипептида и/или аллергенности. ПЭГилирование представляет собой альтернативную методику, которая обсуждалась в ряде патентных заявок, принадлежащих Fresenius Kabi A.B., включая патентные публикации США №№ 20050063943, 20060121073, 20010100163, 20050234230, 20050238723, 20060019877, 20070134197, 20070087961, а также патент США № 7285661, причем все они включены в описание посредством ссылки. HES представляет собой модифицированный природный полимер, который был клинически использован в качестве агента, увеличивающего объем плазмы, и ПЭГилирование представляет собой методику присоединения лекарственного вещества к HES производным для модификации характеристик лекарственного вещества, таких как фармакокинетика или растворимость в воде. Характеристики также включают пролонгирование циркуляции белка в плазме за счет повышенной стабильности молекулы и пониженного почечного клиренса, что приводит к повышению биологической активности. Кроме того, могут быть снижены иммуногенность или аллергенность. Изменяя различные параметры, такие как молекулярная масса HES, можно создать широкий круг HES конъюгатов. Тем не менее, гидроксипропилкрахмал имеет недостаток, общий с другими доступными в настоящее время полимерами: их полидисперсность. Полимерные конъюгаты представляют собой смесь молекул с молекулярно-массовым распределением около среднего значения. Такой недостаток гомогенности приводит к низким уровням химической и биохимической характеристики и может предотвратить достижение фармацевтически активным компонентам сайта его действия (рецептора, фермента и т.д.). В таких случаях, чтобы лекарственное средство было активным, необходима его доставка в исходной неконъюгированной форме и таким образом расщепление полимера в метаболических реакциях требуется для его фармацевтической эффективности.

Недавно появились сообщения о совершенно новой методике в науке о белках, которая обещает преодолеть многие из ограничений, связанных с сайт-специфическими модификациями белков. Более конкретно, новые компоненты были добавлены к механизму биосинтеза белков прокариотной *Escherichia coli* (*E. coli*) (например, L. Wang, et al. (2001), *Science*, 292:498-500) и эукариотным *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (например, J. Chin et al., *Science*, 301: 964-7 (2003)), что сделало возможным включение не кодируемой генетически аминокислоты в белки *in vivo*. Ряд новых аминокислот с новыми химическими, физическими или биологическими свойствами, включая метки фотосредства и фотоизомерируемые аминокислоты, фотосшиваемые аминокислоты (см., например, Chin, J.W., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11020-11024 и Chin, J.W., et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124:9026-9027), кето-аминокислоты, аминокислоты, содержащие тяжелые атомы, и гликозилированные аминокислоты, были эффективно и с высокой точностью включены в белки в *E. coli* и в дрожжи в ответ на амбер-кодон, TAG, используя указанную методику; см., например, J.W. Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society*, 124:9026-9027; J.W. Chin, & P.G. Schultz, (2002), *ChemBioChem*, 3(11):1135-1137; J.W. Chin, et al., (2002), *PNAS United States of America*, 99: 11020-11024 и L. Wang, & P.G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Все ссылки полностью включены в описание посредством ссылки. Представленные исследования продемонстрировали, что возможно селективно и рутинно вводить химические функциональные группы, такие как кетонные группы, группы алкина и азидные молекулы, которые не встречаются в белках, которые химически инертны в отношении всех функциональных групп, присутствующих в 20 обычных, генетически кодируемых аминокислотах, и которые можно использовать для селективной и эффективной реакции с образованием стабильной ковалентной связи.

Способность включать не кодируемые генетически аминокислоты в белки позволяет вводить химические функциональные группы, которые могут предоставить альтернативы природным функциональным группам, таким как эпсилон -NH<sub>2</sub> лизина, сульфгидрил -SH цистеина, иминогруппа гистидина и т.д. Известно, что некоторые химические функциональные группы инертны в отношении функциональных групп, присутствующих в 20 обычных, кодируемых генетически аминокислотах, но реагируют точно и эффективно с образованием стабильной связи. Азидные и ацетиленовые группы, например, как известно специалистам, претерпевают реакцию [3+2] циклоприсоединения Хьюсена в присутствии каталитического количества меди; см., например, Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.*, 67:3057-3064 и Rostovtsev, et al. (2002) *Angew. Chem., Int. Ed.*, 41:2596-2599. Путем введения азидной молекулы в структуру белка, например, можно включить функциональную группу, которая химически инертна в отношении аминов, сульфгидрилов, карбоксильных кислот, гидроксильных групп, находящихся в белках, но которая также реагирует хорошо и эффективно с ацетиленовой молекулой с образованием продукта циклоприсоединения. Важно, что в отсутствие ацетиленовой молекулы азид остается химически инертным и неактивным в присутствии других боковых цепей белков и в физиологических условиях.

Настоящее изобретение нацелено, среди прочего, на проблемы, связанные с активностью и продуцированием полипептидов bG-CSF, и также нацелено на получение полипептида bG-CSF с улучшенными биологическими или фармакологическими свойствами и/или повышенным терапевтическим временем полужизни.

### Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены полипептиды bG-CSF, включающие одну или более не кодируемых в природе аминокислот.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает одну или более из посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF связан с линкером, полимером или биологически активной молекулой. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF связан с бифункциональным полимером, бифункциональным линкером или по меньшей мере одним дополнительным полипептидом bG-CSF.

В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота связана с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах указанный водорастворимый полимер включает молекулу поли(этиленгликоля). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота связана с водорастворимым полимером линкером или связана с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах молекула поли(этиленгликоля) является бифункциональным полимером. В некоторых вариантах бифункциональный полимер связан со вторым полипептидом. В некоторых вариантах указанный второй полипептид представляет собой полипептид bG-CSF.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает по меньшей мере две аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, включающим молекулу поли(этиленгликоля). В некоторых вариантах по меньшей мере одна аминокислота представляет собой не кодируемую в природе аминокислоту.

В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений в bG-CSF: перед положением 1 (то есть на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (то есть на карбоксильном конце белка) и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в другом полипептиде bG-CSF).

В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любую из их комбинаций из SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений в bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и любую из их комбинаций (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166 и любую из их комбинаций из SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений bG-CSF: 62, 133 и их комбинаций (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в положение 62 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в положение 133 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах полипептид по настоящему изобретению включает одно или более из природных аминокислотных замещений, добавлений или делеций. В некоторых вариантах одна или более из неприродных аминокислот включена в лидерную или в сигнальную последовательность, которая является N- или C-терминальной в отношении SEQ ID NO: 1, 2 или другой bG-CSF последовательности.

В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: перед положением 1 (то есть на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (то есть на карбоксильном конце белка) и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или у соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2 либо у соответствующих аминокислот в другом полипептиде bG-CSF). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующие

аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 62, 133, 166 и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 62, 133 и их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 62 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующей аминокислотой в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 133 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующей аминокислотой в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в сигнальной или лидерной последовательности N- или C-терминальной относительно SEQ ID NO: 1, 2 или другой bG-CSF последовательности связана с водорастворимым полимером.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют сродство полипептида bG-CSF к рецептору или к связываемому партнеру, включая, без ограничения, белок, полипептид, малые молекулы или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают стабильность полипептида bG-CSF по сравнению со стабильностью соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. Стабильность и/или растворимость можно измерить, используя ряд различных анализов, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие анализы включают, без ограничения, SE-HPLC и RP-HPLC. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют иммуногенность полипептида bG-CSF по сравнению с иммуногенностью соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют время полужизни в сыворотке или время циркуляции полипептида bG-CSF по сравнению со временем полужизни в сыворотке или со временем циркуляции соответствующих bG-CSF без замещения, добавления или делеции.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают водорастворимость полипептида bG-CSF по сравнению с водорастворимостью соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают растворимость полипептида bG-CSF, продуцируемого в клетке-хозяине, по сравнению с растворимостью соответствующих bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают экспрессию полипептида bG-CSF в клетке-хозяине или повышают синтез *in vitro* по сравнению с экспрессией или синтезом соответствующих bG-CSF без замещения, добавления или делеции. Полипептид bG-CSF, включающий такое замещение, сохраняет агонистическую активность и сохраняет или повышает уровни экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают устойчивость протеазы полипептида bG-CSF по сравнению с устойчивостью протеазы соответствующих bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют активность сигнальной трансдукции рецептора по сравнению с активностью рецептора при взаимодействии с соответствующим полипептидом bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют его связывание с другой молекулой, такой как рецептор, по сравнению со связыванием соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют гематопоз по сравнению с гематопозом соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют пролиферацию нейтрофилов по сравнению с пролиферацией нейтрофилов соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые модулируют созревание нейтрофилов по сравнению с созреванием нейтрофилов соответствующих полипептидов bG-CSF без замещения, добавления или делеции.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF включает замещение, добавление или делецию, которые повышают совместимость полипептида bG-CSF с фармацевтическими консервантами (например, w-крезолом, фенолом, бензиловым спиртом) по сравнению с совместимостью соответствующих bG-CSF без замещения, добавления или делеции. Такое повышение совместимости должно обеспечить возможность получения законсервированных фармацевтических композиций, которые сохраняют физико-химические свойства и биологическую активность белка в процессе хранения.

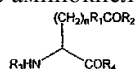
В некоторых вариантах одну или более из сконструированных связей создают с одной или более из

неприродных аминокислот. Внутримолекулярную связь можно создать различными способами, включая, без ограничения, реакцию между двумя аминокислотами в белке в подходящих условиях (одна или обе аминокислоты могут быть неприродными аминокислотами); реакцию двух аминокислот, каждая из которых может быть кодируемой в природе или не кодируемой в природе, с линкером, полимером или другой молекулой в подходящих условиях; и т.д.

В некоторых вариантах одно или более из аминокислотных замещений в полипептиде bG-CSF может осуществляться одной или более из природных или неприродных аминокислот. В некоторых вариантах аминокислотные замещения в полипептиде bG-CSF могут осуществляться природными или неприродными аминокислотами при условии, что по меньшей мере одно замещение происходит не кодируемой в природе аминокислотой. В некоторых вариантах одно или более из аминокислотных замещений в полипептиде bG-CSF происходит одной или более из природных аминокислот и, кроме того, по меньшей мере одно замещение происходит не кодируемой в природе аминокислотой.

В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, группу гидразина, группу гидразида, группу семикарбазида, группу азида или группу алкина.

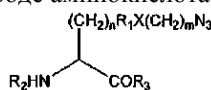
В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает карбонильную группу. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота имеет следующую структуру:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил;  $\text{R}_2$  представляет собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил;  $\text{R}_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую аминоконец; и  $\text{R}_4$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбоксиконец.

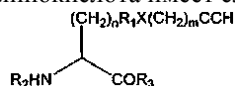
В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает аминооксигруппу. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает группу гидразида. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает группу гидразина. В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты включает группу семикарбазида.

В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты включает группу азида. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота имеет следующую структуру:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или отсутствует;  $\text{X}$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую аминоконец; и  $\text{R}_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбоксиконец.

В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает группу алкина. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота имеет следующую структуру:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил;  $\text{X}$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую аминоконец; и  $\text{R}_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбоксиконец.

В некоторых вариантах полипептид представляет собой агонист, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист полипептида bG-CSF. В некоторых вариантах агонист, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист полипептида bG-CSF включают не кодируемую в природе аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах указанный водорастворимый полимер включает молекулу поли(этиленгликоля). В некоторых вариантах агонист, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист полипептида bG-CSF включают не кодируемую в природе аминокислоту и одну или более из посттрансляционных модификаций, линкеров, полимеров или биологически активных молекул.

В настоящем изобретении также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 3, 4 или нуклеиновыми кислотами, которые кодируют полипептиды SEQ ID NO: 1, 2. В настоящем изобретении также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 3, 4 или полинуклеотидами, которые гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами, которые кодируют полипептиды, представленные как SEQ ID NO: 1, 2, где указанный полинуклеотид включает по меньшей мере один селекторный кодон. В настоящем изобретении также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие полинуклеотид, который кодирует полипептиды, представленные как SEQ ID NO: 1, 2. В настоящем изобретении также предложены выделенные нук-

леиновые кислоты, включающие полинуклеотид, который кодирует полипептиды, представленные как SEQ ID NO: 1, 2 с одной или более из не кодируемых в природе аминокислот. Специалисты в данной области легко поймут, что множество различных полинуклеотидов может кодировать любой полипептид по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах селекторный кодон выбирают из группы, состоящей из янтарного кодона, охра-кодона, опал-кодона, уникального кодона, редкого кодона, пятиосновного кодона и четырехосновного кодона.

В настоящем изобретении также предложены способы получения полипептида bG-CSF, связанного с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах указанный способ включает осуществление контактирования выделенного полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту, с водорастворимым полимером, включающим молекулу, которая реагирует с не кодируемой в природе аминокислотой. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота, включенная в полипептид bG-CSF, является реакционноспособной в отношении водорастворимого полимера, который иначе является не реакционноспособным в отношении любой из 20 обычных аминокислот. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота, включенная в полипептид bG-CSF, является реакционноспособной в отношении линкера, полимера или биологически активной молекулы, которая иначе является не реакционноспособной в отношении любой из 20 обычных аминокислот.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF, объединенный с водорастворимым полимером, получают, осуществляя взаимодействие полипептида bG-CSF, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с молекулой поли(этиленгликоля), включающей аминооксигруппу, группу гидразина, группу гидразида или группу семикарбазида. В некоторых вариантах аминооксигруппа, группа гидразина, группа гидразида или группа семикарбазида связаны с молекулой поли(этиленгликоля) через амидную связь. В некоторых вариантах аминооксигруппа, группа гидразина, гидразида или семикарбазида связаны с молекулой поли(этиленгликоля) через карбаматную связь.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF, связанный с водорастворимым полимером, получают, осуществляя взаимодействие молекулы поли(этиленгликоля), включающей карбонильную группу, с полипептидом, включающим не кодируемую в природе аминокислоту, которая содержит аминооксигруппу, группу гидразина, группу гидразида или группу семикарбазида.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF, связанный с водорастворимым полимером, получают, осуществляя взаимодействие полипептида bG-CSF, включающего алкинсодержащую аминокислоту с молекулой поли(этиленгликоля), включающей азидную молекулу. В некоторых вариантах группа азида или алкина связана с молекулой поли(этиленгликоля) через амидную связь.

В некоторых вариантах полипептид bG-CSF, связанный с водорастворимым полимером, получают, осуществляя взаимодействие полипептида bG-CSF, включающего азидсодержащую аминокислоту с молекулой поли(этиленгликоля), включающей молекулу алкина. В некоторых вариантах группы азида или алкина связаны с молекулой поли(этиленгликоля) через амидную связь.

В некоторых вариантах молекулярная масса молекулы поли(этиленгликоля) составляет величину от около 0,1 до около 100 кДа. В некоторых вариантах молекулярная масса молекулы поли(этиленгликоля) составляет величину от 0,1 до 50 кДа.

В некоторых вариантах молекула поли(этиленгликоля) представляет собой разветвленный полимер.

В некоторых вариантах молекулярная масса каждой ветви разветвленного полимера поли(этиленгликоля) составляет величину от 1 до 100 кДа или от 1 до 50 кДа.

В некоторых вариантах водорастворимый полимер, связанный с полипептидом bG-CSF, включает молекулу полиалкиленгликоля. В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты, включенной в полипептид bG-CSF, включает карбонильную группу, аминооксигруппу, группу гидразида, группу гидразина, группу семикарбазида, группу азида или группу алкина. В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты, включенной в полипептид bG-CSF, включает карбонильную молекулу и водорастворимый полимер включает аминоокси молекулу, молекулу гидразида, гидразина или семикарбазида. В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты, включенной в полипептид bG-CSF, включает молекулу алкина и водорастворимый полимер включает азидную молекулу. В некоторых вариантах остаток не кодируемой в природе аминокислоты, включенной в полипептид bG-CSF, включает азидную молекулу и водорастворимый полимер включает молекулу алкина.

В настоящем изобретении также предложены композиции, включающие полипептид bG-CSF, включающий не кодируемую в природе аминокислоту и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота связана с водорастворимым полимером.

В настоящем изобретении также предложены клетки, включающие полинуклеотид, кодирующий полипептид bG-CSF, включающий селекторный кодон. В некоторых вариантах указанные клетки включают ортогональную РНК синтазу и/или ортогональную тРНК для замещения не кодируемой в природе аминокислоты в полипептид bG-CSF.

В настоящем изобретении также предложены способы получения полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту. В некоторых вариантах указанные способы включают

культивирование клеток, включающих полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие полипептид bG-CSF, ортогональную РНК синтазу и/или ортогональную тРНК, в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида bG-CSF; и выделение полипептида bG-CSF из клеток и/или культуральной среды.

В настоящем изобретении также предложены способы увеличения терапевтического времени полужизни, времени полужизни в сыворотке или времени циркуляции полипептидов bG-CSF. В настоящем изобретении также предложены способы модулирования иммуногенности полипептидов bG-CSF. В некоторых вариантах указанные способы включают замещение не кодируемой в природе аминокислотой любой одной или более из аминокислот в природных полипептидах bG-CSF и/или связывание полипептида bG-CSF с линкером, полимером, водорастворимым полимером или биологически активной молекулой.

В настоящем изобретении также предложены способы лечения нуждающегося в таком лечении пациента эффективным количеством bG-CSF молекул по настоящему изобретению. В некоторых вариантах указанные способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей полипептид bG-CSF, включающий неприродную аминокислоту и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота связана с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF гликозилирован. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF не гликозилирован.

В настоящем изобретении также предложены полипептиды bG-CSF, включающие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, или любую другую полипептидную bG-CSF последовательность, при условии, что по меньшей мере одна аминокислота в ней замещена не кодируемой в природе аминокислотой. В настоящем изобретении также предложены полипептиды bG-CSF, включающие последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, 2. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота связана с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах указанный водорастворимый полимер включает молекулу поли(этиленгликоля). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает карбонильную группу, аминооксигруппу, группу гидразида, группу гидразина, группу семикарбазида, группу азида или группу алкина.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, включающие фармацевтически приемлемый носитель и полипептид bG-CSF, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, или любую другую полипептидную bG-CSF последовательность, в которой по меньшей мере одна аминокислота замещена не кодируемой в природе аминокислотой. В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, включающие фармацевтически приемлемый носитель и G-CSF полипептид, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2. В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота включает сахаридную молекулу. В некоторых вариантах водорастворимый полимер связан с полипептидом через сахаридную молекулу. В некоторых вариантах линкер, полимер или биологически активная молекула связаны с полипептидом bG-CSF через сахаридную молекулу.

В настоящем изобретении также предложен полипептид bG-CSF, включающий водорастворимый полимер, связанный ковалентной связью с полипептидом bG-CSF по одной аминокислоте. В некоторых вариантах водорастворимый полимер включает молекулу поли(этиленгликоля). В некоторых вариантах аминокислота, ковалентно связанная с водорастворимым полимером, является не кодируемой в природе аминокислотой, присутствующей в полипептиде.

В некоторых вариантах по настоящему изобретению полипептид bG-CSF, включающий HES, связанный ковалентной связью с полипептидом bG-CSF, связан по одной аминокислоте. В некоторых вариантах указанная единственная аминокислота, ковалентно связанная с HES, является не кодируемой в природе аминокислотой, присутствующей в полипептиде. В некоторых вариантах по настоящему изобретению полипептид bG-CSF включает множество не кодируемых в природе аминокислот, которые могут быть связаны с множеством HES и/или ПЭГ молекул.

В настоящем изобретении предложен полипептид bG-CSF, включающий по меньшей мере один линкер, полимер или биологически активную молекулу, где указанные линкер, полимер или биологически активная молекула присоединены к указанному полипептиду через функциональную группу не кодируемой в природе аминокислоты, рибосомально включенной в указанный полипептид. В некоторых вариантах указанный полипептид является моноПЭГилированным. В настоящем изобретении также предложен полипептид bG-CSF, включающий линкер, полимер или биологически активную молекулу, которые присоединены к одной или более из не кодируемых в природе аминокислот, где указанные не кодируемые в природе аминокислоты рибосомально включены в полипептид в заранее выбранных сайтах.

В объем настоящего изобретения включены bG-CSF лидерная или сигнальная последовательности, соединенные с кодирующим участком bG-CSF, также как гетерологичная сигнальная последовательность, соединенная с кодирующим участком bG-CSF. Выбранная гетерологичная лидерная или сигнальная последовательность должна быть последовательностью, которая распознается и процессируется, например, системой секреции клетки-хозяина для секретирования и возможного расщепления сигнальной пептидазой клетки-хозяина. Способ лечения состояния или нарушения с использованием bG-CSF по на-

стоящему изобретению подразумевает применение лечения с помощью bG-CSF, содержащего или не содержащего сигнального или лидерного пептида.

В настоящем изобретении предложен способ лечения и профилактики инфекции у животных. В настоящем изобретении также предложен способ лечения и профилактики мастита и транспортной лихорадки крупного рогатого скота. В настоящем изобретении также предложен способ лечения инфекций у животных без создания штамма устойчивых бактерий. Кроме того, в настоящем изобретении предложен очищенный и выделенный полипептид, имеющий часть или всю конформацию первичной структуры и одно или более из биологических свойств природного бычьего G-CSF, и ДНК последовательности, кодирующие такие бычьи G-CSF.

В другом варианте настоящего изобретения один или более из дополнительных колониестимулирующих факторов вводят инфицированному животному с G-CSF, включая, без ограничения, GM-CSF, M-CSF и мульти-CSF (IL-3). CSF вводят вместе или отдельно. В следующем варианте инфекции животных лечат путем введения G-CSF с одним или более из: интерферонов, включая, без ограничения,  $\alpha$ -интерферон, IL2 и TNF, или с традиционными антибиотиками, включая, без ограничения, пенициллин, цефалоспорины и аминогликозиды.

В другом варианте лечение bG-CSF используют в целях профилактики. bG-CSF можно использовать в качестве профилактической обработки для усиления защитных сил животных, которые подвержены риску заражения бактериальной, дрожжевой или грибковой инфекцией. Например, bG-CSF можно использовать в качестве профилактической обработки здоровых животных, подверженных риску заражения инфекцией, включая, без ограничения, пневмонию. Термин "здоровый" в том смысле, как здесь использован, означает животное с нормальным иммунитетом и нормальным количеством и дифференциалом лейкоцитов. Скот лечат профилактически перед транспортировкой или другими ситуациями, которые могут ослабить скот, чтобы повысить их способность побеждать инфекции. Введение bG-CSF можно осуществить в то время, когда скот обрабатывают, то есть вакцинируют, клеймят и т.д. Обработку с помощью bG-CSF можно также осуществить в период "сухостоя" и/или непосредственно перед отелом коровы, чтобы уменьшить возможность внутриматочной инфекции после отела и мастита на ранних стадиях лактации. See Kehrlı et al., Am. J. Vet. Res., 50, No. 2, 207 (1989); Oliver et al., J. Dairy Sci., 71: 2584-2606 (1988) и Kehrlı et al., J. Dairy Sci. 74:4399-4412 (1991) для описания функций бычьих нейтрофилов на протяжении периода отела. Обычно обработку антибиотиками не осуществляют непосредственно перед отелом из-за остатков, которые могут появиться в коровьем молоке, делая его непригодным для использования.

В другом варианте конъюгирование полипептида bG-CSF, включающего одну или более из природных аминокислот, с другой молекулой, включая, без ограничения, ПЭГ, позволяет получить, по существу очищенный bG-CSF благодаря уникальной химической реакции, используемой для конъюгирования с неприродной аминокислотой. Конъюгирование bG-CSF, включающего одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, с другой молекулой, такой как ПЭГ, можно осуществить, используя другие методики очистки, осуществляемые перед или после стадии конъюгирования, получая практически чистые bG-CSF.

#### Краткое описание чертежей

- На фиг. 1 изображена плаزمида, используемая для экспрессии bG-CSF;
- на фиг. 2 представлены подробности, касающиеся клеточной линии хозяина, используемой для экспрессии bG-CSF;
- на фиг. 3 представлен SDS PAGE анализ экспрессии полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению;
- на фиг. 4 представлен SDS PAGE анализ пиковых фракций CM FF колонки для bG-CSF перед ПЭГилированием;
- на фиг. 5 представлен SDS-PAGE анализ пиковых фракций SP HP колонки для ПЭГилированного bG-CSF-T133pAF;
- на фиг. 6 представлен SDS-PAGE анализ b-GCSF до и после ПЭГилирования;
- на фиг. 7a представлен трипсин/Glu-C гидролизат дикого типа bG-CSF (детектирование на 214 нм);
- на фиг. 7b представлен трипсин/Glu-C гидролизат bG-CSF T133pAF (детектирование на 214 нм);
- на фиг. 8a представлен трипсин/Glu-C гидролизат дикого типа bG-CSF (детектирование на 250 нм);
- на фиг. 8b представлен трипсин/Glu-C гидролизат bG-CSF T133pAF (детектирование на 250 нм);
- на фиг. 9a представлен Glu-C гидролизат дикого типа bG-CSF (детектирование на 214 нм);
- на фиг. 9b представлен Glu-C гидролизат bG-CSF T133pAF (детектирование на 214 нм);
- на фиг. 10a представлен Glu-C гидролизат дикого типа bG-CSF (250 нм детектирование);
- на фиг. 10b представлен Glu-C гидролизат bG-CSF T133pAF (250 нм детектирование);
- на фиг. 11 представлен SEC-ВЭЖХ анализ ПЭГилированного полипептида bG-CSF;
- на фиг. 12 представлен SEC-ВЭЖХ анализ полипептида bG-CSF;
- на фиг. 13 представлены необработанные EC50 значения, полученные в M-NFS60 пролиферационном анализе 20К ПЭГилированных бычьих G-CSF T133pAF и дикого типа;
- на фиг. 14 представлены кратные EC50 различия в M-NFS60 пролиферационном анализе 20К ПЭ-



Гирированных бычьих G-CSF T133pAF относительно дикого типа;

на фиг. 15 представлены результаты эксперимента анализа бычьих нейтрофилов, окрашенных CD11b антителом;

на фиг. 16 представлены результаты введения ПЭГирированных bG-CSF в отношении ANC;

фиг. 17 - линейный график, демонстрирующий абсолютное количество нейтрофилов (среднее  $\pm$  ст.откл., ошибка) у телят, обработанных или буфером для лекарственного средства, или ПЭГирированным bG-CSF после одной подкожной инъекции в дозе 40 мкг/кг;

фиг. 18 - линейный график, демонстрирующий среднее дневное производство молока коровами из примера 40 мкг/кг.

фиг. 19 - столбиковая диаграмма, демонстрирующая различия в количестве соматических клеток в дни 3, 5, 7 и 10 после отела между четырьмя группами коров, включая контрольную группу, группу, обработанную неПЭГирированными bG-CSF при ежедневной обработке, группу, инъецированную ПЭГирированными bG-CSF в дозе 40 мкг/кг, и группу, инъецированную ПЭГирированными bG-CSF в дозе 20 мкг/кг.

### Определения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными, раскрытыми здесь методами, протоколами, клеточными линиями, конструкциями и реагентами и, как таковые, они могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология приведена только для целей описания конкретных вариантов и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, которое должно быть ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

В описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если только в контексте нет четких указаний на обратное. Так, например, ссылки на "bGCSF", "бычий G-CSF", "bG-CSF", "бычий G-CSF полипептид" или "полипептид bG-CSF" и различные формы с дефисом или без дефиса являются ссылкой на один или более из таких белков и включают их эквиваленты, известные специалистам в данной области и т.д.

Если не определено иначе, все использованные технические и научные термины имеют те же самые значения, которые обычно подразумевают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя можно использовать любые способы, устройства и материалы аналогичные или эквивалентные раскрытым здесь в практике или тестировании настоящего изобретения, далее будут раскрыты предпочтительные методы, устройства и материалы.

Все упомянутые в описании публикации и патенты включены посредством ссылки с целью описания и раскрытия, например, конструкций и методологий, которые раскрыты в публикациях, которые можно использовать в связи с раскрытым настоящим изобретением. Обсуждаемые здесь публикации предложены исключительно для их раскрытия перед датой подачи рассматриваемого изобретения. Ничего из приведенного здесь не следует толковать, как допущение того, что авторы изобретения не полномочны датировать задним числом такое раскрытие на основании более раннего изобретения или по какому-либо другим причинам.

Термин "по существу очищенный" относится к полипептиду bG-CSF, который может, по существу, или практически не содержать компонентов, которые обычно сопутствуют белку или взаимодействуют с белком, как это происходит в его природном окружении, то есть природных клеток, или клеток-хозяев в случае рекомбинантно получаемых полипептидов bG-CSF. Полипептиды bG-CSF, которые могут практически не содержать клеточного материала, включают препараты белка, содержащие менее чем около 30, менее чем около 25, менее чем около 20, менее чем около 15, менее чем около 10, менее чем около 5, менее чем около 4, менее чем около 3, менее чем около 2 или менее чем около 1% (в расчете на сухой вес) загрязняющего белка. Если полипептид bG-CSF или его вариант рекомбинантно получен с использованием клетки-хозяина, указанный белок может присутствовать в количестве около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1% или меньше в расчете на сухой вес клетки. Если полипептид bG-CSF или его вариант рекомбинантно получен с использованием клетки-хозяина, указанный белок может присутствовать в культуральной среде в концентрации около 5, около 4, около 3, около 2, около 1 г/л, около 750, около 500, около 250, около 100, около 50, около 10 или около 1 мг/л или меньше в расчете на сухой вес клетки. Так, "по существу очищенный" полипептид bG-CSF, полученный указанными способами настоящего изобретения, может иметь степень чистоты по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70%, особенно степень чистоты по меньшей мере около 75, 80, 85% и более конкретно степень чистоты по меньшей мере около 90, степень чистоты по меньшей мере около 95, степень чистоты по меньшей мере около 99% или больше, что определено соответствующими способами, такими как SDS/PAGE анализ, RP-HPLC, SEC и капиллярный электрофорез.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" или "клетка-хозяин" относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от использованного способа встраивания, например прямого захвата, трансдукции, f-скрещивания, или других способов, известных специалистам в данной области для создания рекомбинантной клетки-хозяина. Экзогенный полинуклеотид можно сохранять как неин-

тегрированный вектор, например плазмиду, или, альтернативно, можно интегрировать в геном хозяина.

Термин "среда" или "среды" включает любую культуральную среду, раствор, твердую, полутвердую или жесткую подложку, которая может поддерживать или содержать любую клетку-хозяина, включая бактериальные клетки-хозяева, дрожжевые клетки-хозяева, клетки-хозяева насекомых, растительные клетки-хозяева, эукариотные клетки-хозяева, клетки-хозяева млекопитающих, СНО клетки, прокариотные клетки-хозяева, *E. coli* или *Pseudomonas* клетки-хозяева, и содержание клеток. Таким образом, термин может включать среду, в которой клетка-хозяин выращивалась, например среду, в которую полипептид bG-CSF был секретирован, включая среду как до, так и после стадии пролиферации. Указанный термин может также включать буферы или реагенты, которые содержат лизаты клетки-хозяина, такие как в случае, когда полипептид bG-CSF продуцируется внутриклеточно, и клетки-хозяева подвергаются лизису или разрушению для выделения полипептида bG-CSF.

Термин "восстанавливающий агент" в отношении рефолдинга белка определяют как любое соединение или материал, которые сохраняют сульфгидрильные группы в восстановленном виде и восстанавливают внутри- или межмолекулярные дисульфидные связи. Подходящие восстанавливающие агенты включают, без ограничения, дитиотреитол (DTT), 2-меркаптоэтанол, дитиозритритол, цистеин, цистеамин (2-аминоэтантол) и восстановленный глутатион. Специалистам в данной области легко понять, что для использования в указанных способах и композициях настоящего изобретения можно использовать широкий круг восстанавливающих агентов.

Термин "окисляющий агент" в отношении рефолдинга белка определяют как любое соединение или материал, которые способны удалять электрон из соединения, которое окисляют. Подходящие окисляющие агенты включают, без ограничения, окисленный глутатион, цистеин, цистамин, окисленный дитиотреитол, окисленный эритреитол и кислород. Специалистам в рассматриваемой области должно быть очевидно, что для использования в указанных способах настоящего изобретения можно использовать широкий круг окисляющих агентов.

Термин "денатурирующий агент" или "денатурант" определяют как любое соединение или материал, которые вызывают обратимое разворачивание (unfolding) белка. Эффективность денатурирующего агента или денатуранта определяется как свойствами, так и концентрацией конкретного денатурирующего агента или денатуранта. Подходящие денатурирующие агенты или денатуранты могут быть хаотропными агентами (chaotropes), детергентами, органическими растворителями, смешивающимися с водой растворителями, фосфолипидами или комбинацией двух или более таких агентов. Подходящие хаотропные агенты включают, без ограничения, мочевины, гуанидин и тиоцианат натрия. Подходящие детергенты могут включать, без ограничения, сильные детергенты, такие как натрийдодецилсульфат, или полиоксизетиленовые эфиры (например, детергенты Tween или Triton), саркозил, мягкие неионные детергенты (например, дигитонин), мягкие катионные детергенты, такие как N $\rightarrow$ 2,3-(Dioleyoxy)-пропил-N,N,N-триметиламмоний, мягкие ионные детергенты (например, натрийхолат или натрийдеоксихолат) или цвиттерсионные детергенты, включая, без ограничения, сульфобетаины (Zwittergent), 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфат (CHAPS) и 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-2-гидрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO). Органические смешивающиеся с водой растворители, такие как ацетонитрил, низшие спирты (особенно C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> спирты, такие как этанол или изопропанол) или низшие алкандиолы (особенно C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> алкандиолы, такие как этиленгликоль), можно использовать в качестве денатурантов. Фосфолипиды, которые можно использовать в настоящем изобретении, могут быть природными фосфолипидами, такими как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол, или синтетическими производными или вариантами фосфолипидов, такими как дигексаноилфосфатидилхолин или дигептаноилфосфатидилхолин.

Термин "рефолдинг" описывает любой процесс, реакцию или способ, которые трансформируют полипептиды, содержащие дисульфидную связь, из неправильного складчатого или не складчатого состояния в природную или правильную складчатую конформацию относительно дисульфидных связей.

Термин "кофолдинг" относится специально к процессам рефолдинга, реакциям или способам, в которых используют по меньшей мере два полипептида, которые взаимодействуют друг с другом и в результате происходит трансформация развернутого полипептида или полипептида с неправильной укладкой в природный, с правильной укладкой полипептид.

Термины "гранулоцитарный колониестимулирующий фактор" или "G-CSF" включают такие полипептиды и белки, которые обладают по меньшей мере одной биологической активностью G-CSF (такие как те, что раскрыты в патентах США №№ 6716606; 6689351; 6565841; 6162426; 5811301; 5776895; 5718893; 5580755; 5536495; 5202117; 5043156; 4999291; 4810643 и 4968618 для hG-CSF, которые включены в описание посредством ссылки), также как G-CSF аналоги, G-CSF изоформы, G-CSF миметики, G-CSF фрагменты, гибридные G-CSF белки, олигомеры и мультимеры гибридных белков, гомологи, варианты схем гликозилирования и мутеины, независимо от их биологической активности и, кроме того, независимо от их способа синтеза или получения, включая, без ограничения, рекомбинантные (независимо от того, получены они из кДНК, геномной ДНК, синтетической ДНК или других форм нуклеиновой кислоты), синтетические, трансгенные и активирующие гены способы. Конкретные примеры G-CSF вклю-

чают, без ограничения, ПЭГфилграстим (NEULASTA®), филграстим (NEUPOGEN®), аналог G-CSF, мутант G-CSF, измененный гликозилированный G-CSF и конъюгированные с ПЭГ G-CSF аналоги. Конкретные примеры клеточных линий, модифицированных для экспрессии эндогенных человеческих G-CSF, раскрыты у Devlin et al., J. Leukoc. Biol., 41:306 (1987); в патентах США №№ 6716606; 6379661; 6004548; 5830705; 5582823; 4810643 и 6242218, которые включены в описание посредством ссылки.

Термины "бычий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор", "бычья G-CSF" или "bG-CSF" включают такие полипептиды и белки, которые обладают по меньшей мере одной биологической активностью bG-CSF, также как bG-CSF аналоги, bG-CSF изоформы, bG-CSF миметики, bG-CSF фрагменты, гибридные bG-CSF белки, олигомеры и мультимеры гибридных белков, гомологи, варианты схем гликозилирования и мутеины, независимо от их биологической активности и, кроме того, независимо от их способа синтеза или получения, включая, без ограничения, рекомбинантные (независимо от того, получены они из кДНК, геномной ДНК, синтетической ДНК или других форм нуклеиновой кислоты), синтетические, трансгенные и активирующие гены способы. Конкретные примеры G-CSF включают, без ограничения, bG-CSF мутанты, измененные гликозилированные G-CSF и конъюгированные с ПЭГ G-CSF аналоги.

Термины "бычий G-CSF (bG-CSF)" или "полипептид bG-CSF" относятся к бычьему гранулоцитарному колониестимулирующему фактору или G-CSF, как раскрыто выше, так же, как к полипептиду, который сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность природных bG-CSF. Полипептиды bG-CSF включают фармацевтически приемлемые соли и пролекарства, пролекарства солей, полиморфы, гидраты, сольваты, биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры природных бычьих G-CSF, так же, как варианты агонистов, миметиков и антагонистов природных бычьих G-CSF и их гибридных полипептидов. Примеры полипептидов bG-CSF и миметиков включают те, что раскрыты в WO 89/10932, в патентах США №№ 5849883 и 6497869, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте. Гибриды, включающие добавленные аминокислоты у аминоконца, карбоксильного конца или с обоих концов, охватывают термин "полипептид bG-CSF". Примеры гибридов включают, без ограничения, метионил bG-CSF, в котором метионин связан с N-концом bG-CSF (такой как полипептид в SEQ ID NO: 2), полученный в результате рекомбинантной экспрессии зрелой формы bG-CSF, гибриды для целей очистки (включая, без ограничения, полигистидин или родственные эпитопы), гибриды с пептидами, связывающими сывороточный альбумин, и гибриды с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин. Природная bG-CSF нуклеиновая кислота и аминокислотные последовательности для полной длины и зрелых форм известны так же, как варианты, такие как варианты отдельных аминокислот и варианты сплайсинга. Для аминокислотной последовательности зрелого bG-CSF так же, как для аминокислотной последовательности метионил bG-CSF, см. здесь SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие hG-CSF мутанты и мутантные hG-CSF полипептиды, также известны.

Бычий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор или bG-CSF обладает различными биологическими активностями, включая, без ограничения, связывание со своим рецептором, иницирование димеризации своего рецептора, стимулирование продуцирования нейтрофилов и стимулирование клеточной пролиферации и дифференциации. Примеры некоторых из биологических активностей гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и hG-CSF раскрыты выше и в патентах США №№ 6676947; 6579525; 6531121; 6521245; 6489293; 6368854; 6316254; 6268336; 6239109; 6165283; 5986047; 5830851; 5043156 и 577569, которые включены в описание посредством ссылки.

Термины "бычий G-CSF полипептид", "полипептид bG-CSF", "бычий G-CSF" или "bG-CSF" и написанные через дефис или без дефиса, их формы включают такие полипептиды и белки, которые обладают по меньшей мере одной биологической активностью CSF, их bG-CSF аналогов, bG-CSF мутантов, измененных гликозилированных bG-CSF, конъюгированных с ПЭГ bG-CSF, bG-CSF изоформ, bG-CSF миметиков, bG-CSF фрагментов, гибридных bG-CSF белков, гибридных белков, олигомеров и мультимеров, гомологов, вариантов схем гликозилирования, вариантов сплайсинга и мутеинов, независимо от их биологической активности и, кроме того, независимо от указанного способа их синтеза или получения, включая, без ограничения, рекомбинантные (независимо от того, получены он из кДНК, геномной ДНК, синтетической DNA или других форм нуклеиновой кислоты), *in vitro*, *in vivo*, путем микроинъекций молекул нуклеиновой кислоты, синтетически, трансгенно и активированием генов, способы. Термины "бычий G-CSF полипептид", "полипептид bG-CSF", "бычья G-CSF" или "bG-CSF" охватывают полипептиды bG-CSF, включающие одно или более из аминокислотных замещений, добавлений или делеций; см. патент США № 5849883, который включен в описание посредством ссылки, для аналогов бычьего G-CSF.

Описаны замещения в большом разнообразии положений аминокислот в bG-CSF. Замещения, включая, без ограничения, такие, которые модулируют фармацевтическую стабильность, повышают агонистическую активность, повышают устойчивость к протеазам, превращают полипептид в антагониста и т.д., включены в термины "полипептид bG-CSF", "бычий G-CSF полипептид", "бычий G-CSF" или "bG-CSF".

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты белки, векторы экспрессии, содержащие варианты нуклеиновых кислот,

клетки-хозяева, включающие варианты нуклеиновых кислот и/или векторы экспрессии, и способы получения вариантов белков. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения инфекции путем введения животному варианту белка обычно вместе с фармацевтическим носителем в терапевтически эффективном количестве.

bG-CSF мутанты обсуждаются в патенте США № 5849883, который включен в описание посредством ссылки во всей своей полноте, и включают полипептиды, сконструированные с оптимизацией кода для *E. coli* и гибридных белков, созданных с бычьими и человеческими G-CSF последовательностями. В патенте США № 5416195, который включен в описание посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыты hG-CSF мутанты, в которых было произведено по меньшей мере одно из следующих аминокислотных замещений (нумерация аминокислот дается в соответствии со зрелым белком; поэтому, если присутствует N-концевой метионин, ему приписывается положение -1 или 0): Cys17 природной последовательности заменен на Ser17 остаток, Asp27 природной последовательности заменен на Ser27 остаток, Leu15 природной последовательности заменен на Glu15 остаток, Lys23 природной последовательности заменен на Arg23 остаток, Gly28 природной последовательности заменен на Ala28 остаток, Lys40 природной последовательности заменен на Arg40 остаток, Pro44 природной последовательности заменен на Ala44 остаток, Leu49 природной последовательности заменен на Lys49 остаток, Gly55 природной последовательности заменен на Ala55 остаток, Cys60 природной последовательности заменен на Ser60 остаток, Pro111 природной последовательности заменен на Glu111 остаток, Thr115 природной последовательности заменен на Ser115 остаток и Tyr165 природной последовательности заменен на Arg165 остаток. Многие из указанных остатков присутствуют в bG-CSF последовательности, и одно или более из указанных замещений можно обнаружить в полипептиде bG-CSF настоящего изобретения. Carter et al. *Biologicals* (2004), 32:37 описывают мутантные hG-CSF, у которых отсутствуют сайты гликозилирования. Аналогичные мутации можно найти в полипептидах bG-CSF настоящего изобретения.

В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению, по существу, идентичны SEQ ID NO: 1, 2 или любой другой последовательности полипептида bG-CSF. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды bG-CSF, включая мутанты и способы экспрессии и выделения полипептидов bG-CSF, хорошо известны.

Термин "полипептид bG-CSF" также включает фармацевтически приемлемые соли и пролекарства и пролекарства солей, полиморфы, гидраты, сольваты, биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры природных bG-CSF так же, как агонисты, миметики и антагонисты природных bG-CSF и гибридных полипептидов. Белки слияния, включающие добавления аминокислот у аминоконца, карбоксильного конца или у обоих концов, включены в термин "полипептид bG-CSF". Примеры слияний включают, без ограничения, например, метионин bG-CSF, в котором метионин связан с N-концом bG-CSF, полученного в результате рекомбинантной экспрессии зрелой формы bG-CSF без лидерного или сигнального пептида или его части (метионин связан с N-концом bG-CSF в результате рекомбинантной экспрессии), белки слияния, для целей очистки (включая, без ограничения, полигистидин или родственные эпитопы), белки слияния с пептидами, связывающимися сывороточный альбумин, и белки слияния с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин. В патенте США № 5750373, который включен в описание посредством ссылки, раскрыт способ селекции новых белков, таких как гормон роста и вариантов фрагментов антител с измененными свойствами связывания в отношении их соответствующих рецепторных молекул. Указанный способ включает слияние гена, кодирующего представляющий интерес белок, с карбоксиконцевым доменом гена III белка оболочки нитчатого бактериофага M13. Химерные молекулы включают bG-CSF одну или более из других молекул. Химерная молекула может содержать специфические участки или фрагменты одной или обеих из bG-CSF и другой молекулы (молекул). Любые такие фрагменты можно получить из белков стандартными биохимическими методами или осуществляя экспрессию полинуклеотида, кодирующего фрагмент bG-CSF, или его фрагмент можно получить как белок слияния, включающий человеческий сывороточный альбумин (HSA), Fc или его часть. Такие конструкции слияния пригодны для повышения экспрессии bG-CSF или его фрагмента в эукариотной клетке-хозяине. Примеры HSA частей включают N-концевой полипептид (аминокислоты 1-369, 1-419 и участки промежуточной длины, начинающиеся с аминокислоты 1), как раскрыто в патенте США № 5766883 и в публикации WO 97/24445, которые включены в описание посредством ссылки. Другие химерные полипептиды могут включать HSA белок с bG-CSF или его фрагментами, присоединенными к каждому из C-конца и N-конца HSA. Другие белки слияния можно создать путем слияния bG-CSF с а) Fc частью иммуноглобулина; б) аналогом Fc части иммуноглобулина и в) фрагментами Fc части иммуноглобулина.

В различных ссылках раскрыты модификации полипептидов конъюгированием с полимером или гликозилированием. Термин "полипептид bG-CSF" включает полипептиды, конъюгированные с полимером, таким как ПЭГ, и могут включать одно или более из дополнительных производных цистеина, лизина или других остатков. Кроме того, полипептид bG-CSF может включать линкер или полимер, где аминокислота, с которой конъюгируют указанные линкер или полимер, может быть неприродной аминокислотой в соответствии с настоящим изобретением или может быть конъюгирована с кодируемой в природе аминокислотой с использованием методик, известных специалистам, таких как присоединение к ли-

зину или цистеину.

Имеются сообщения о модификации полипептидов полимерами. IFN $\beta$  упоминается как один из примеров полипептида, принадлежащего к суперсемейству гормонов роста. В WO 00/23114 раскрыт гликозилированный и ПЭГилированный IFN $\beta$ . В WO 00/23472 раскрыты IFN $\beta$  гибридные белки. В патенте США № 4904584 раскрыты полипептиды, обедненные ПЭГилированным лизином, где по меньшей мере один лизиновый остаток был удален или заменен любым другим аминокислотным остатком. В WO 99/67291 раскрыт процесс конъюгирования белка с ПЭГ, где по меньшей мере один аминокислотный остаток в белке удаляют и осуществляют контактирование полученного белка с ПЭГ в условиях, достаточных для достижения конъюгирования с белком. В WO 99/03887 раскрыты ПЭГилированные варианты полипептидов, принадлежащих к суперсемейству гормонов роста, где цистеиновый остаток был замещен остатком несущественной аминокислоты, расположенным в специфическом участке указанного полипептида. В WO 00/26354 раскрыт способ получения гликозилированного полипептидного варианта с пониженной аллергенностью, который по сравнению с соответствующим исходным полипептидом включает по меньшей мере один дополнительный сайт гликозилирования. В патенте США № 5218092, который включен в описание посредством ссылки, раскрыта модификация гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и других полипептидов для введения по меньшей мере одной дополнительной углеводной цепочки по сравнению с природным полипептидом.

Термин "полипептид bG-CSF" также включает гликозилированные bG-CSF, такие как, без ограничения, полипептиды, гликозилированные по любому аминокислотному положению, N-связанная или O-связанная формы гликозилирования полипептида. Варианты, содержащие единственное нуклеотидное изменение, также рассматриваются как биологически активные варианты полипептида bG-CSF. Варианты, содержащие одно нуклеотидное изменение, также рассматриваются как биологически активные варианты bG-CSF. Кроме того, включены также варианты сплайсинга. Термин "полипептид bG-CSF" также включает bG-CSF гетеродимеры, гомодимеры, гетеромультимеры или гомомультимеры любого одного или более из bG-CSF или любого другого полипептида, белка, углевода, полимера, малой молекулы, линкера, лиганда или другой активной молекулы любого типа, связанной химически или экспрессированной как гибридный белок (см. патенты США №№ 6261550; 6166183; 6204247; 6261550; 6017876, которые включены в описание посредством ссылки), также как аналоги полипептидов, содержащие, например, специфические делеции или другие модификации, но все еще сохраняя биологическую активность (патенты США №№ 6261550; 6004548; 6632426, которые включены в описание посредством ссылки).

Все ссылки на положения аминокислот в описанных здесь bG-CSF основаны на положениях в SEQ ID NO: 1, если не указано иначе (то есть если не указывается, что сравнение основано на SEQ ID NO: 2 или другой bG-CSF последовательности). Например, аминокислота в положении 1 SEQ ID NO: 1 представляет собой треонин и соответствующий треонин расположен в SEQ ID NO: 2 у положения 2. Специалистам в данной области должно быть понятно, что положения аминокислот, соответствующие положению в SEQ ID NO: 1, можно легко идентифицировать в любой другой bG-CSF молекуле, такой как SEQ ID NO: 2. Специалистам в данной области должно быть понятно, что положения аминокислот, соответствующие положению в SEQ ID NO: 1, 2 или в любой другой bG-CSF последовательности, можно легко идентифицировать в любой другой bG-CSF молекуле, такой как bG-CSF гибриды, варианты, фрагменты и т.д. Например, программу выравнивания последовательностей, такую как BLAST, можно использовать для выравнивания и определения конкретного положения в белке, которое соответствует положению в SEQ ID NO: 1, 2, или в других bG-CSF последовательностях. Замещения, делеции или добавления аминокислот, раскрытые здесь со ссылкой на SEQ ID NO: 1, 2, или другие bG-CSF последовательности относятся также к замещениям, делециям или добавлениям в соответствующие положения в bG-CSF гибридах, вариантах, фрагментах и т.д., раскрытых здесь или известных специалистам, и естественно включены в настоящее изобретение.

Термин "полипептид bG-CSF" или "bG-CSF" включает полипептиды bG-CSF, включающие одно или более из аминокислотных замещений, добавлений или делеций. Полипептиды bG-CSF настоящего изобретения включают модификации с одной или более из природных аминокислот вместе с одной или более из неприродных аминокислотных модификаций. Были описаны примеры замещений в широком круге положений аминокислот в природных bG-CSF полипептидах, включая, без ограничения, замещения, которые модулируют фармацевтическую стабильность, которые модулируют одну или более из биологических активностей полипептида bG-CSF, такие как те, без ограничения, что повышают агонистическую активность, повышают растворимость полипептида, уменьшают протеазную восприимчивость, превращают полипептид в антагониста и т.д. и включены в термин "полипептид bG-CSF". В некоторых вариантах bG-CSF антагонист включает не кодируемую в природе аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером, который присутствует в участке связывания рецептора bG-CSF молекулы.

В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF далее включают добавление, замещение или делецию, которые модулируют биологическую активность полипептида bG-CSF. В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF далее включают добавление, замещение или делецию, которые модулируют проли-

ферацию нейтрофилов, функцию и/или дифференциацию полипептида bG-CSF. Например, добавления, замещения или делеции могут модулировать одно или более из свойств или активностей bG-CSF. Например, добавления, замещения или делеции могут модулировать сродство к рецептору, модулируют время полужизни в циркуляции, модулируют терапевтическое время полужизни, модулируют стабильность полипептида, модулируют расщепление протеазами, модулируют дозу, модулируют выделение или биодоступность, облегчают очистку или улучшают или изменяют способ введения. Аналогично, полипептиды bG-CSF могут включать последовательности расщепления протеазой, реакционноспособные группы, связывающие антитело домены (включая, без ограничения, FLAG или поли-His) или другие основанные на сродстве последовательности (включая, без ограничения, FLAG, поли-His, GST и т.д.) либо связанные молекулы (включая, без ограничения, биотин), которые улучшают детектирование (включая, без ограничения, GFP), очистку или другие характеристики полипептида.

Термин "полипептид bG-CSF" также включает гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры и гетеромультимеры, которые связаны, включая, без ограничения, непосредственно через боковые цепи не кодируемых в природе аминокислот, с боковыми цепями или той же самой или другой не кодируемой в природе аминокислоты, с боковым цепям кодируемой в природе аминокислоты или непосредственно через линкер. Примеры линкеров включают, без ограничения, малые органические соединения, водорастворимые полимеры различной длины, такие как поли(этиленгликоль) или полидекстран, или полипептиды различной длины.

Термин "не кодируемая в природе аминокислота" относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот или пирролизином либо селеноцистеином. Другими терминами, которые можно использовать синонимично с термином "не кодируемая в природе аминокислота", являются термины "неприродная аминокислота", "ненатуральная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и различные их варианты с дефисом или без него. Термин "не кодируемая в природе аминокислота" также включает, без ограничения, аминокислоты, которые возникают в результате модификаций (например, пост-трансляционных модификаций) кодируемой в природе аминокислоты (включая, без ограничения, 20 обычных аминокислот или пирролизин и селеноцистеин), но сами не являются природно включенными в растущую полипептидную цепь трансляционным комплексом. Примеры таких неприродно возникших аминокислот включают, без ограничения, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

Термин "аминоконец модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которую можно присоединить к аминоконцу полипептида. Аналогично, термин "карбоксиконец модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которую можно присоединить к карбоксиконцу полипептида. Модифицирующие концы группы включают, без ограничения, различные водорастворимые полимеры, пептиды или белки, такие как сывороточный альбумин или другие молекулы, которые повышают время полужизни пептидов в сыворотке.

Термины "функциональная группа", "активная молекула", "активирующая группа", "отщепляемая группа", "реакционноспособный сайт", "химически реакционноспособная группа" и "химически реакционноспособная молекула", которые используют специалисты и которые использованы здесь для обозначения различных, определяемых участков или звеньев в молекуле. Термины в некотором смысле являются синонимами в области химии и использованы здесь для указания частей молекул, которые выполняют некоторые функции или обладают некоторой активностью и являются реакционноспособными в отношении других молекул.

Термины "связь" или "линкер" использованы здесь для обозначения групп или связей, которые обычно образованы в результате химических реакций и обычно являются ковалентными связями. Термин гидролитически стабильные связи означает, что связи, по существу, стабильны в воде и не реагируют с водой при используемых значениях pH, включая, без ограничения, в физиологических условиях в течение длительного промежутка времени, возможно даже, бесконечно долго. Термины гидролитически нестабильные или разлагаемые связи означают, что такие связи разлагаются в воде или в водных растворах, включая, например, кровь. Термины ферментативно нестабильные или разлагаемые связи означают, что связь может разрушиться под действием одного или более из ферментов. Как понятно специалистам, ПЭГ и родственные полимеры могут включать разлагаемые связи в полимерном скелете или в линкерной группе между полимерным скелетом и одной или более из концевых функциональных групп полимерной молекулы. Например, сложноэфирные связи, образованные в реакции ПЭГ карбоновых кислот или активированных ПЭГ карбоновых кислот со спиртовыми группами биологически активного агента, обычно гидролизуются в физиологических условиях с выделением агента. Другие гидролитически разлагаемые связи включают, без ограничения, карбонатные связи; иминные связи, образованные в результате реакции амина и альдегида; фосфатные эфирные связи, образованные при взаимодействии спирта с фосфатной группой; гидразоновые связи, которые являются продуктом реакции гидразида и альдегида; ацетальные связи, которые являются продуктом реакции альдегида и спирта; ортоэфирные связи, которые являются продуктом реакции формиата и спирта; пептидные связи, образованные группой амина, включая, без ограничения, связи у конца полимера, такого как ПЭГ, и карбоксильную группу пептида; и олигонуклеотидные связи, образованные фосфорамидитной группой, включая, без ограничения, группы на

конец полимера и 5' гидроксильную группу олигонуклеотида.

Термины "биологически активная молекула" или "биологически активный агент" означают любое вещество, которое может влиять на любые физические или биохимические свойства биологической системы, схемы функционирования молекулы или взаимодействия, связанные с организмом, включая, без ограничения, вирусы, бактерии, бактериофаги, транспозоны, прионы, насекомых, грибы, растения, животных и людей. В частности, в том смысле, как здесь использован термин, биологически активные молекулы включают, без ограничения, любые вещества, предназначенные для диагностических целей, ухода, облегчения, лечения или профилактики заболеваний у людей или других животных или для улучшения физического или ментального состояния человека или животных. Примеры биологически активных молекул включают, без ограничения, пептиды, белки, ферменты, малые молекулы лекарственных средств, вакцины, иммуногены, твердые формы лекарственных средств, мягкие формы лекарственных средств, углеводы, неорганические атомы или молекулы, красители, липиды, нуклеозиды, радионуклиды, олигонуклеотиды, токсиды, токсины, прокариотные и эукариотные клетки, вирусы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их части, полученные или произведенные из вирусов бактерий, насекомых, животных или любых других клеток или клеточных типов, липосомы, микрочастицы и мицеллы. Полипептиды bG-CSF можно добавлять в мицеллюлярные композиции. Классы биологически активных агентов, которые можно использовать для целей настоящего изобретения, включают, без ограничения, лекарства, пролекарства, радионуклиды, агенты для получения изображений, полимеры, антибиотики, фунгициды, противовирусные агенты, противовоспалительные агенты, противоопухолевые агенты, сердечно-сосудистые агенты, антидепрессанты, гормоны, факторы роста, стероидные агенты, микробно полученные токсины и т.п.

Термин "бифункциональный полимер" относится к полимеру, включающему две дискретные функциональные группы, которые способны специфически реагировать с другими молекулами (включая, без ограничения, боковые группы аминокислот) с образованием ковалентной или нековалентной связи. Бифункциональный линкер, содержащий одну функциональную группу, реакционноспособную в отношении группы на конкретном биологически активном компоненте, и другую группу, реакционноспособную в отношении группы на втором биологическом компоненте, можно использовать для получения конъюгата, который включает первый биологически активный компонент, бифункциональный линкер и указанный второй биологически активный компонент. Известны многие процедуры и линкерные молекулы для присоединения различных соединений к пептидам, см., например, Европейскую патентную заявку № 188256; патенты США №№ 4671958, 4659839, 4414148, 4699784; 4680338 и 4569789, которые включены в описание посредством ссылки. Термин "многофункциональный полимер" относится к полимеру, включающему две или более дискретные функциональные группы, которые способны специфически реагировать с другими молекулами (включая, без ограничения, боковые группы аминокислот) с образованием ковалентных и нековалентных связей. Бифункциональный полимер или полифункциональный полимер могут быть любой нужной длины или молекулярной массы, и их можно выбрать таким образом, чтобы обеспечить конкретное необходимое пространственное положение или конформацию между одной или более из молекул, связанных с bG-CSF и его рецептором или с bG-CSF.

Если группы заместителей обозначены их обычными химическими формулами, написанными слева направо, они одинаково включены в химически идентичные заместители, которые получают при написании структуры справа налево, например структура  $-CH_2O-$  эквивалентна структуре  $-OCH_2-$ .

Термин "заместители" включает, без ограничения, термин "неинтерферирующие заместители". "Неинтерферирующие заместители" представляют собой такие группы, которые приводят к получению стабильных соединений. Подходящие неинтерферирующие заместители или радикалы включают, без ограничения, галоген,  $C_1-C_{10}$  алкил,  $C_2-C_{10}$  алкенил,  $C_2-C_{10}$  алкинил,  $C_1-C_{10}$  алкокси,  $C_1-C_{12}$  аралкил,  $C_1-C_{12}$  алкарил,  $C_3-C_{12}$  циклоалкил,  $C_3-C_{12}$  циклоалкенил, фенил, замещенный фенил, толуоил, ксиленил, бифенил,  $C_2-C_{12}$  алкоксиалкил,  $C_2-C_{12}$  алкоксиарил,  $C_7-C_{12}$  арилоксиалкил,  $C_7-C_{12}$  оксиарил,  $C_1-C_6$  алкилсульфинил,  $C_1-C_{10}$  алкилсульфонил,  $-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}$  алкил), где  $m$  принимает значения от 1 до 8, арил, замещенный арил, замещенный алкокси, фторалкил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, нитроалкил,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $-NRC(O)-(C_1-C_{10}$  алкил),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$  алкил),  $C_2-C_{10}$  алкилтиоалкил,  $-C(O)O-(C_1-C_{10}$  алкил),  $-OH$ ,  $-SO_2$ ,  $=S$ ,  $-COOH$ ,  $-NR_2$ , карбонил,  $-C(O)-(C_1-C_{10}$  алкил)- $CF_3$ ,  $-C(O)-CF_3$ ,  $-C(O)NR_2$ ,  $-(C_1-C_{10}$  арил)- $S-(C_6-C_{10}$  арил),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$  арил),  $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}$  алкил), где каждый  $m$  принимает значения от 1 до 8,  $-C(O)NR_2$ ,  $-C(S)NR_2$ ,  $-SO_2NR_2$ ,  $-NRC(O)NR_2$ ,  $-NRC(S)NR_2$ , их соли и тому подобные. Каждый R в том смысле, как здесь использован, представляет собой H, алкил или замещенный алкил, арил или замещенный арил, аралкил или алкарил.

Термин "галоген" включает фтор, хлор, йод и бром.

Термин "алкил" сам по себе или как часть другого заместителя означает, если не указано иначе, неразветвленную или разветвленную цепочку или циклический углеводородный радикал или их комбинации, которые могут быть полностью насыщенными, моно- или полиненасыщенными и могут включать ди- и поливалентные радикалы, с указанным числом атомов углерода (то есть  $C_1-C_{10}$  означает от одного до десяти атомов углерода). Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, без ограничения, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил,

циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, гомологи и изомеры, например н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т.п. Ненасыщенная алкильная группа содержит одну или более из двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, без ограничения, винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомологи и изомеры. Термин "алкил", если нет других указаний, также включает такие производные алкила, более подробно определенные далее как "гетероалкил". Алкильные группы, которые ограничены углеводородными группами, называют "гомоалкилами".

Термин "алкилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из алкана, представленный, но ими не ограниченный, структурами  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , и далее включает такие группы, которые раскрыты далее как "гетероалкилены". Обычно алкильная (или алкиленовая) группа содержит от 1 до 24 атомов углерода, причем такие группы, которые содержат 10 или меньше атомов углерода, составляют предпочтительный вариант раскрытых здесь способов и композиций. Термин "низший алкил" или "низший алкилен" означает короткоцепочечную алкильную или алкиленовую группу, обычно содержащую восемь или меньше атомов углерода.

Термины "алкокси", "алкиламино" и "алкилтио" (или тиоалкокси) используются в их общепринятом значении и они относятся к алкильным группам, присоединенным к остальной части молекулы через атом кислорода, аминогруппу или атом серы соответственно.

Термин "гетероалкил" сам по себе или в комбинации с другим термином означает, если не указано иначе, стабильную, неразветвленную или разветвленную цепочку, или циклический углеводородный радикал, или их комбинации, состоящие из указанного числа атомов углерода и по меньшей мере одного гетероатома, выбранного из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизован. Гетероатом (гетероатомы) O, N и S и Si могут находиться в любом положении внутри гетероалкильной группы или в положении, по которому указанная алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают, без ограничения,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . Вплоть до двух гетероатомов могут располагаться последовательно, как, например,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Аналогично, термин "гетероалкилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как представлено, но ими не ограничено,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . В гетероалкиленовых группах одинаковые или различные гетероатомы также могут занимать или один или оба конца цепочки (включая, без ограничения, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино, аминоксиалкилен и т.п.) Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп ориентация связывающей группы по направлению, в котором записана связывающая группа, не указывается. Например, формула  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  представляет собой как  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ , так и  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ .

Термины "циклоалкил" и "гетероциклоалкил", сами по себе или в комбинации с другими терминами, представляют, если не указано иначе, циклический вариант "алкила" и "гетероалкила" соответственно. Таким образом, циклоалкил или гетероциклоалкил включают насыщенные, частично ненасыщенные и полностью ненасыщенные кольцевые связи. Кроме того, для гетероциклоалкила гетероатомы могут занимать положение, по которому гетероцикл присоединен к остальной части молекулы. Примеры циклоалкилов включают, без ограничения, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и т.п. Примеры гетероциклоалкилов включают, без ограничения, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и т.п. Кроме того, термин включает бициклические и трициклические кольцевые структуры. Аналогично, термин "гетероциклоалкилен" сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентный радикал, полученный из гетероциклоалкила, и термин "циклоалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из циклоалкила.

Термин "водорастворимый полимер" относится к любому полимеру, который растворим в водных растворителях. Связь водорастворимых полимеров с полипептидами bG-CSF может привести к изменениям, включая, без ограничения, те, которые повышают или модулируют время полужизни в сыворотке или повышают или модулируют терапевтическое время полужизни по сравнению с немодифицированной формой, модулируют иммуногенность, модулируют характеристики физической ассоциации, такие как агрегация и образование мультимеров, изменяют рецепторное связывание, изменяют связывание с одним или более из связываемых партнеров и изменяют рецепторную димеризацию или мультимеризацию. Водорастворимый полимер может или не может обладать собственной биологической активностью, и его можно использовать в качестве линкера для присоединения bG-CSF к другим веществам, включая, без ограничения, один или более из полипептидов bG-CSF или одну или более из биологически активных молекул. Подходящие полимеры включают, без ограничения, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, моно C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкокси или арилокси его производные (раскрыты в патенте США № 5252714, который включен в описание посредством ссылки), монометоксиполиэтиленгликоль, поливи-



нилпирролидон, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, малеиновый ангидрид дивинилового эфира, N-(2-гидроксипропил)метакриламид, декстран, производные декстрана, включая декстрансульфат, полипропиленгликоль, сополимер полипропиленоксид/этиленоксида, полиоксиэтилинированные полиолы, гепарин, фрагменты гепарина, полисахариды, олигосахариды, гликаны, целлюлозу и производные целлюлозы, включая, без ограничения, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу, крахмал и производные крахмала, полипептиды, полиалкиленгликоль и его производные, сополимеры полиалкиленгликоля и его производных, поливинилэтиловые эфиры и альфа-бета-поли(2-гидроксиэтил)-DL-аспартамид и т.п. или их смеси. Примеры таких водорастворимых полимеров включают, без ограничения, полиэтиленгликоль и сывороточный альбумин. В WO 03/074087 и WO 03/074088 раскрыто конъюгирование белков или малых молекул с гидроксиалкилкрахмалом (HAS). Примеры гидроксиалкилкрахмалов включают, без ограничения, гидроксиэтилкрахмал. Конъюгаты гидроксиалкилкрахмала и других молекул, например, могут включать ковалентную связь между концевыми альдегидными группами HAS и реакционноспособными группами других молекул.

Термин "полиалкиленгликоль" или "поли(алкиленгликоль)" относится к полиэтиленгликолю (поли(этиленгликолю)), полипропиленгликолю, полибутиленгликолю и их производным. Термин "полиалкиленгликоль" включает как линейные, так и разветвленные полимеры со средней молекулярной массой от 0,1 до 100 кДа. Другие примеры вариантов перечислены, например, в коммерческих каталогах поставщиков, таких как каталог Shearwater Corporation's catalog "Polyethyleneglycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

Термин "арил" означает, если не указано иначе, полиненасыщенный, ароматический, углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или множество колец (включая, без ограничения, от 1 до 3 колец), которые конденсированы вместе или связаны ковалентно. Термин "гетероарил" относится к арильным группам (или кольцам), которые содержат от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O и S, где атомы азота и серы необязательно окислены, и атом (атомы) азота необязательно кватернизованы. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через гетероатом. Нелимитирующие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуридил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители у каждого из указанных выше арильных и гетероарильных кольцевых систем выбирают из группы описанных далее приемлемых заместителей.

Для краткости термин "арил", когда использован в комбинации с другими терминами (включая, без ограничения, арилокси, арилтиоокси, арилалкил), включает как арильные, так и гетероарильные кольца, как определено выше. Таким образом, термин "арилалкил" означает, что включены те радикалы, в которых арильная группа присоединена к алкильной группе (включая, без ограничения, бензил, фенэтил, пиридилметил и т.п.), включая такие алкильные группы, в которых атом углерода (включая, без ограничения, метиленовую группу) был заменен, например, на атом кислорода (включая, без ограничения, феноксиметил, 2-пиридилдоксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропил и т.п.).

Каждый из вышеуказанных терминов (включая, без ограничения, "алкил", "гетероалкил", "арил" и "гетероарил") означает, что включены как замещенные, так и незамещенные формы указанных радикалов. Примеры заместителей для каждого типа радикалов представлены далее.

Заместителями для алкильного и гетероалкильного радикалов (включая такие группы, которые часто называют как алкилен, алкенил, гетероалкилен, гетероалкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклоалкил, циклоалкенил и гетероциклоалкенил) могут быть один или более из членов группы, выбранные из, без ограничения:  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR''$ ,  $-SR'$ , -галоген,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $CONR''R''$ ,  $-OC(O)NR''R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR''C(O)NR''R''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR''R''R''')=NR''''$ ,  $-NR-C(NR''R''R''')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR''R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  и  $-NO_2$ , причем количество их может меняться в интервале от нуля до  $(2m'+1)$ , где  $m'$  представляет собой полное число атомов углерода в таком радикале.  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$ , каждый независимо, обозначает водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, без ограничения, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиоалкоксигруппы или арилалкильные группы. Если соединение настоящего изобретения включает более чем одну R группу, например, каждую R группу независимо выбирают как каждую  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  группу, если присутствует более чем одна из указанных групп. Если  $R'$  и  $R''$  присоединены к одному и тому же атому азота, тогда взятые вместе с атомом азота они могут образовывать 5-, 6- или 7-членное кольцо. Например,  $-NR''R''$  включает, без ограничения, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. На основании вышеприведенного обсуждения заместителей специалисту в данной области должно быть понятно, что термин "алкил" включает группы, включая атомы углерода, связанные с группами другими, чем группы водорода, такими как галогеноалкил (включая, без ограничения,  $-CF_3$  и  $-CH_2CF_3$ ) и ацил (включая, без ограничения,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  и т.п.).

Аналогично заместителям, раскрытым для алкильного радикала, заместители для арильной и гетероарильной группы варьируются и их выбирают, без ограничения, из: галогена, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -галогена, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)<sub>2</sub>R', -NR'-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -NRSO<sub>2</sub>R', -CN и -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, фтор(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкокси и фтор(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила, в количестве от нуля до числа свободных валентностей у ароматической кольцевой системы; и где R', R'', R''' и R'''' независимо выбирают из водорода, алкила, гетероалкила, арила и гетероарила. Если соединение по настоящему изобретению включает более одной R группы, например, каждую из R групп независимо выбирают как каждую R', R'', R''' и R'''' группу, если присутствует более одной из указанных групп.

Термин "модулируют время полужизни в сыворотке" означает позитивное или негативное изменение во времени циркулирующей полужизни модифицированных bG-CSF по сравнению с немодифицированной формой. Время полужизни в сыворотке измеряют, отбирая образцы крови в различные моменты времени после введения bG-CSF и определяя концентрацию указанной молекулы в каждом образце молекул. Зависимость концентрации сыворотки от времени позволяет рассчитать время полужизни в сыворотке. Желательно повышение времени полужизни по меньшей мере в два раза, но и меньшие значения повышения могут оказаться полезными, например, в тех случаях, когда они позволяют определить удовлетворительный режим дозирования и избежать токсического эффекта. В некоторых вариантах повышение составляет по меньшей мере трехкратное, по меньшей мере примерно пятикратное или по меньшей мере примерно десятикратное.

Термин "модулируют терапевтическое время полужизни" в том смысле, как здесь использован, означает позитивное или негативное изменение времени полужизни терапевтически эффективного количества bG-CSF по сравнению с его немодифицированной формой. Терапевтическое время полужизни определяют, измеряя фармакокинетические и/или фармакодинамические свойства молекул в различные моменты времени после введения. Желательно, чтобы повышение терапевтического времени полужизни обеспечило конкретный благоприятный дозовый режим, конкретную благоприятную полную дозу или позволило избежать вредных эффектов. В некоторых вариантах повышение терапевтического времени полураспада возникает из-за повышения эффективности, увеличения или уменьшения связывания модифицированных молекул с их мишенью, усиления или уменьшения разрушений молекул ферментами, такими как протеазы, или повышения или уменьшения других параметров или механизма действия немодифицированных молекул или повышения или уменьшения рецептор-опосредованного клиренса молекул.

Термин "выделенный" в применении к нуклеиновой кислоте или белку означает, что указанные нуклеиновая кислота или белок не содержат, по меньшей мере, некоторых из клеточных компонент, с которыми они ассоциированы в природном состоянии, или что указанные нуклеиновая кислота или белок были сконцентрированы до уровня, который выше, чем их концентрация при *in vivo* или *in vitro* продуцировании. Это может быть в гомогенном состоянии. Выделенные вещества могут быть или в сухом либо в полусухом виде или в растворе, включая, без ограничения, водный раствор. Они могут быть компонентами фармацевтических композиций, которые включают дополнительные фармацевтически приемлемые носители и/или эксципиенты. Чистоту и гомогенность обычно определяют, используя аналитические химические методы, такие как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преимущественным видом в препарате, значительно очищают. В частности, выделенный ген выделяют из открытой считывающей рамки, которая фланкирует ген и кодирует белок, другой, нежели представляющий интерес ген. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок проявляются только одной полосой в электрофоретическом геле. В частности, это может означать, что указанные нуклеиновая кислота или белок имеют степень чистоты по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или больше.

Термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам или в одноцепочечной, или в двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают аналогичными свойствами связывания, что и сравниваемая нуклеиновая кислота, и их метаболизм аналогичен метаболизму природных нуклеотидов. Если конкретно не ограничено иначе, термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая РНА (пептидонуклеиновая кислота), аналогам ДНК, используемым в антисмысловой методике (фосфоротиоаты, фосфоамидаты и т.п.). Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (включая, без ограничения, замещения вырожденного кодона) и комплементарные последовательности, также как косвенно означенную последовательность. Специфически, замещения вырожденного кодона можно осуществить, создавая последовательности, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов замещено смешанным основанием и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mot. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)).

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в настоящем описании используют взаимозаменяемо,

обозначая полимер аминокислотных остатков. То есть описание, относящееся к полипептиду, равным образом применимо к описанию белка, и наоборот. Термины, применимые к природным аминокислотным полимерам, также применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более из аминокислотных остатков представляет собой не кодируемую в природе аминокислоту. Термин включает аминокислотные цепи любой длины, включая белки полной длины, где аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

Термин "аминокислота" относится к природным и неприродным аминокислотам так же, как к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Кодируемые в природе аминокислоты представляют собой 20 обычных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин) и пирролизин и селеноцистеин. Термин "аминокислотные аналоги" относится к соединениям, которые имеют ту же самую основную химическую структуру, что и природные аминокислоты, то есть содержат  $\alpha$ -углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R группу, такую как, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R группы (такие как норлейцин) или модифицированные пептидные основные цепи, но сохраняют ту же самую основную химическую структуру, что и природные аминокислоты. Ссылки на аминокислоту включают, например, природные протеогенные L-аминокислоты; D-аминокислоты, химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты и производные аминокислот; природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д.; и химически синтезированные соединения, обладающие свойствами, которые, как известно специалистам, являются характеристиками аминокислот. Примеры неприродных аминокислот включают, без ограничения,  $\alpha$ -метиламинокислоты (например,  $\alpha$ -метилаланин), D-аминокислоты, гистидино-подобные аминокислоты (например, 2-аминогистидин,  $\beta$ -гидроксигистидин, гомогистидин,  $\alpha$ -фторметилгистидин и  $\alpha$ -метилгистидин), аминокислоты, содержащие дополнительный метилен в боковой цепи ("гомо" аминокислоты), и аминокислоты, в которых функциональная группа карбоновой кислоты в боковой цепи заменена группой сульфоновой кислоты (например, цистеиновой кислоты). Включение неприродных аминокислот, включая синтетические неприродные аминокислоты, замещенные аминокислоты, или одну или более из D-аминокислот в белки настоящего изобретения может оказаться выгодным в ряде различных случаев. Пептиды, содержащие D-аминокислоту и т.д., проявляют повышенную стабильность *in vitro* или *in vivo* по сравнению с эквивалентами, содержащими L-аминокислоту. Таким образом, конструирование пептидов и т.д., включающих D-аминокислоты, может быть особенно полезным в тех случаях, когда желательна или необходима повышенная внутриклеточная стабильность. Более конкретно, D-пептиды и т.д. устойчивы в отношении эндогенных пептидов и протеаз, тем самым обеспечивая повышенную биодоступность молекул, и пролонгируют время полужизни *in vivo*, если такие свойства желательны. Кроме того, D-пептиды и т.д. не могут быть процессированы эффективно из-за ограниченного основным комплексом гистосовместимости класса II представления T-хелперным клеткам, поэтому, по-видимому, меньше вызывают гуморальные иммунные реакции во всем организме.

Аминокислоты могут быть названы в описании или по их общеизвестным трехбуквенным символам, или по однобуквенным символам, как рекомендовано комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды, аналогично, могут быть названы в соответствии с их общепринятыми однобуквенными кодами.

Термин "консервативно модифицированные варианты" применим как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, термин "консервативно модифицированные варианты" относится к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или практически идентичные аминокислотные последовательности или если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность до практически идентичной последовательности. Из-за дегенерации генетического кода большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодирует аминокислота аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин специфицирован кодоном, указанный кодон можно изменить на любой из соответствующих кодонов, описанных без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", которые являются одними из типов консервативно модифицированных вариантов. Здесь каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области должно быть понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать для получения функционально идентичной молекулы. Соответственно каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, присутствует в каждой описанной последовательности.

Что касается последовательностей аминокислот, специалисту в данной области должно быть по-

нятно, что отдельные замещения, делеции или добавления к последовательностям нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или исключают одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой "консервативно модифицированный вариант", в котором указанное изменение приводит к делеции аминокислоты, добавлению аминокислоты или замещению аминокислоты химически аналогичной аминокислотой. Таблицы консервативных замещений, содержащие списки функционально аналогичных аминокислот, известны специалистам в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты, кроме того, дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели настоящего изобретения.

Таблицы консервативных замещений, содержащие списки функционально аналогичных аминокислот, известны специалистам в данной области. Следующие восемь групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые представляют собой консервативные замещения друг для друга:

- 1) Аланин (A), Глицин (G);
- 2) Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E);
- 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q);
- 4) Аргинин (R), Лизин (K);
- 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V);
- 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W);
- 7) Серин (S), Треонин (T) и
- 8) Цистеин (C), Метионин (M),

(см., например, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)).

Термины "идентичны" или процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые одинаковы. Последовательности "по существу, идентичны", если процент их аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые одинаковы (то есть имеют около 60% идентичности, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90 или около 95% идентичности в указанном участке), по сравнению с и выравненные для максимального соответствия в окне сравнения или в обозначенном участке, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей (или других алгоритмов, доступных специалистам в данной области) или вручную сравнения и визуального изучения. Указанное определение также относится к комплементу тестируемой последовательности. Идентичности могут существовать на участке, который имеет по меньшей мере около 50 аминокислот или нуклеотидов в длину, или на участке, который имеет 75-100 аминокислот или нуклеотидов в длину или, если конкретно не указано, по всей последовательности полинуклеотида или полипептида. Полинуклеотид, кодирующий полипептид настоящего изобретения, включая гомологи видов, отличающихся от людей, можно получить способом, включающим стадии скринингования библиотеки в жестких условиях гибридизации с меченым зондом, содержащим полинуклеотидную последовательность настоящего изобретения или ее фрагмент, и выделения полной длины кДНК и геномные клоны, содержащие указанную полинуклеотидную последовательность. Такие методики гибридизации хорошо известны специалистам в данной области.

Для сравнения последовательностей обычно одну последовательность используют как референс-последовательность, с которой сравнивают последовательности. Когда используют алгоритм сравнения последовательностей, тестируемую последовательность и референс-последовательность вводят в компьютер, определяют координаты субпоследовательности, при необходимости, и задают параметры программы алгоритма последовательностей. Можно использовать параметры неудачной программы или можно задать альтернативные параметры. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей рассчитывают процент идентичности последовательности для тестируемой последовательности относительно референс-последовательности на основании параметров программы.

Термин "окно сравнения" в том смысле, как здесь использован, включает сравнение с сегментом любого одного из числа смежных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от около 50 до около 200, чаще от около 100 до около 150, в котором последовательность можно сравнить с референс-последовательностью того же числа смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны специалистам в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществить, используя, включая, без ограничения, алгоритм локальной гомологичности Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.*, 2:482c, алгоритм выравнивания гомологичности Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48:443, поиск по методу сходства Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444, компьютерными реализациями указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science, Dr., Madison, WI) или выравнивая вручную и визуально inspectируя (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

Одним примером алгоритма, который пригоден для определения процента идентичности последо-

вательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые раскрыты Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 соответственно. Программное обеспечение для осуществления BLAST анализов общедоступно через Национальный Центр (National Center Biotechnology Information), доступный на World Wide Web по адресу [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Параметры BLAST алгоритма W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. BLASTN программа (для нуклеотидных последовательностей) использует как параметр по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) или 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей BLASTP программа использует как параметр по умолчанию длину слова 3, и ожидание (E) 10, и BLOSUM62 матрицу замен (см. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915) выравнивание (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. BLAST алгоритм обычно используют с отключенным фильтром "низкой комплексности".

BLAST алгоритм также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787). Одним показателем сходства, который предоставляет BLAST алгоритм, является наименьшая сумма вероятности (P(N)), что является показателем вероятности совместности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, которая может случайно возникнуть. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с референс-последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с референс-нуклеиновой кислотой составляет менее чем около 0,2, или менее чем около 0,01, или менее чем около 0,001.

Выражение "селективно (или специфически) гибридизуется с" относится к связыванию, дублированию или гибридизации молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях гибридизации, если такая последовательность присутствует в сложной смеси (включая, без ограничения, полные клеточные или библиотеку ДНК или РНК).

Выражение "жесткие условия гибридизации" относится к гибридизации последовательности ДНК, РНК, РНА или других имитаторов нуклеиновой кислоты либо их комбинаций в условиях низкой ионной силы и высокой температуры, что известно специалистам. Обычно в жестких условиях зонд гибридизуется со своей мишенивой субпоследовательностью в сложной смеси нуклеиновых кислот (включая, без ограничения, полные клеточные или библиотеки ДНК либо РНК), но не гибридизуется с другими последовательностями в сложной смеси. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в различных обстоятельствах. Более длинные последовательности гибридизуются специфически при более высоких температурах. Обширное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of Nucleic Acids Analysis" (1993). Обычно жесткие условия выбирают примерно на около 5-10°C ниже температуры точки плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности при заданной ионной силе, pH.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенной ионной силе, pH и концентрации ядер), при которой 50% зондов комплементарных мишени гибридизуются с последовательностью-мишенью при равновесии (если последовательности-мишени присутствуют в избытке, при  $T_m$  50% зондов находятся в равновесии). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М ионов натрия, обычно от около 0,01 до 1,0 М концентрации ионов натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, и температура равна по меньшей мере около 30°C для коротких зондов (включая, без ограничения, зонды от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для более длинных зондов (включая, без ограничения, зонды от 50 нуклеотидов). Жесткие условия можно также создать, добавляя дестабилизирующие агенты, такие как формамид. Доля селективной или специфической гибридизации позитивного сигнала может превышать фон, по меньшей мере двукратно, оптимально в 10 раз фоновую гибридизацию. Примеры условий жесткой гибридизации могут быть следующими: 50% формамида, 5X SSC, и 1% SDS, инкубирование при 42°C или 5X SSC, 1% SDS, инкубирование при 65°C, с промывкой при 0,2X SSC и 0,1% SDS при 65°C. Такие промывки можно осуществлять в течение 5, 15, 30, 60, 120 или более минут.

Термин "эукариот" относится к организмам, принадлежащим к филогенетическому домену Eucarya, таким как животные (включая, без ограничения, млекопитающих, насекомых, рептилий, птиц и т.д.), реснитчатые, растения (включая, без ограничения, однодольные, двудольные, водоросли и т.д.), грибы, дрожжи, жгутиковые, микроспоридии, одноклеточные организмы и т.д.

Термин "неэукариот" относится к неэукариотным организмам. Например, неэукариотный организм может принадлежать к Eubacteria (включая, без ограничения, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pulida* и т.д.) филогенетическому домену или Archaea (включая, без ограничения, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, таким как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium species NRC-I*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* и т.д.) филогенетическому домену.

Термин "субъект" относится к животному, в некоторых вариантах - к млекопитающему, и в других вариантах - к человеку, который является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Животное может быть домашним животным (например, собакой, кошкой и т.п.), фермерским животным (например,

коровой, овцой, свиньей, лошастью и т.п.) или лабораторным животным (например, крысой, мышью, морской свинкой и т.п.).

Термин "эффективное количество" относится к такому количеству вводимого полипептида, модифицированного неприродной аминокислотой, которое до некоторой степени облегчит один или более из симптомов подлежащего лечению заболевания, состояния или нарушения. Композиции, содержащие раскрытые здесь полипептиды, модифицированные неприродной аминокислотой, можно вводить для профилактики, активизации и/или терапевтического лечения.

Термины "повышать" или "повышение" означают повышение или пролонгирование эффективности или длительности необходимого эффекта. Так, что касается эффекта усиления терапевтических агентов, термин "усиление" относится к способности повышать или пролонгировать, или эффективность или длительность действия других терапевтических агентов на систему. Термин "повышающе-эффективное количество" в том смысле, как здесь использован, относится к количеству, которое адекватно усилению действия другого терапевтического агента в необходимой системе. При использовании для животного эффективное количество для такого использования будет зависеть от тяжести процесса заболевания, нарушения или состояния, предшествовавшего лечению, общего состояния здоровья животного, реакции на лекарственное средство и от суждения лечащего ветеринара.

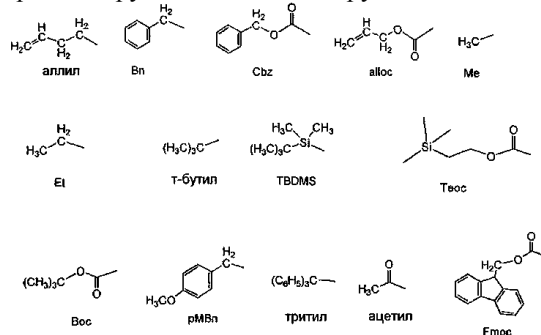
Термин "модифицированное" относится к любому изменению, осуществленному для данного полипептида, такому как изменение длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, к котрансляционной модификации или посттрансляционной модификации полипептида. Термин "модифицированная" форма означает, что обсуждаемые полипептиды являются необязательно модифицированными, то есть обсуждаемые полипептиды могут быть как модифицированными, так и/или немодифицированными.

Термин "посттрансляционно модифицированный" относится к любой модификации природной или неприродной аминокислоты, которая происходит после того, как такая аминокислота была включена в полипептидную цепь. Термин включает только в качестве примера котрансляционные *in vivo* модификации, котрансляционные *in vitro* модификации (такие как не содержащая клеток трансляционная система), посттрансляционные *in vivo* модификации и посттрансляционные *in vitro* модификации.

В целях профилактики композицию, содержащую полипептид bG-CSF, вводят животному, восприимчивому или каким-либо другим образом подверженному риску конкретного заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяют как "профилактически эффективное количество". При таком использовании точные количества также зависят от общего состояния здоровья животного, веса и т.п. Среди специалистов в данной области общепринято определять такие профилактически эффективные количества рутинными экспериментами (например, доза, превышающая клинически определенные дозы).

Термин "защищенный" относится к присутствию "защитной группы" или молекулы, которые предотвращают реакцию химически реакционноспособных функциональных групп в некоторых условиях реакций. Защитная группа будет меняться в зависимости от типа защищаемой химически реакционноспособной группы. Например, если химически реакционноспособной группой является амин или гидразид, защитную группу можно выбрать из группы тетрабутилоксикарбонила (t-Boc) и 9-фторенилметоксикарбонила (Fmoc). Если химически реакционноспособной группой является тиол, защитной группой может быть ортопиридилдисульфид. Если химически реакционноспособной группой является карбоновая кислота, такая как бутановая или пропионовая кислота либо гидроксильная группа, защитной группой может быть бензильная или алкильная группа, такая как метил, этил или трет-бутил. Другие известные специалистам защитные группы можно также использовать в раскрытых здесь способах и композициях, включая фотолабильные группы, такие как Nvoc и MeNvoc. Другие известные специалистам защитные группы можно также использовать в раскрытых здесь способах и композициях.

Только в качестве примера блокирующие/защитные группы можно выбрать из



Другие защитные группы раскрыты у Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, что включено в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В терапевтических целях композицию, содержащую модифицированный неприродный аминокис-

лотный полипептид, вводят животному, у которого уже существует заболевание, состояние или нарушение, в количестве, которого достаточно для лечения или, по меньшей мере, частичного ослабления симптомов заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяют как "терапевтически эффективное количество" и оно зависит от тяжести и течения заболевания, нарушения или состояния, предшествующего лечению, общего состояния здоровья животного, реакции на лекарственное средство и суждения лечащего ветеринара. Среди специалистов в данной области общепринято определять такие профилактически эффективные количества рутинными экспериментами (например, доза, превышающая клинически определенные дозы).

Термин "лечение" используют для ссылки на профилактическое и/или терапевтическое лечение.

Представленные здесь полипептиды с не кодируемой в природе аминокислотой могут включать меченые изотопами соединения, у которых один или более из атомов заменен на атом с атомной массой или массовым числом, отличающимся от атомной массы или массового числа обычно существующих в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в рассматриваемые соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  соответственно. Некоторые из раскрытых здесь меченных изотопами соединений, например, таких, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$ , можно использовать в лекарственных средствах и/или субстратах для анализов распределения в тканях. Кроме того, замещение изотопами, такими как дейтерий, то есть  $^2\text{H}$ , может обеспечить некоторые терапевтические преимущества, связанные с большей метаболической стабильностью, например увеличением времени полужизни *in vivo* или уменьшением необходимой дозы.

Все изомеры, включая, без ограничения, диастереоизомеры, энантиомеры и их смеси, рассматривают как часть раскрытых здесь композиций. В дополнительных или следующих вариантах полипептиды с не кодируемой в природе аминокислотой метаболизируются после введения в нуждающийся в этом организм с образованием метаболитов, которые затем используются для осуществления необходимого эффекта, включая необходимый терапевтический эффект. Следующими или дополнительными вариантами являются активные метаболиты полипептидов с не кодируемой в природе аминокислотой.

В некоторых ситуациях полипептиды с не кодируемой в природе аминокислотой могут существовать как таутомеры. Кроме того, раскрытые здесь полипептиды с не кодируемой в природе аминокислотой могут существовать в несольватированной, также как в сольватированной формах с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Сольватированные формы также рассматриваются как обсуждавшиеся здесь. Специалистам в данной области должно быть понятно, что некоторые из приведенных здесь соединений могут существовать в нескольких таутомерных формах. Все такие таутомерные формы рассматриваются как часть раскрытых здесь композиций.

Если не указано иначе, использованы известные специалистам обычные способы масс-спектропии, ЯМР, ВЭЖХ, химии белков, биохимии, методики рекомбинантных ДНК и фармакологии.

### Подробное описание предпочтительного варианта изобретения

#### I. Введение.

В настоящем изобретении предложены молекулы b-GCSF, включающие по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. В некоторых вариантах настоящего изобретения полипептид b-GCSF, содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию. В одном варианте по меньшей мере одна посттрансляционная модификация включает присоединение молекулы, включая, без ограничения, гидроксиалкилкрахмал (HAS), гидроксиэтилкрахмал (HES), метку, краситель, полимер, водорастворимый полимер, производное полиэтиленгликоля, фотосшивающий агент, радионуклид, цитотоксическое соединение, лекарственное средство, метку средства, метку фолосредства, реакционноспособное соединение, смолу, второй белок или полипептид или аналог полипептида, антитело или фрагмент антитела, металлохелатор, кофактор, жирную кислоту, углевод, полинуклеотид, ДНК, РНК, антисмысловый полинуклеотид, сахарид, водорастворимый дендример, циклодекстрин, ингибиторную рибонуклеиновую кислоту, биоматериал, наночастицы, спиновую метку, фторофор, металлсодержащую молекулу, радиоактивную молекулу, новую функциональную группу, группу, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другими молекулами, фотозахватывающую (photocaged) молекулу, молекулу, возбуждаемую актиничной радиацией, фотоизомерируемую молекулу, биотин, производное биотина, аналог биотина, молекулу, содержащую тяжелый атом, химически отщепляемую группу, фотоотщепляемую группу, удлиненную боковую цепь, связанный с углеродом сахар, окислительно-восстановительно активный агент, аминокислоту, токсическую молекулу, изотопно меченную молекулу, биофизический зонд, фосфоресцентную группу, хемиллюминесцентную группу, электронноплотную группу, магнитную группу, интеркалирующую группу, хромофор, агент энергопереноса, биологически активный агент, детектируемую метку, малую молекулу, наночастицу, которую вводят в клетку в качестве метки (quantum dot), нанотрансмисмиттер, радионуклеотид, радиотрансмисмиттер, агент захвата нейтронов или любую комбинацию вышеперечисленных или других необходимых соединений или веществ, включающих вторую реакционноспособную группу, по меньшей мере к одной неприродной аминокислоте, включающей первую реакционноспособную группу, используя химически-

ую методологию, которая, как известно специалистам в данной области, подходит для конкретной реакционноспособной группы. Например, первая реакционноспособная группа представляет собой алкинильную молекулу (включая, без ограничения, в неприродной аминокислоте п-пропаргилноксифенилаланин, где группу пропаргила иногда называют также ацетиленовой молекулой) и вторая реакционноспособная группа представляет собой азидомолекулу, и используют химический метод [3+2] циклодоприсоединения. В другом примере первая реакционноспособная группа представляет собой азидомолекулу (включая, без ограничения, в неприродной аминокислоте п-азидо-L-фенилаланин) и вторая реакционноспособная группа представляет собой алкинильную молекулу. В некоторых вариантах модифицированного b-GCSF полипептида настоящего изобретения используют по меньшей мере одну неприродную аминокислоту (включая, без ограничения, неприродную аминокислоту, содержащую кетофункциональную группу), включающую по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, где по меньшей мере одна посттрансляционная модификация включает сахаридную молекулу. В некоторых вариантах посттрансляционные модификации осуществляются *in vivo* в эукариотной клетке или в неэукариотной клетке. Линкер, полимер, водорастворимый полимер или другие молекулы могут присоединять молекулу к полипептиду. Молекула может быть связана непосредственно с полипептидом.

В некоторых вариантах белок включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая осуществляется *in vivo* в одной клетке-хозяине, где посттрансляционная модификация обычно не осуществляется в клетке-хозяине другого типа. В некоторых вариантах белок включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая осуществляется *in vivo* в эукариотной клетке, где посттрансляционная модификация обычно не осуществляется в неэукариотной клетке. Примеры посттрансляционных модификаций включают, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, ацилирование, липид-модификацию, пальмитоилирование, добавление пальмитата, фосфорилирование, модификацию гликолипидной связи и т.п.

В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одну или более из не кодируемых в природе аминокислот для гликозилирования, ацетилирования, ацилирования, липид-модификации, пальмитоилирования, добавления пальмитата, фосфорилирования или модификации гликолипидной связи полипептида. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одну или более из не кодируемых в природе аминокислот для гликозилирования полипептида. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одну или более из кодируемых в природе аминокислот для гликозилирования, ацетилирования, ацилирования, липид-модификации, пальмитоилирования, добавления пальмитата, фосфорилирования или модификации гликолипид-связи полипептида. В некоторых вариантах полипептид b-GCSF включает одну или более из кодируемых в природе аминокислот для гликозилирования полипептида.

В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает добавления и/или замещения одной или более из не кодируемых в природе аминокислот, что увеличивает степень гликозилирования полипептида. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одну или более из делеций, что увеличивает степень гликозилирования полипептида. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одно или более из добавлений и/или замещений не кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования различных аминокислот в полипептиде. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одну или более из делеций, что увеличивает степень гликозилирования различных аминокислот в полипептиде. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одно или более из добавления и/или замещения не кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования не кодируемой в природе аминокислоты в полипептиде. В некоторых вариантах b-GCSF полипептид включает одно или более из добавлений и/или замещений не кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования кодируемой в природе аминокислоты в полипептиде. В некоторых вариантах полипептид b-GCSF включает одно или более из добавлений и/или замещений кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования различных аминокислот в полипептиде. В некоторых вариантах полипептид b-GCSF включает одно или более из добавлений и/или замещений не кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования кодируемой в природе аминокислоты в полипептиде. В некоторых вариантах полипептид b-GCSF включает одно или более из добавлений и/или замещений не кодируемой в природе аминокислоты, что увеличивает степень гликозилирования не кодируемой в природе аминокислоты в полипептиде.

В одном варианте посттрансляционная модификация включает присоединение олигосахарида к аспарагину через GlcNAc-аспарагиновую связь (включая случаи без ограничения, когда олигосахарид включает (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc и т.п.). В другом варианте посттрансляционная модификация включает присоединение олигосахарида (включая, без ограничения, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc и т.д.) к серину или треонину через связи GalNAc-серин, GalNAc-треонин, GlcNAc-серин или GlcNAc-треонин. В некоторых вариантах белок или полипептид настоящего изобретения может включать секрецию или локализацию последовательности, эпитопную метку, FLAG метку, полигистидиновую метку, GST гибрид и/или т.п. Примеры секреторных сигнальных последовательностей включают, без ограничения, прокариотную секреторную сигнальную последовательность, эукариотную секреторную сигнальную последовательность, эукариотную секреторную сигнальную последовательность 5'-оптимизированную для бактериальной экспрессии, новую секреторную сигнальную последовательность,



пектазную секреторную сигнальную последовательность, Отр А секреторную сигнальную последовательность и фаговую секреторную сигнальную последовательность. Примеры секреторных сигнальных последовательностей включают, без ограничения, STII (прокариотная), Fd GIII и M13 (фаговая), Bg12 (дрожжевая) и сигнальную последовательность bla, полученную из транспозона. Любая такая последовательность может быть модифицирована до получения необходимого результата полипептидом, включая, без ограничения, замещение одной сигнальной последовательности отличающейся последовательностью, замещение лидерной последовательности отличающейся лидерной последовательностью и т.д.

Представляющий интерес белок или полипептид может содержать по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или десять либо больше не природных аминокислот. Не природные аминокислоты могут быть одинаковыми или различными, например в белке может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше различных сайтов, которые включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше различных не природных аминокислот. В некоторых вариантах по меньшей мере одна, но меньше чем все, из конкретных аминокислот, присутствующих в природной версии белка, замещены не природными аминокислотами.

В настоящем изобретении предложены способы и композиции на основе b-GCSF, включающие по меньшей мере одну не кодируемую в природе аминокислоту. Введение по меньшей мере одной не кодируемой в природе аминокислоты в b-GCSF может позволить применять химическую стратегию конъюгирования, которая включает специфические химические реакции, включая, без ограничения, реакцию с одной или более из не кодируемых в природе аминокислот, хотя и не реагирующей с обычно встречающимися 20 аминокислотами. В некоторых вариантах b-GCSF, включающие не кодируемую в природе аминокислоту, связаны с водорастворимым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), через боковую цепь не кодируемой в природе аминокислоты. В настоящем изобретении предложен высокоэффективный способ селективной модификации белков производными ПЭГ, который включает селективное включение негенетически кодируемой аминокислоты, включая, без ограничения, такие аминокислоты, которые содержат функциональные группы или заместители, не встречающиеся в 20 природно включенных аминокислотах, включая, без ограничения, кетонную, азидную или ацетиленовую молекулу, в белки в ответ на селекторный кодон и последующую модификацию полученных аминокислот соответствующими реакционноспособными производными ПЭГ. После включения аминокислотные боковые цепи можно затем модифицировать, используя химические методики, которые, как известно специалистам в данной области, пригодны для конкретной функциональной группы или заместителей, присутствующих в не кодируемой в природе аминокислоте. Известны весьма разнообразные химические методики, которые пригодны для использования в настоящем изобретении для включения в белок водорастворимого полимера. Такие методики включают, без ограничения, реакцию [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена (см., например, Padwa, A. в *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B.M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109 и Huisgen, R. в *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) с, включая, без ограничения, ацетиленовыми или азидными производными соответственно.

Так как метод [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена включает реакцию циклоприсоединения, а не нуклеофильного замещения, белки можно модифицировать с чрезвычайно высокой селективностью. Реакцию можно вести при комнатной температуре в водных условиях с превосходной региоселективностью (1,4>1,5) путем добавления каталитических количеств соли Cu(I) к реакционной смеси; см., например, Tomoe, et al., (2002) *J. Org. Chem.*, 67:3057-3064, Rostovtsev, et al., (2002) *Aneew. Chem. Int. Ed.*, 41:2596-2599 и WO 03/101972. Молекулой, которую можно добавлять к белку настоящего изобретения через [3+2] циклоприсоединение, на самом деле может быть любая молекула с подходящей функциональной группой или заместителем, включая, без ограничения, азидопроизводные или ацетиленовые производные. Такие молекулы можно добавлять к не природной аминокислоте с ацетиленовой группой, включая, без ограничения, п-пропаргиллоксифенилаланин, или с азидогруппой, включая, без ограничения, п-азидофенилаланин соответственно.

Пятичленное кольцо, которое образуется в результате [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена, не всегда является обратимым в восстанавливающей среде и является стабильным при гидролизе в течение длительного времени в водном окружении. Соответственно физические и химические характеристики широкого круга веществ можно модифицировать в жестких водных условиях активными производными ПЭГ настоящего изобретения. Еще более важно то, что так как азидные и ацетиленовые молекулы являются специфическими друг для друга (и не реагируют, например, с любой из 20 обычных генетически кодируемых аминокислот), белки можно модифицировать по одному или более из специфических сайтов с чрезвычайно высокой селективностью.

В настоящем изобретении также предложены водорастворимые и гидролитически стабильные производные производных ПЭГ и родственных гидрофильных полимеров, содержащие одну или более из ацетиленовых или азидных молекул. Производные ПЭГ полимеров, которые содержат ацетиленовые молекулы, отличаются высокой селективностью в отношении присоединения к азидным молекулам, которые были селективно введены в белки под действием селекторного кодона. Аналогично, производные ПЭГ полимеров, которые содержат азидные молекулы, отличаются высокой селективностью в отноше-

нии присоединения к ацетиленовым молекулам, которые были селективно введены в белки под действием селекторного кодона.

Более конкретно, азидные молекулы включают, без ограничения, алкилазиды, арилазиды и производные указанных азидов. Производные алкил- и арилазидов могут содержать другие заместители до тех пор, пока сохраняется ацетилен-специфическая реакционная способность. Ацетиленовые молекулы включают алкил- и арилацетилены и производные каждого из них. Производные алкил- и арилацетиленов могут включать другие заместители до тех пор, пока сохраняется азид-специфическая реакционная способность.

В настоящем изобретении предложены конъюгаты веществ, обладающих широким разнообразием функциональных групп, заместителей или молекул, с другими веществами, включая, без ограничения, гидроксилалкилкрахмал (HAS); гидроксипропилкрахмал (HES); метки; красители; полимеры; водорастворимые полимеры; производные полиэтиленгликоля; фотосшивающие агенты; радионуклиды; цитотоксические соединения; лекарственные средства; метки средства; фотоаффинные метки; реакционноспособные соединения; смолы; второй белок или полипептид либо аналого полипептида; антитела или фрагменты антител; металлохелаторы; кофакторы; жирные кислоты; углеводы; полинуклеотиды; ДНК; РНК; анти-смысловые полинуклеотиды; сахараиды; водорастворимые дендримеры; циклодекстрины; ингибиторная рибонуклеиновая кислота; биоматериалы; наночастицы; спиновые метки; фторофоры, металлсодержащие молекулы; радиоактивные молекулы; новые функциональные группы; группы, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами; фотозахватывающие молекулы; молекулы, возбуждаемые актиничным излучением; фотоизомеризуемые молекулы; биотин; производные биотина; аналоги биотина; молекулы, содержащие тяжелые атомы; химически отщепляемые группы; фотоотщепляемые группы; удлиненные боковые цепи; связанные с углеродом сахара; окислительно-восстановительно активные агенты; аминотиоциды; токсичные молекулы; изотопно меченные молекулы; биофизические зонды; фосфоресцентные группы; хемиллюминесцентные группы; электронноплотные группы; магнитные группы; интеркалирующие группы; хромофоры; агенты переноса энергии; биологически активные агенты; детектируемые метки; малые молекулы; наночастицы (quantum dot); нанотрансмиттеры; радионуклеотиды; радиотрансмиттеры; захватывающие нейтроны агенты; или любые комбинации вышеперечисленных, или любые другие необходимые соединения или вещества. Настоящее изобретение также включает конъюгаты веществ, содержащих азидные или ацетиленовые молекулы с производными ПЭГ полимеров, содержащими соответствующие ацетиленовые или азидные молекулы. Например, ПЭГ полимер, содержащий азидную молекулу, можно присоединить к биологически активной молекуле в таком положении в белке, которое содержит негенетически кодируемую аминокислоту, содержащую ацетиленовую функциональность. Связь, через которую ПЭГ и биологически активные молекулы присоединяются, включает, без ограничения, продукт [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена.

Специалистами установлено, что ПЭГ можно использовать для модификации поверхностей биоматериалов (см., например, патент США 6610281; Mehvar, R., J. Pharm. Sci., 3(1): 125-136 (2000), который включен в описание посредством ссылки). Настоящее изобретение также включает биоматериалы, поверхность которых включает один или более из реакционноспособных азидных или ацетиленовых сайтов и один или более из азид- или ацетиленосодержащих полимеров настоящего изобретения, присоединенных к поверхности в результате [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена. Биоматериалы и другие вещества также можно присоединить к производным азид- или ацетилен-активированных полимеров через связь, отличающуюся от азидной или ацетиленовой связи, такую как связь, включающую молекулы карбоновой кислоты, амина, спирта или тиола, при этом оставляя азидные или ацетиленовые молекулы доступными для последующих реакций.

Настоящее изобретение включает способ синтеза азид- и ацетиленосодержащих полимеров настоящего изобретения. В случае азидсодержащего производного ПЭГ азид может быть связан непосредственно с атомом углерода полимера. Альтернативно, азидсодержащее производное ПЭГ можно получить, присоединяя связывающий агент, который содержит азидную молекулу с одного конца, к обычному активированному полимеру так, чтобы образовавшийся полимер содержал азидную молекулу на своем конце. В случае ацетиленосодержащих производных ПЭГ ацетилен может быть связан непосредственно с атомом углерода полимера. Альтернативно, ацетиленосодержащие производные ПЭГ можно получить, присоединяя связывающий агент, который содержит ацетиленовую молекулу на одном конце обычного активированного полимера, так, чтобы образовавшийся полимер имел ацетиленовую молекулу на своем конце.

Более конкретно, в случае азидсодержащих производных ПЭГ водорастворимый полимер, содержащий по меньшей мере одну активную гидроксильную молекулу, подвергают реакции для получения замещенного полимера, содержащего более реакционноспособные молекулы, такие как мезилат, трезилат, тозилат или отщепляемую группу галогена. Получение и использование производных ПЭГ, содержащих галогенангидриды сульфокислоты, атомы галогена и другие отщепляемые группы, известно специалистам в данной области. Полученный замещенный полимер затем подвергают реакции для замещения азидной молекулы на конце полимера на более реакционноспособную молекулу. Альтернативно, водорастворимый полимер, содержащий по меньшей мере одну активную нуклеофильную или электро-

фильную молекулу, подвергают реакции со связывающим агентом, который имеет азид на одном конце, так что образуется ковалентная связь между ПЭГ полимером и связывающим агентом, и азидная молекула располагается на конце полимера. Нуклеофильные и электрофильные молекулы, включая амины, тиолы, гидразиды, гидразины, спирты, карбоксилаты, альдегиды, кетоны, тиоэфиры и т.п., известны специалистам в данной области.

Более конкретно, в случае ацетиленсодержащих производных ПЭГ водорастворимый полимер, содержащий по меньшей мере одну активную гидроксильную молекулу, подвергают реакции для удаления галогена или другой активированной отщепляемой группы у предшественника, который содержит ацетиленовую молекулу. Альтернативно, водорастворимый полимер, содержащий по меньшей мере одну активную нуклеофильную или электрофильную молекулу, подвергают реакции со связывающим агентом, который содержит ацетилен на одном конце, так что образуется ковалентная связь между ПЭГ полимером и связывающим агентом и ацетиленовая молекула оказывается на конце полимера. Использование галогеновых молекул, активированных отщепляемых групп, нуклеофильных и электрофильных молекул в контексте органического синтеза и получения и использования производных ПЭГ хорошо изучено специалистами в данной области.

В настоящем изобретении также предложен способ селективной модификации белков для добавления других веществ к модифицированному белку, включая, без ограничения, водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ и производные ПЭГ, содержащие азидную или ацетиленовую молекулы. Азид- и ацетиленсодержащие производные ПЭГ можно использовать для модификации свойств поверхностей и молекул, в случаях, когда важны биосовместимость, стабильность, растворимость и отсутствие иммуногенности, в то же самое время обеспечивая более селективный способ присоединения производных ПЭГ к белкам, чем ранее было известно специалистам в данной области.

## II. Бычья GCSF.

Полипептиды bG-CSF настоящего изобретения можно использовать для ослабления или профилактики инфекций у животных. Биологические активности так же, как анализы для характеристики биологических активностей бычьих и человеческих G-CSF, известны специалистам в данной области. Анализы, которые включают оценку числа нейтрофилов и функций нейтрофилов, известны специалистам в данной области.

III. Общие методы рекомбинантных нуклеиновых кислот для использования в настоящем изобретении.

В многочисленных вариантах настоящего изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющий интерес полипептид bG-CSF, выделяют, клонируют и часто изменяют, используя рекомбинантные методики. Такие варианты используют, включая, без ограничения, для экспрессии белка или во время создания вариантов, производных, экспрессионных кассет или других последовательностей, полученных из полипептида bG-CSF. В некоторых вариантах последовательности, кодирующие полипептиды настоящего изобретения, операбельно связаны с гетерологичным промотором. Выделение hG-CSF и продуцирование G-CSF в клетках-хозяевах раскрыты, например, в патентах США №№ 4810643; 4999291; 5580755 и 6716606, которые включены в описание посредством ссылки.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид bG-CSF, включающий не кодируемую в природе аминокислоту, можно синтезировать на основании аминокислотной последовательности исходного полипептида, включая, без ограничения, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 2, и затем, изменяя нуклеотидную последовательность таким образом, чтобы осуществить введение (т.е. встраивание или замещение) или удаление (т.е. делецию или замещение) соответствующего аминокислотного остатка (остатков). Нуклеотидную последовательность можно удобно модифицировать, используя сайт-направленный мутагенез в соответствии с обычными способами. Альтернативно, нуклеотидную последовательность можно получить, используя химический синтез, включая, без ограничения, использование олигонуклеотидного синтезатора, где олигонуклеотиды конструируют на основании аминокислотной последовательности искомого полипептида, и предпочтительно выбирая такие кодоны, которые находятся в клетке-хозяине, в которой будут продуцироваться указанные рекомбинантные полипептиды. Например, несколько мелких олигонуклеотидов, кодирующих части искомого полипептида, можно синтезировать и собрать, используя PCR, лигирование или цепную реакцию лигирования; см., например, Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 189-193 (1991); патент США 6521427, которые включены в описание посредством ссылки.

В настоящем изобретении используют рутинные методики в области рекомбинантной генетики. Основные литературные источники, в которых раскрыты общие методы, использованные в настоящем изобретении, включают Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Krieglner, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990) и *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)).

Общие тексты, в которых описаны методики молекулярной биологии, включают Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") и *Current Protocols in Molecu-*

lar Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (дополненные до 1999) ("Ausubel"). В указанных текстах раскрыт мутагенез, использование векторов, промоторов и множество других родственных материалов, относящихся к, включая, без ограничения, созданию генов или полинуклеотидов, которые включают селекторные кодоны для производства белков, которые включают неприродные аминокислоты, ортогональные тРНК, ортогональные синтетазы и их пары.

В настоящем изобретении используют различные типы мутагенеза для различных целей, включая, без ограничения, для получения новых синтетаз или тРНК, для осуществления мутаций тРНК молекул, для осуществления мутаций полинуклеотидов, кодирующих синтетазы, для создания библиотек тРНК, для создания библиотек синтетаз, для создания селекторных кодонов, для встраивания селекторных кодонов, которые кодируют неприродные аминокислоты в представляющих интерес белках или полипептидах. Они включают, без ограничения, сайт-направленный мутагенез, случайный мутагенез, гомологические рекомбинации, перестановки в ДНК или другие рекурсивные методы мутагенеза, химерические конструкции, мутагенез с использованием урацилсодержащих матриц, олигонуклеотид-направленный мутагенез, модифицированный фосфоротиоатом ДНК мутагенез, мутагенез с использованием содержащей разрывы двухцепочечной ДНК или т.п., РСТ-опосредованный мутагенез или любую из их комбинаций. Дополнительные подходящие методы включают точечное исправление ошибок спаривания, мутагенез с использованием репарационно-дефицитных штаммов-хозяев, рестриксию-селекцию и рестриксию-очистку, мутагенез с использованием делеций, мутагенез с использованием синтеза полного гена, репарацию двухцепочечных разрывов и т.п. Мутагенез, включая, без ограничения, включающий химерические конструкции, также включен в объем настоящего изобретения. В одном варианте осуществляя мутагенез можно руководствоваться известной информацией о природных молекулах или измененных либо мутированных природных молекулах, включая, без ограничения, последовательности, сравнение последовательностей, физические свойства, вторичные, третичные или четвертичные структуры, кристаллическую структуру или т.п.

Приведенные здесь тексты и примеры раскрывают указанные процедуры. Дополнительная информация находится в следующих публикациях и ссылках, цитированных в Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal. Biochem.*, 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.*, 57: 369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science*, 229: 1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.*, 237: 1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.*, 154, 367-382 (1987); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science*, 242: 240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.*, 10: 6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.*, 100: 468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.*, 154: 329-350 (1987); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.*, 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.*, 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.*, 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., 5"-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.*, 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.*, 16: 803-814; Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.*, 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.*, 154: 350-367 (1987); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.*, 16: 7207 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.*, 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell*, 38: 879-887 (1984); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.*, 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.*, 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.*, 14: 5115 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science*, 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthe-

sis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.*, 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, *Gene*, 34: 315-323 (1985); Grundstrom et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, *Nucl. Acids Res.*, 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7177-7181 (1986); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, *Current Opinion in Biotechnology*, 4: 450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19: 456-460 (2001); W.P.C. Stemmer, *Nature*, 370, 389-91 (1994) и I.A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.*, 23, 3067-8 (1995). Дополнительные подробности относительно многих из вышеперечисленных методов можно найти в *Methods in Enzymology*, Vol. 154, где также раскрыты способы, которые можно использовать для решения диагностических проблем различных способов мутагенеза.

Олигонуклеотиды, например, для использования в мутагенезе настоящего изобретения, например библиотеки мутирующих синтетаз или изменяющихся тРНК, обычно синтезируют химическим способом, используя фосфорамидитный триэфирный способ, раскрытый Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22(20): 1859-1862, (1981), например, используя автоматический синтезатор, как раскрыто в работе Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acid Res.*, 12: 6159-6168 (1984).

Настоящее изобретение также относится к эукариотным клеткам-хозяевам, неэукариотным клеткам-хозяевам и организмам для *in vivo* встраивания неприродной аминокислоты через ортогональные тРНК/RS пары. Клетки-хозяева генетически конструируют (включая, без ограничения, трансформированные, трансдуцированные или трансфектированные), используя полинуклеотиды настоящего изобретения или конструкции, которые включают полинуклеотиды настоящего изобретения, включая, без ограничения, вектор настоящего изобретения, который может быть, например, клонирующим вектором или экспрессионным вектором. Например, кодирующие участки для ортогональной тРНК, ортогональной тРНК синтетазы и белка, подлежащие дериватизации, операбельно связывают с элементами, контролирующими генную экспрессию, которые функциональны в представляющей интерес клетке-хозяине. Указанные векторы могут быть, например, в форме плазмиды, космиды, фага, бактерии, вируса, открытого полинуклеотида или конъюгированного полинуклеотида. Указанные векторы вводят в клетки и/или микроорганизмы стандартными способами, включая электропорацию (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5824 (1985)), инфицирование вирусными векторами, высокоскоростную баллистическую бомбардировку мелкими частицами, причем нуклеиновые кислоты расположены или внутри матрицы маленьких шариков или частиц либо на их поверхности (Klein et al., *Nature* 327, 70-73 (1987)) и/или т.п. Методики, пригодные для переноса нуклеиновой кислоты в клетки *in vitro*, включают использование липосом, микроинъекций, гибридизации клеток, DEAE-декстрана, способа кальцийфосфатного осаждения и т.д. Способы *in vivo* генного переноса включают кальцийфосфатное осаждение, трансфекцию вирусными (обычно ретровирусными) векторами и липосомально опосредованную трансфекцию покрытого вирусом белка [Dzau et al., *Trends in Biotechnology*, 11, 205-210 (1993)]. В некоторых ситуациях может оказаться желательным создать источник нуклеиновой кислоты с агентом, который нацелен на клетки-мишени, таким как антитело, специфическое для мембранного белка клеточной поверхности или клетки-мишени, лиганд для рецептора на клетке-мишени и т.д. В тех случаях, когда используют липосомы, белки, которые связываются с мембранным белком клеточной поверхности, связанным с эндоцитозом, можно использовать для нацеливания и/или облегчения захвата, например, капсидных белков или их фрагментов, тропных для конкретного типа клеток, антител к белкам, которые подверглись интернализации во время клеточного цикла, белков, которые нацелены на внутриклеточную локализацию и увеличивают период внутриклеточной полужизни.

Сконструированные клетки-хозяева можно культивировать в обычной питательной среде, модифицированной в соответствии с такими активностями, как, например, стадии скрининга, активация промоторов или выбор трансформантов. Такие клетки можно необязательно культивировать в трансгенных организмах. Другие полезные ссылки включают, без ограничения, для выделения и культивирования клеток (например, для последующего выделения нуклеиновой кислоты) Freshney (1994) *Cultivation of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York и цитированные там ссылки, Payne et al (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, Gamborg and Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Beilm Heidelberg New York) и Atlas и Paiks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Существуют несколько хорошо известных способов введения нуклеиновых кислот-мишеней в клетки, причем любой из них можно использовать в настоящем изобретении. Они включают гибридизацию клеток-реципиентов с бактериальными протопластами, содержащими ДНК, электропорацию, бомбардировку частицами и инфицирование вирусными векторами (обсуждаются далее) и т.д. Бактериальные клетки можно использовать для амплификации ряда плазмид, содержащих ДНК конструкции настоящего изобретения. Бактерии выращивают до логарифмической фазы, и плазмиды из бактерий можно выделить различными способами, хорошо известными специалистам (см., например, Sambrook). Кроме того, коммерчески доступны наборы для выделения плазмид из бактерий, (см., например, EasyPier™,

FlexiPrep™, оба от Pharmacia Biotech; StrataClean™ от Stratagene и QIAprep™ от Qiagen). Выделенные и очищенные плазмиды затем используют для получения других плазмид, которые используют для трансфекции клеток или включения в родственные векторы для инфицирования организмов. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности, иницирующие транскрипцию и трансляцию, и промоторы, которые можно использовать для регулирования экспрессии конкретных нуклеиновых кислот-мишеней. Указанные векторы необязательно включают генетические экспрессионные кассеты, содержащие по меньшей мере одну независимую последовательность терминации, последовательности, обеспечивающие репликацию кассеты в эукариотах или в прокариотах, или в тех и других (включая, без ограничения, шаттл-векторы) и селекционные маркеры как для прокариотных, так и для эукариотных систем. Векторы пригодны для репликации и интеграции в прокариоты, эукариоты или и в те и другие; см., Gillam & Smith, *Gene*, 8:81 (1979); Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., et al., *Protein Expr. Purif.* 6(1): 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (all supra). Каталог бактерий и бактериофагов, которые можно использовать для клонирования, представлен, например, ATCC, например *gfr The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage* (1992) Gherna et al. (eds), опубликованный ATCC. Дополнительные основные процедуры для секвенирования, клонирования и других аспектов молекулярной биологии и основополагающих теоретических рассмотрений также можно найти у Watson et al. (1992) *Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books*, NY. Кроме того, практически любую нуклеиновую кислоту (и, возможно, любую меченую нуклеиновую кислоту независимо от того, является она стандартной или нестандартной) можно купить или обычным образом заказать в любом из различных коммерческих источников, таких как Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, доступно на World Wide Web на сайте [merc.com](http://merc.com)), The Great American Gene Company (Ramona, CA, доступно на World Wide Web at [genco.com](http://genco.com)), ExpressGen Inc. (Chicago, IL, доступно на World Wide Web at [expressgen.com](http://expressgen.com)), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) и многих других.

#### Селекторные кодоны

Селекторные кодоны настоящего изобретения расширяют границы генетических кодонов белковых биосинтетических методов. Например, селекторные кодоны включают, без ограничения, уникальный трехосновной кодон, "бессмысленный" кодон, такой как стоп-кодон, включая, без ограничения, янтарный кодон (UAG), охра-кодон или опал-кодон (UGA), неприродный кодон, кодон, содержащий четыре или более оснований, редкий кодон или т.п.

Специалистам в данной области совершенно очевидно, что существует широкий круг селекторных кодонов, которые можно встраивать в нужный ген или полинуклеотид, включая, без ограничения, один или более, два или более, три или более, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более в один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере часть полипептида bG-CSF.

В одном варианте указанные способы включают использование селекторного кодона, который представляет собой стоп-кодон для встраивания одной или более из неприродных аминокислот *in vivo*. Например, получают О-тРНК, который распознает стоп-кодон, включая, без ограничения, UAG, и аминосинтезируют, используя О-RS с необходимой неприродной аминокислотой. Такая О-тРНК не распознается встречающейся в природе аминоацил-тРНК синтетазой хозяина. Обычный сайт-направленный мутагенез можно использовать для встраивания стоп-кодона, включая, без ограничения, TAG, в представляющий интерес сайт представляющего интерес полипептида; см., например, Sayers, J.R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorotioate-based oligonucleotide directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, 16:791-802. Если О-RS, О-тРНК и нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющий интерес полипептид, комбинируют *in vivo*, неприродную аминокислоту включают в ответ на UAG кодон, получая полипептид, содержащий неприродную аминокислоту в специфическом положении.

Такое встраивание неприродных аминокислот *in vivo* можно осуществить без заметной перестройки эукариотных клеток-хозяев. Например, так как эффективность супрессии для UAG кодона зависит от конкуренции между О-тРНК, включая, без ограничения, янтарным супрессором тРНК и эукариотным фактором освобождения (включая, без ограничения, eRF) (который связывается со стоп-кодоном и иницирует освобождение растущего пептида из рибосомы), причем эффективность супрессии можно модулировать, включая, без ограничения, повышение уровня экспрессии О-тРНК и/или супрессорной тРНК.

Неприродные аминокислоты могут также кодироваться редкими кодонами. Например, если концентрация аргинина в *in vitro* реакции синтеза белка понижена, редкий кодон аргинина, AGG, как было доказано, эффективен для встраивания Ala синтетической тРНК, ацилированной аланином; см., например, Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). В таком случае синтетическая тРНК конкурирует с неприродной тРНК-arg, которая существует как минорный вид в *Escherichia coli*. Некоторые организмы не используют все триплетные кодоны. Неопределенный кодон AGA в *Micrococcus luteus* был использован для встраивания аминокислоты в *in vitro* транскрипционный/трансляционный экстракт; см., например, Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4 685 (1997). Компоненты настоящего изобретения могут быть созданы для использования таких редких кодонов *in vivo*.

Селекторные кодоны также включают расширенные кодоны, включая, без ограничения, кодоны из четырех или более оснований, например кодоны из четырех, пяти, шести или более оснований. Примеры кодонов из четырех оснований включают, без ограничения, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU и т.п. Примеры

рами кодонов, которые включают пять оснований, без ограничения, являются AGGAC, CCCCUC, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC и т.п. Признаки настоящего изобретения включают использование расширенных кодонов, основанных на супрессии со сдвигом рамки. Кодоны, включающие четыре или более оснований, могут встраивать, включая, без ограничения, одну или несколько неприродных аминокислот в один и тот же белок. Например, в присутствии мутированных О-тРНК, включая, без ограничения, специальные супрессорные тРНК со сдвигом рамки, антикодоновыми петлями, например по меньшей мере с 8-10 антикодоновыми петлями, кодон, содержащий четыре или более оснований, считывается как одна аминокислота. В других вариантах антикодоновые петли можно раскодировать, включая, без ограничения, по меньшей мере, кодон, содержащий четыре основания, по меньшей мере, кодон, содержащий пять оснований, по меньшей мере, кодон, содержащий шесть оснований или больше. Так как существуют 256 возможных кодонов из четырех оснований, множество неприродных аминокислот может быть закодировано в одной и той же клетке, используя кодоны с четырьмя или более основаниями; см., Anderson et al. (2002) *Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size*, *Chemistry and Biology*, 9:237-244; Magliery (2001) *Expanding Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 307: 755-769.

Например, кодоны, включающие четыре основания, были использованы для встраивания неприродных аминокислот в белки, используя *in vitro* методы биосинтеза; см., например, Ma et al. (1993) *Biochemistry*, 32:7939 и Hohsaka et al. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:34. CGGG и AGGU были использованы для одновременного включения 2-нафтилаланина и NBD производного лизина в стрептавидин *in vitro* с помощью двух химически ацилированных супрессорных тРНК со сдвигом рамки; см., например, Hohsaka et al. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194. В *in vivo* исследовании Moore et al. исследовали способность тРНК Leu производных с NCUA антикодонами подавлять UAGN кодоны (N могут быть U, A, G или C) и обнаружили, что квадруплет UAGA может быть раскодирован с использованием тРНК Leu с UCUA антикодоном с эффективностью от 13 до 26% при незначительном декодировании в 0 или -1 рамке; см. Moore et al. (2000) *J. Mol. Biol.*, 298: 195. В одном варианте в настоящем изобретении можно использовать расширенные кодоны, основанные на редких кодонах или "бессмысленных" кодонах, что может снизить бессмысленное считывание и супрессию со сдвигом рамки на внешних нежелательных сайтах.

Для конкретной системы селекторный кодон может также включать один из природных кодонов из трех оснований, где эндогенная система не использует (или редко использует) природный кодон. Например, это включает систему, в которой отсутствует тРНК, которая распознает природный кодон из трех оснований, и/или систему, в которой кодон из трех оснований является редким кодоном.

Селекторные кодоны необязательно включают пары неприродных оснований. Такие пары неприродных оснований далее расширяют существующий генетический алфавит. Одна дополнительная пара оснований увеличивает количество триплетных кодонов с 64 до 125. Характеристики третьих пар оснований включают стабильное и селективное спаривание оснований, эффективное ферментативное встраивание в ДНК с высокой точностью полимеразой и эффективное продолжение расширения праймера после синтеза образующейся неприродной пары оснований. Описания неприродных пар оснований, которые можно адаптировать к способам и композициям, включают, например, перечисленные Hiraio, et al., (2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, *Nature Biotechnology*, 20: 177-182; см. также Wu, Y., et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 14626-14630. Другие родственные публикации перечислены далее.

Для использования *in vivo* неприродный нуклеозид является мембрано-проницаемым и фосфорилирован до образования соответствующего трифосфата. Кроме того, повышенная генетическая информативность стабильна и не нарушается клеточными ферментами. Предыдущие попытки Venner и остальных извлечь преимущество из схем водородного связывания, которое отличается от схем связывания в канонических парах Уотсона-Крика, наиболее заслуживающим внимание примером которого служит пара, которая представляет собой изо-С:изо-G пару; см., например, Switzer et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322 и Piccirilli et al. (1990) *Nature*, 343:33; Kool (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602. Указанные основания обычно до некоторой степени ошибочно спариваются с природными основаниями и не могут быть ферментативно реплицированы. Kool с сотрудниками продемонстрировали, что гидрофобные взаимодействия упаковки между основаниями могут заменить водородное связывание для управления образованием пар оснований; см. Kool (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602 и Guckian and Kool (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. В попытках создать неприродную пару оснований, удовлетворяющую всем вышеперечисленным требованиям, Schultz, Romesberg с сотрудниками систематически синтезировали и исследовали ряд неприродных гидрофобных оснований. Было обнаружено, что PICS:PICS (собственная) пара более стабильна, чем природные пары оснований, и может быть эффективно встроена в ДНК с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I *Escherichia coli* (KF); см., например, McMinn et al. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6 и Ogawa et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274. Можно синтезировать собственную пару 3MN:3MN с помощью KF с эффективностью и селективностью, достаточными для биологических функций; см., например, Ogawa et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803. Однако оба основания действуют как терминаторы цепи для дальнейшей репликации. Недавно была создана мутантная

ДНК полимеразы, которую можно использовать для репликации собственной пары PICS. Кроме того, собственную пару 7AI можно реплицировать; см., например, Tae et al. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439. Также была создана новая пара металлооснований Dpic:Py, которая образует стабильную пару после связывания с Cu(II); см., Meggers et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714. Так как расширенные кодоны и неприродные кодоны взаимно ортогональны с природными кодонами, указанные способы настоящего изобретения могут получить преимущество, используя указанное свойство для создания ортогональных тРНК для них.

Трансляционную обходную систему также можно использовать для включения неприродной аминокислоты в целевой полипептид. В трансляционной обходной системе в геном включают большую последовательность, но не транслируют в белок. Указанная последовательность содержит структуру, которая служит ключом к индуцированию "перескока" рибосомы через последовательность и продолжению трансляции в прямом направлении от вставки.

В некоторых вариантах представляющий интерес белок или полипептид (или их часть) в указанных способах и/или композициях настоящего изобретения кодируются нуклеиновой кислотой. Обычно нуклеиновая кислота включает по меньшей мере один селекторный кодон, по меньшей мере два селекторных кодона, по меньшей мере три селекторных кодона, по меньшей мере четыре селекторных кодона, по меньшей мере пять селекторных кодонов, по меньшей мере шесть селекторных кодонов, по меньшей мере семь селекторных кодонов, по меньшей мере восемь селекторных кодонов, по меньшей мере девять селекторных кодонов, десять или больше селекторных кодонов.

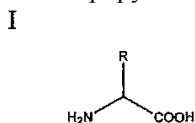
Можно осуществить мутацию генов, кодирующих представляющие интерес белки или полипептиды, используя методы, известные специалистам в данной области и раскрытые здесь, чтобы включить, например, один или более из селекторных кодонов для встраивания неприродной аминокислоты. Например, нуклеиновую кислоту для представляющего интерес белка подвергают мутации для включения одного или более из селекторных кодонов, обеспечивающих встраивание одной или более из неприродных аминокислот. Настоящее изобретение включает любой такой вариант, включая, без ограничения, мутанты, версии любого белка, например, включающего по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. Аналогично, настоящее изобретение также включает соответствующие нуклеиновые кислоты, то есть любую нуклеиновую кислоту, содержащую один или более из селекторных кодонов, которые кодируют одну или более из неприродных аминокислот.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие представляющий интерес белок, такой как полипептид bG-CSF, можно легко подвергнуть мутации для введения цистеина в любое необходимое положение полипептида. Цистеин широко используют для введения реакционноспособных молекул, водорастворимых полимеров, белков или широкого круга других молекул в представляющий интерес белок. Методы, пригодные для встраивания цистеина в нужное положение полипептида, хорошо известны специалистам в данной области, такие как те, что раскрыты в патенте США № 6608183, который включен в описание посредством ссылки, и стандартные методики мутагенеза.

#### IV. Не кодируемые в природе аминокислоты.

Для использования в настоящем изобретении пригоден широкий круг разнообразных не кодируемых в природе аминокислот. В полипептид bG-CSF можно ввести любое количество не кодируемых в природе аминокислот. Обычно введенные не кодируемые в природе аминокислоты являются практически химически инертными в отношении 20 обычных, генетически кодируемых аминокислот (т.е. аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина). В некоторых вариантах не кодируемые в природе аминокислоты включают функциональные группы боковых цепей, которые реагируют эффективно и селективно с функциональными группами, которые не находятся в 20 обычных аминокислотах (включая, без ограничения, азидные, кетонные, альдегидные и аминоксигруппы), с образованием стабильных конъюгатов. Например, полипептид bG-CSF, который включает не кодируемую в природе аминокислоту, содержащую азидную функциональную группу, можно подвергнуть взаимодействию с полимером (включая, без ограничения, поли(этиленгликоль) или, альтернативно, второй полипептид, содержащий алкиновую молекулу, с образованием стабильного конъюгата, полученного для селективной реакции азидной и алкинной функциональных групп с образованием [3+2] продукта циклоприсоединения Хьюсена.

Общая структура альфа-аминокислоты иллюстрируется следующим образом (формула I):



Не кодируемая в природе аминокислота обычно является любой структурой, содержащей вышеуказанную формулу, где R группа представляет собой любой заместитель, отличающийся от одного, использованного в двадцати природных аминокислотах, и может оказаться подходящим для использования в настоящем изобретении. Так как не кодируемые в природе аминокислоты настоящего изобретения

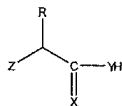


обычно отличаются от природных аминокислот только строением боковой цепи, не кодируемые в природе аминокислоты образуют амидные связи с другими аминокислотами, включая, без ограничения, природные или не кодируемые в природе аминокислоты, таким же образом как они образуют встречающиеся в природе полипептиды. Однако не кодируемые в природе аминокислоты содержат группы боковых цепей, которые отличают их от природных аминокислот. Например, R необязательно включает алкил-, арил-, ацин-, кето-, азидо-, гидроксил-, гидразин, циано-, галоген-, гидразид, алкенил, алкинил, простой эфир, тиол, селено-, сульфонил-, борат, боронат, фосфо, фосфоно, фосфин, гетероцикл, енон, имин, альдегид, сложный эфир, тиокислоту, гидроксилламин, аминогруппу или т.п. либо любую их комбинацию. Другие представляющие интерес неприродные аминокислоты, которые могут быть полезны для использования в настоящем изобретении, включают, без ограничения, аминокислоты, включающие фотоактивируемый кросс-линкерный агент, спин-меченые аминокислоты, флуоресцентные аминокислоты, связывающие металл аминокислоты, металлсодержащие аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты с новыми функциональными группами, аминокислоты, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотосостариваемые и/или фотоизомеризуемые аминокислоты, аминокислоты, включающие биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, такие как сахаром замещенный серин, другие модифицированные углеводами аминокислоты, кетосодержащие аминокислоты, аминокислоты, включающие полиэтиленгликоль или полиэфир, аминокислоты, замещенные тяжелыми атомами, химически расщепляемые и/или фоторасщепляемые аминокислоты, аминокислоты с удлиненными боковыми цепями по сравнению с природными аминокислотами, включая, без ограничения, полиэфир или углеводороды с длинной цепью, включающие более чем около 5 или более чем около 10 атомов углерода, связанные с углеродом сахаросодержащие аминокислоты, окислительно-восстановительно активные аминокислоты, аминокислоты, содержащие аминотиокислоту, и аминокислоты, включающие одну или более токсических молекул.

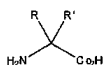
Примеры не кодируемых в природе аминокислот, которые могут пригодиться для использования в настоящем изобретении, и тех, которые можно использовать для реакций с водорастворимыми полимерами, включают, без ограничения, аминокислоты с карбонильной, аминококси, гидразиновой, гидразидной, семикарбазидной, азидной и алкинной реакционноспособными группами. В некоторых вариантах не кодируемые в природе аминокислоты включают сахаридную молекулу. Примеры таких аминокислот включают N-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, N-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-аспарагин и O-маннозаминил-L-серин. Примеры таких аминокислот также включают примеры аминокислот, в которых встречающуюся в природе N- или O-связь между аминокислотой и сахаридом заменяют на ковалентную связь, которая обычно не встречается в природе, включая, без ограничения, алкен, оксим, тиоэфир, амид и т.п. Примеры таких аминокислот также включают сахараиды, которые обычно не встречаются в природных белках, такие как 2-деокси-глюкоза, 2-деоксигалактоза и т.п.

Многие из представленных здесь не кодируемых в природе аминокислот являются коммерчески доступными, например, от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (отделение EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) или от Peptech (Burlington, MA, USA). Те аминокислоты, которые коммерчески недоступны, можно необязательно синтезировать, как здесь раскрыто, или используя стандартные способы, хорошо известные специалистам в данной области. Для методов органического синтеза см., например, Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley и Sons, New York) и Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A и B, 1990, Plenum Press, New York); см. также патенты США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в описание посредством ссылки. В дополнении к неприродным аминокислотам, которые содержат новые боковые цепи, неприродные аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, также необязательно включают модифицированные структуры основных цепей, включая, без ограничения, те, что проиллюстрированы структурными формулами II и III

II



III



где Z обычно включает OH, NH<sub>2</sub>, SH, NH-R' или S-R'; X и Y, которые могут быть одинаковы или различны, обычно включают S или O; R и R', которые необязательно одинаковы или различны, обычно выбирают из того же списка составляющих, что и для R группы, раскрытых выше для неприродных аминокислот формулы I, а также из водорода. Например, неприродные аминокислоты настоящего изобретения необязательно включают замещения в аминогруппе или в карбоксильной группе, что проиллюстри-

ровано формулами II и III. Неприродные аминокислоты такого типа включают, без ограничения,  $\alpha$ -гидроксикислоты,  $\alpha$ -тиокислоты,  $\alpha$ -аминтиокарбоксилаты, включая, без ограничения, аминокислоты с боковыми цепями, соответствующими цепями в обычных двадцати природных аминокислотах или с неприродными боковыми цепями. Кроме того, замещения у  $\alpha$ -углерода необязательно включают, без ограничения, L, D или  $\alpha$ - $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, такие как D-глутамат, D-аланин, D-метил-О-тирозин, аминокислоту и т.п. Другие структурные альтернативы включают циклические аминокислоты, такие как аналоги пролина, также как 3, 4, 6, 7, 8 и 9-членные кольцевые аналоги пролина,  $\beta$  и  $\gamma$  аминокислоты, такие как замещенные  $\beta$ -аланин и  $\gamma$ -аминоасляная кислота.

Многие неприродные аминокислоты основаны на природных аминокислотах, таких как тирозин, глутамин, фенилаланин и т.п., и они пригодны для использования в настоящем изобретении. Аналоги тирозина включают, без ограничения, пара-замещенные тирозины, орто-замещенные тирозины и мета-замещенные тирозины, где замещенный тирозин включает, включая, без ограничения, кетогруппу (включая, без ограничения, ацильную группу), группу бензоила, аминогруппу, гидразин, гидроксамин, группу тиола, карбоксигруппу, изопропильную группу, метильную группу, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> неразветвленную цепь или разветвленный углеводород, насыщенный или ненасыщенный углеводород, O-метильную группу, полиэфирную группу, нитрогруппу, алкинильную группу или т.п. Кроме того, также рассматриваются многократно замещенные арильные кольца. Аналоги глутамина, которые могут быть полезными для использования в настоящем изобретении, включают, без ограничения,  $\alpha$ -гидроксипроизводные,  $\gamma$ -замещенные производные, циклические производные и амидзамещенные производные глутамина. Примеры аналогов фенилаланина, которые могут быть полезными для использования в настоящем изобретении включают, без ограничения, паразамещенные фенилаланины, ортозамещенные фенилаланины и метазамещенные фенилаланины, где заместители включают, включая, без ограничения, гидроксигруппу, метоксигруппу, метильную группу, аллильную группу, альдегидную, азидную, йодо-, бромо-, кетогруппу (включая, без ограничения, ацетильную группу), бензоил, алкинильную группу или т.п. Конкретные примеры неприродных аминокислот, которые могут быть полезны для использования в настоящем изобретении, включают, без ограничения, п-ацил-L-фенилаланин, O-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-акил-GlcNA $\beta$ -серин, L-Dopa, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфосерин, фосфотирозин, п-йодофенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин и п-пропаргилоксифенилаланин и т.п. Примеры структур различных неприродных аминокислот, которые могут быть полезны для использования в настоящем изобретении, представлены, например, в WO 2002/085923, озаглавленном "In vivo incorporation of unnatural amino acids"; см. также Kiick et al. (2002) Incorporation of azides in recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS, 99:19-24, которые включены в описание посредством ссылки для дополнительных аналогов метионина. В международной заявке № PCT/US06/47822, озаглавленной "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides", которые включены в описание посредством ссылки, раскрыто восстановительное алкилирование ароматических аминокислот, включая, без ограничения, п-аминофенилаланин, и восстановительное аминирование.

В одном варианте предложены композиции полипептида bG-CSF, включающего неприродную аминокислоту (такие как п-(пропаргилокси)фенилаланин). Предложены также различные композиции, включающие п-(пропаргилокси)фенилаланин и, включая, без ограничения, белки и/или клетки. В одном аспекте композиция, которая включает п-(пропаргилокси)фенилаланин, неприродную аминокислоту, кроме того, включает ортогональную тРНК. Неприродная аминокислота может быть связана (включая, без ограничения, ковалентно) с ортогональной тРНК, включающей, без ограничения, ковалентную связь с ортогональной тРНК через amino-ацильную связь, ковалентно связанную с 3' OH или 2' OH концом рибозного сахара ортогональной тРНК и т.д.

Химические молекулы через неприродные аминокислоты, которые могут быть включены в белки, предлагают разнообразные преимущества манипуляций с белками. Например, уникальная реакционная способность кетофункциональной группы позволяет селективно модифицировать белки любым количеством гидразин- или гидроксилламинсодержащих реагентов *in vitro* и *in vivo*. Содержащие тяжелые металлы неприродные аминокислоты, например, могут быть такими, которые можно использовать для фазирования результатов структурного рентгеновского анализа. Сайт-специфическое встраивание тяжелых металлов с помощью неприродных аминокислот также обеспечивает селективность и гибкость в выборе положения для тяжелых атомов. Фотореакционноспособные неприродные аминокислоты (включая, без ограничения, аминокислоты с бензофеноном и ариламидами (включая, без ограничения, фенилазид) в боковых цепях), например, позволяют эффективно *in vivo* и *in vitro* осуществлять фотосшивание белков. Примеры фотореакционноспособных неприродных аминокислот включают, без ограничения, п-азидофенилаланин и п-бензоилфенилаланин. Белок с фотореакционноспособными неприродными аминокислотами можно затем сшить при желании за счет возбуждения фотореакционноспособной группы, обеспечивающей температурный контроль. В одном примере метильная группа неприродной аминокис-

лоты может быть замещена изотопно меченной группой, включая, без ограничения, метильную группу в качестве зонда локальной структуры и динамики, включая, без ограничения, исследования с использованием ядерного магнитного резонанса и колебательной спектроскопии. Алкинильные или азидные функциональные группы, например, позволяют осуществить селективную модификацию белков молекулами в результате реакции [3+2] циклоприсоединения.

Неприродные аминокислоты, включенные в полипептид, у аминоконца могут состоять из R группы, которая представляет собой любой заместитель, отличающийся от заместителя, используемого в двадцати природных аминокислотах и второй реакционноспособной группе, отличающейся от NH<sub>2</sub> группы, которая обычно присутствует в α-аминокислотах (см. формулу I). Аналогичные неприродные аминокислоты могут быть включены на карбоксильном конце за счет второй реакционноспособной группы, отличающейся от COOH группы, которая обычно присутствует в α-аминокислотах (см. формулу I).

Неприродные аминокислоты настоящего изобретения можно выбрать или сконструировать для придания им дополнительных характеристик, не существующих у двадцати природных аминокислот. Например, неприродную аминокислоту можно необязательно сконструировать или выбрать таким образом, чтобы модифицировать биологические характеристики белка, например белка, в который они включены. Например, следующие характеристики можно необязательно модифицировать путем включения в белок неприродной аминокислоты: токсичность, биораспределение, растворимость, стабильность, например термическую, гидролитическую, оксидативную устойчивость в отношении ферментативного разложения и т.п., простоту выделения и процессинга, структурные характеристики, спектроскопические характеристики, химические и/или фотохимические свойства, каталитическую активность, окислительно-восстановительный потенциал, время полужизни, способность реагировать с другими молекулами, например ковалентно или нековалентно, и т.п.

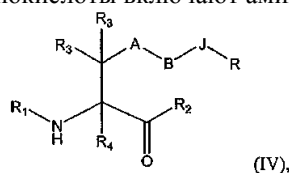
#### **Структура и синтез неприродных аминокислот: карбонильные, карбонилоподобные, маскированные карбонильные, защищенные карбонильные группы и гидроксилламинные группы**

В некоторых вариантах настоящего изобретения предложены bG-CSF, связанные с водорастворимым полимером, например ПЭГ, оксимной связью.

Многие типы не кодируемых в природе аминокислот можно использовать для создания оксимных связей. Такие связи включают, без ограничения, не кодируемые в природе аминокислоты, содержащие карбонильную, дикарбонильную или гидроксилламинную группу. Такие аминокислоты раскрыты в патентных публикациях США №№ 2006/0194256, 2006/0217532, 2006/0217289 и WO 2006/069246, озаглавленной "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте. Не кодируемые в природе аминокислоты также раскрыты в патенте США № 7083970 и в патенте США № 7045337, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах настоящего изобретения используют полипептиды bG-CSF, которые замещены в одном или более из положений пара-ацетилфенилаланиновой аминокислоты. Синтез п-ацетил-(+/-)-фенилаланина и м-ацетил-(+/-)-фенилаланина раскрыт у Zhang, Z., et al., *Biochemistry*, 42: 6735-6746 (2003), что включено в описание посредством ссылки. Другие карбонил- или дикарбонилсодержащие аминокислоты специалисты могут получить аналогичным способом. Кроме того, нелимитирующие примеры синтеза неприродных аминокислот, которые включены сюда, представлены на фиг. 4, 24-34 и 36-39 патента США № 7083970, который включен в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

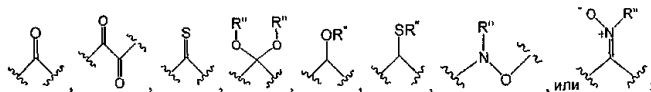
Аминокислоты с электрофильной реакционноспособной группой позволяют осуществлять разнообразные реакции для связывания молекул, используя, наряду с другими, реакции нуклеофильного присоединения. Такие электрофильные реакционноспособные группы включают карбонильную группу (включая кетогруппу и дикарбонильную группу), карбонило-подобную группу (которая обладает реакционной способностью, аналогичной реакционной способности карбонильной группы (включая кетогруппу и карбонильную группу) и структурно аналогична карбонильной группе), маскированную карбонильную группу (которую можно легко превратить в карбонильную группу (включая кетогруппу и дикарбонильную группу)) или защищенную карбонильную группу (которая обладает реакционной способностью, аналогичной способности карбонильной группы (включая кетогруппу и дикарбонильную группу) после удаления защитной группы). Такие аминокислоты включают аминокислоты структурной формулы (IV)



где А необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, где k принимает значения 1, 2 или 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- и -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

J представляет собой



R представляет собой H, алкил, замещенный алкил или замещенный циклоалкил; каждый R" независимо представляет собой H, алкил, замещенный алкил или защитную группу или, если присутствует более чем одна R" группа, два R" необязательно образуют гетероциклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый из R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляет собой H, галоген, низший алкил или замещенный низший алкил; или

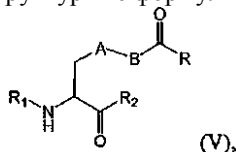
R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> или две R<sub>3</sub> группы необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил; или

-A-B-R группы вместе образуют бициклический или трициклический циклоалкил или гетероциклоалкил, включающий по меньшей мере одну карбонильную группу, включая дикарбонильную группу, защищенную карбонильную группу, включая защищенную дикарбонильную группу или маскированную карбонильную группу, включая маскированную дикарбонильную группу; или

-J-R группы вместе образуют моноциклический или бициклический циклоалкил или гетероциклоалкил, включающий по меньшей мере одну карбонильную группу, включая дикарбонильную группу, защищенную карбонильную группу, включая защищенную дикарбонильную группу, или маскированную карбонильную группу, включая маскированную дикарбонильную группу,

при условии, что, если A представляет собой фенилен и каждый R<sub>3</sub> представляет собой H, B присутствует; и что, если A представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- и каждый R<sub>3</sub> представляет собой H, B не может быть -NHCO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; и что, если A и B отсутствуют и каждый R<sub>3</sub> представляет собой H, R не может представлять собой метил.

Кроме того, соединения, имеющие структурные формулы (V), включают



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)<sub>k</sub> - где k принимает значения 1, 2 или 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- и -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

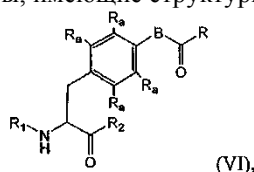
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид,

при условии, что, если А представляет собой фенилен, В присутствует; и что, если А представляет собой  $-(CH_2)_4-$ , В не может быть  $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ ; и что, если А и В отсутствуют, R не может представлять собой метил.

Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структурную формулу (VI)



где В представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена,  $-O-$ ,  $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S-$ ,  $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S(O)_k-$  где k представляет собой 1, 2 или 3,  $-S(O)_k$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')$ -,  $-NR'$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)N(R')$ -,  $-CON(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-CSN(R')$ -,  $-CSN(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')CO-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')C(O)N(R')$ -,  $-N(R')C(S)N(R')$ -,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $-C(R')=N-N(R')$ -,  $C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N-$  и  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

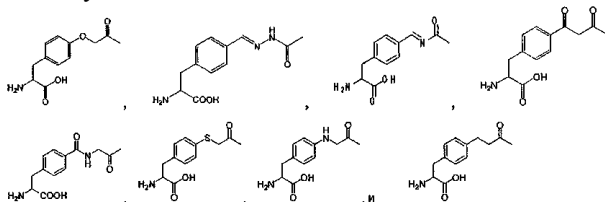
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

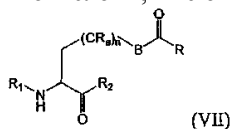
каждый  $R_a$  независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила,  $-N(R')$ ,  $-C(O)_kR'$ , где k принимает значения 1, 2 или 3,  $-C(O)N(R')$ ,  $-OR'$  и  $-S(O)_kR'$ , где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, по карбоксильной группе или их соли. Кроме того, любые из следующих неприродных аминокислот могут быть включены в полипептид с природными аминокислотами.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (VII):



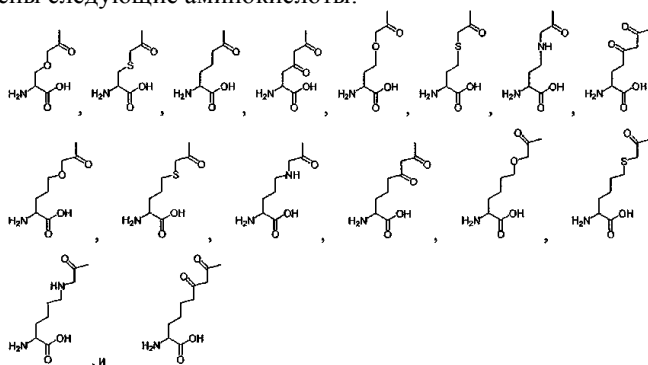
где В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена,  $-O-$ ,  $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S-$ ,  $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S(O)_k-$ , где k принимает значения 1, 2 или 3,  $-S(O)_k$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')$ -,  $-NR'$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)N(R')$ -,  $-CON(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-CSN(R')$ -,  $-CSN(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')CO-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')C(O)N(R')$ -,  $N(R')C(S)N(R')$ -,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $C(R')=N-N(R')$ -,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N-$  и  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

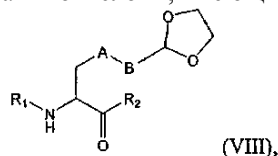
$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый  $R_a$  независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , где  $k$  принимает значения 1, 2 или 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  и  $-S(O)_kR'$ , где каждый  $R'$  независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил; и  $p$  принимает значения от 0 до 8, при условии, что если  $A$  представляет собой  $-(CH_2)_4-$ ,  $B$  не может быть  $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ . Кроме того, включены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, необязательно по карбоксильной группе, или их соли. Кроме того, указанные аминокислоты и любые из следующих не природных аминокислот могут быть включены в полипептид с не природными аминокислотами.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (VIII):



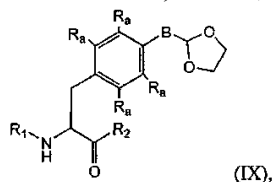
где  $A$  необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

$B$  необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена,  $-O-$ ,  $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S-$ ,  $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S(O)_k-$ , где  $k$  представляет собой 1, 2 или 3,  $-S(O)_k$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $C(S)-$ ,  $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')-$ ,  $-NR'-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-CON(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-CSN(R')-$ ,  $-CSN(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')CO-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')-$ ,  $-N(R')C(O)N(R')-$ ,  $N(R')C(S)N(R')-$ ,  $-N(R')S(O)_kN(R')-$ ,  $-N(R')N=N-$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $C(R')=N-N(R')-$ ,  $-C(R')=N-N-$ ,  $-C(R')_2=N=N-$  и  $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ , где каждый  $R'$  независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (IX):



где  $B$  необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена,  $-O-$ ,  $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S-$ ,  $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S(O)_k-$ , где  $k$  представляет собой 1, 2 или 3,  $-S(O)_k$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')-$ ,  $-NR'-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)N(R')-$ ,  $-CON(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-CSN(R')-$ ,  $-CSN(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')CO-($ алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')-$ ,

$-N(R')C(O)N(R')-$ ,  $N(R')C(S)N(R')-$ ,  $-N(R')S(O)_kN(R')-$ ,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $C(R')=N-N(R')-$ ,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N-$  и  $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ , где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

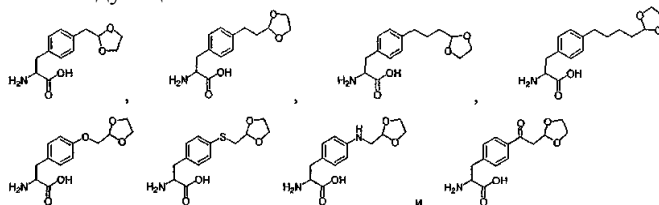
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминокзащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

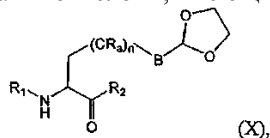
где каждый R<sub>a</sub> независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , где k принимает значения 1, 2 или 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  и  $-S(O)_kR'$ , где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, необязательно защищены по карбоксильной группе, необязательно защищены по аминогруппе и карбоксильной группе, или их соли. Кроме того, указанные не природные аминокислоты и любые из следующих не природных аминокислот могут быть включены в полипептид с не природными аминокислотами.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурные формулы (X):



где B необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена,  $-O-$ ,  $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S-$ ,  $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-S(O)_k-$  где k принимает значения 1, 2 или 3,  $-S(O)_k$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')$ ,  $-NR'$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-C(O)N(R')$ ,  $-CON(R')$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-CSN(R')$ ,  $-CSN(R')$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')CO-$ (алкилен или замещенный алкилен)-,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')C(O)N(R')$ ,  $N(R')C(S)N(R')$ ,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $-C(R')=N-N(R')$ ,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N-$  и  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ , где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

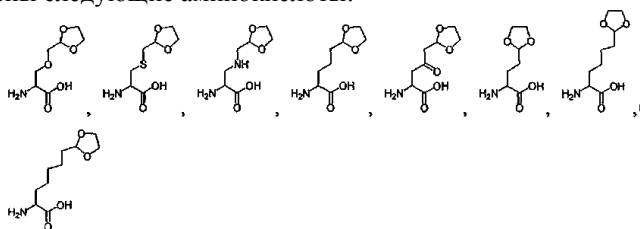
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминокзащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый R<sub>a</sub> независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , где k принимает значения 1, 2 или 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  и  $-S(O)_kR'$ , где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил и n принимает значения от 0 до 8.

Кроме того, включены следующие аминокислоты:

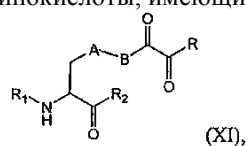


где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, необязательно защищены по карбоксильной группе, необязательно защищены по аминогруппе и карбоксильной группе, или их соли. Кроме того, указанные не природные аминокислоты и любые из следующих не природных аминокислот могут быть включены в полипептид с не природными аминокислотами.

Кроме монокарбонильных структур, раскрытые здесь не природные аминокислоты могут включать такие группы, как дикарбонильная, дикарбонило-подобная, маскированная дикарбонильная и защищен-

ная дикарбонильная группы.

Например, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XI):



где А необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

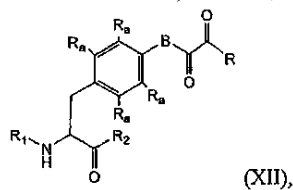
В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, где k принимает значения 1, 2 или 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- и -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XII):



где В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, где k принимает значения 1, 2 или 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- и -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

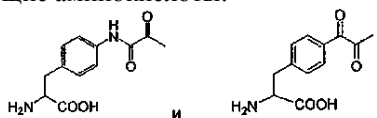
R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

где каждый R<sub>a</sub> независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', где k принимает значения 1, 2 или 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' и -S(O)<sub>k</sub>R', где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил.

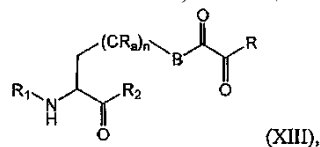


Кроме того, включены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, необязательно защищены по карбоксильной группе, необязательно защищены по аминогруппе и карбоксильной группе, или их соли. Кроме того, указанные не природные аминокислоты и любые из следующих не природных аминокислот могут быть включены в полипептид с не природными аминокислотами.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XIII):



где В необязателен и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, где k принимает значения 1, 2 или 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- и -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

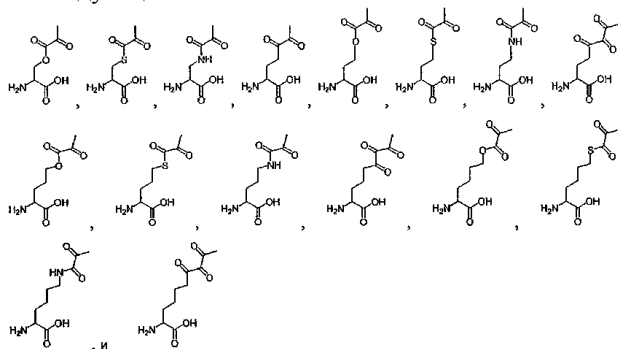
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту и полинуклеотид;

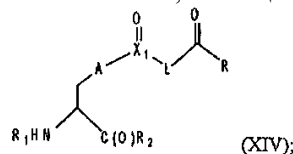
где каждый R<sub>a</sub> независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', где k принимает значения 1, 2 или 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' и -S(O)<sub>k</sub>R', где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно защищены по аминогруппе, необязательно защищены по карбоксильной группе, необязательно защищены по аминогруппе и карбоксильной группе, или их соли. Кроме того, указанные не природные аминокислоты и любые из следующих не природных аминокислот могут быть включены в полипептид с не природными аминокислотами.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XIV):



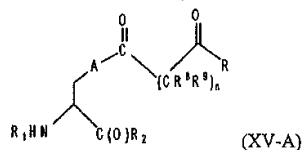
где А необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;



$n$  принимает значения 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый  $R^8$  и  $R^9$  в каждой  $CR^8R^9$  группе независимо выбирают из группы, состоящей из H, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или любые  $R^8$  и  $R^9$  могут вместе образовать =O или циклоалкил либо любые соседние R группы, взятые вместе, могут образовать циклоалкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XV-A):



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

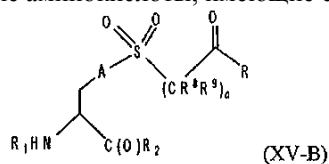
$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$X_1$  представляет собой C, S или S(O);

$n$  принимает значения 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый  $R^8$  и  $R^9$  в каждой  $CR^8R^9$  группе независимо выбирают из группы, состоящей из H, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или любые  $R^8$  и  $R^9$  могут вместе образовать =O или циклоалкил либо любые соседние R группы, взятые вместе, могут образовать циклоалкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XV-B):



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

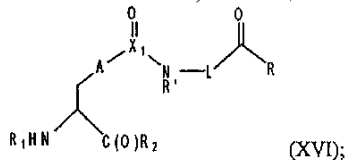
$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$X_1$  представляет собой C, S или S(O);

$n$  принимает значения 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый  $R^8$  и  $R^9$  в каждой  $CR^8R^9$  группе независимо выбирают из группы, состоящей из H, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или любые  $R^8$  и  $R^9$  могут вместе образовать =O или циклоалкил либо любые соседние R группы, взятые вместе, могут образовать циклоалкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XVI):



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

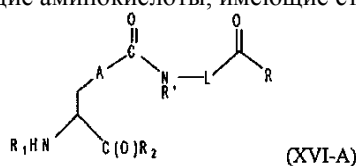
$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу,

смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$X_1$  представляет собой C, S или S(O);

L представляет собой алкилен, замещенный алкилен, N(R')(алкилен) или N(R')(замещенный алкилен), где R' представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XVI-A):



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

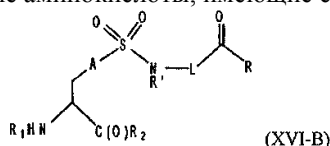
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

L представляет собой алкилен, замещенный алкилен, N(R')(алкилен) или N(R')(замещенный алкилен), где R' представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, включены следующие аминокислоты, имеющие структурную формулу (XVI-B):



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

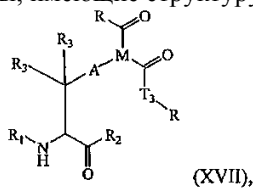
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

$R_1$  необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

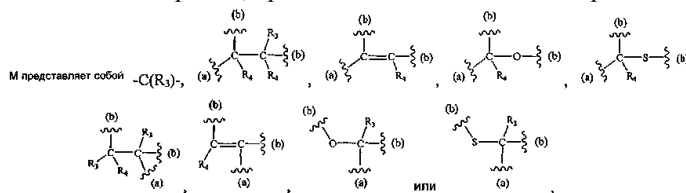
$R_2$  необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

L представляет собой алкилен, замещенный алкилен, N(R')(алкилен) или N(R')(замещенный алкилен), где R' представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVII)



где A необязателен и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, арилен, замещенный арилен, алкарилен, замещенный алкарилен, аралкилен или замещенный аралкилен



где (a) указывает на связывание с группой A и (b) указывает на связывание с соответствующими карбонильными группами,  $R_3$  и  $R_4$  независимо выбирают из H, галогена, алкила, замещенного алкила, циклоалкила или замещенного циклоалкила или  $R_3$  и  $R_4$  либо две  $R_3$  группы или две  $R_4$  группы необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил;

R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

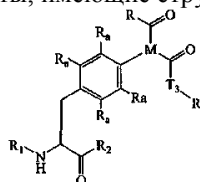
T<sub>3</sub> представляет собой связь, C(R)(R), O или S;

R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

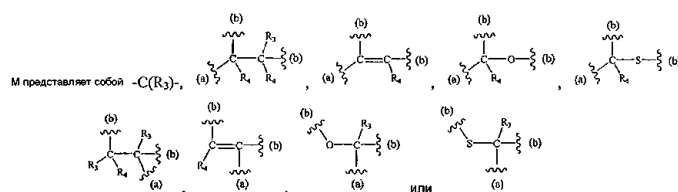
R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структурную формулу (XVIII)



(XVIII),

где



где (a) указывает на связывание с группой A и (b) указывает на связывание с соответствующими карбонильными группами, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо выбирают из H, галогена, алкила, замещенного алкила, циклоалкила или замещенного циклоалкила или R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> либо две R<sub>3</sub> группы или две R<sub>4</sub> группы необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил;

R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

T<sub>3</sub> представляет собой связь, C(R)(R), O или S;

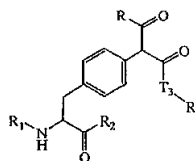
R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R<sub>1</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R<sub>2</sub> необязателен и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый R<sub>a</sub> независимо выбирают из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', где k представляет собой 1, 2 или 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' и -S(O)<sub>k</sub>R', где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил.

Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структурную формулу (XIX)

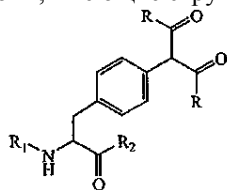


(XIX),

где R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил и

T<sub>3</sub> представляет собой O или S.

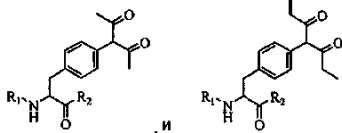
Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структурную формулу (XX)



(XX),

где R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, включены аминокислоты, имеющие структурные формулы (XXI)



В некоторых вариантах полипептид, включающий неприродную аминокислоту, химически модифицирован для создания реакционноспособной карбонильной или дикарбонильной функциональной группы. Например, альдегидную функциональность, которую можно использовать для реакций конъюгирования, можно создать из функциональности, в которой имеются соседние amino и гидроксильные группы. Если биологически активная молекула представляет собой полипептид, например N-терминальный серин или треонин (которые могут нормально присутствовать или могут быть экспонированы в результате химического или ферментативного расщепления), ее можно использовать для создания альдегидной функциональности в условиях мягкого оксидативного расщепления, используя перйодат; см., например, Gaertner et al., *Bioconjug. Chem.*, 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.*, 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.*, 269:7224-7230 (1994). Однако методы, известные специалистам, ограничены аминокислотой на N-конце пептида или белка.

В настоящем изобретении неприродную аминокислоту, содержащую соседние гидроксильную и аминогруппы можно включить в полипептид как "маскированную" альдегидную функциональность. Например, 5-гидроксилизин содержит гидроксильную группу, соседнюю с эpsilon амином. Условия реакции для создания альдегида обычно включают добавление молярного избытка метапериодата натрия в мягких условиях чтобы избежать окисления по другим сайтам. Величина pH в реакции окисления обычно составляет около 7,0. Типичная реакция включает добавление около 1,5 мол. избытка метапериодата натрия к забуференному раствору полипептида с последующим инкубированием в течение около 10 мин в темноте; см., например, патент США № 6423685.

Карбонильную или дикарбонильную функциональности можно подвергнуть взаимодействию селективно с гидроксилламинсодержащим реагентом в мягких условиях в водном растворе до образования соответствующей оксимной связи, в физиологических условиях; см., например, Jencks, W.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 475-481 (1959); Shao, J. и Tarn, J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:3893-3899 (1995). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной или дикарбонильной групп позволяет осуществлять селективную модификацию в присутствии боковых цепей других аминокислот; см., например, Cornish, V.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. & Stroh, J.G., *Bioconjug. Chem.*, 3:138-146 (1992); Mahal, L.K., et al., *Science*, 276:1125-1128 (1997).

Структура и синтез неприродных аминокислот: гидроксилламинсодержащие аминокислоты.

Предварительная патентная заявка США № 60/638418 включена в описание посредством ссылки во всей своей полноте. Так, информация, представленная в разделе V (озаглавленном "Non-Natural Amino Acids"), в разделе B (озаглавленном "Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids") полностью относится к указанным способам, композициям (включая формулы I-XXXV), методикам и стратегиям для получения, выделения, характеристики и к применению неприродных аминокислот, полипептидов, содержащих неприродные аминокислоты, и полипептидов, содержащих модифицированные неприродные аминокислоты, раскрыты в описании до той же степени, как если бы такие раскрытия были бы здесь представлены полностью. В патентных публикациях США №№ 2006/0194256, 2006/0217532, 2006/0217289 и в WO 2006/069246, озаглавленной "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", также включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Химический синтез неприродных аминокислот

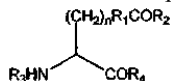
Многие из неприродных аминокислот, пригодных для использования в настоящем изобретении, коммерчески доступны, например, от Sigma (USA) или Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Те соединения, которые коммерчески недоступны, можно необязательно синтезировать как здесь раскрыто или как раскрыто в различных публикациях либо используя стандартные методы, хорошо известные специалистам в данной области. Для методик органического синтеза см., например, *Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden* (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) и *Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg* (Third Edition, Parts A и B, 1990, Plenum Press, New York). Дополнительные публикации, в которых описывается синтез неприродных аминокислот, включают, например, WO 2002/085923, озаглавленный "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids"; Matsoukas et al., (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of  $\gamma$ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates, *J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine), *J. Org. Chem.*, 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, *Eur. J. Med. Chem.*, 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Syn-

thesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues, *J. Org. Chem.*, 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pípecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization, *J. Org. Chem.*, 50:1239-1246; Barton et al. (1987) Synthesis of Novel  $\alpha$ -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- $\alpha$ -Amino-Adipic Acids, L- $\alpha$ -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives, *Tetrahedron*, 43:4297-4308 и Subasinghe et al. (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site, *J. Med. Chem.*, 35:4602-7; см. также патентную публикацию США № 2004/0198637, озаглавленную "Protein Arrays", которая включена в описание посредством ссылки.

А. Карбонильные реакционноспособные группы.

Аминокислоты с карбонильными реакционноспособными группами предоставляют возможность осуществления различных реакций для связывания молекул (включая, без ограничения, ПЭГ или другие водорастворимые молекулы) в реакциях, наряду с другими, нуклеофильного присоединения или альдольной конденсации.

Примеры карбонилсодержащих аминокислот можно представить следующим образом:



если  $n$  принимает значения 0-10;  $\text{R}_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил;  $\text{R}_2$  представляет собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил;  $\text{R}_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминотерминальную модифицирующую группу и  $\text{R}_4$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбокситерминальную модифицирующую группу. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $\text{R}_1$  представляет собой фенил,  $\text{R}_2$  представляет собой низший алкил (т.е. метил, этил или пропил) и кетонная молекула расположена в пара-положении относительно алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $\text{R}_1$  представляет собой фенил,  $\text{R}_2$  представляет собой низший алкил (т.е. метил, этил или пропил) и кетонная молекула расположена в мета-положении относительно алкильной боковой цепи.

Синтез п-ацетил-(+/-)-фенилаланина и м-ацетил-(+/-)-фенилаланин раскрыт Zhang, Z., et al., *Biochemistry*, 42: 6735-6746 (2003), что включено в описание посредством ссылки. Другие карбонилсодержащие аминокислоты специалисты в данной области могут получить аналогичным способом.

В некоторых вариантах полипептид, включающий не кодируемую в природе аминокислоту, химически модифицируют для создания реакционноспособной карбонильной функциональной группы. Например, альдегидную функциональность, которую можно использовать для реакций конъюгирования, можно создать из функциональности, имеющей соседние amino и гидроксильную группы. Если биологически активная молекула является полипептидом, например N-терминальным серином или треонином (которые могут как обычно присутствовать или могут быть экспонированы в результате химического или ферментативного расщепления), ее можно использовать для создания альдегидной функциональности в условиях мягкого оксидативного расщепления, используя периодат; см., например, Gaertner, et al., *Bioconjug. Chem.*, 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.*, 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.*, 269:7224-7230 (1994). Однако известные специалистам методы ограничены аминокислотой на N-конце пептида или белка.

В настоящем изобретении не кодируемую в природе аминокислоту, содержащую соседние гидроксильную и аминогруппу, можно включить в полипептид как "маскированную" альдегидную функциональность. Например, 5-гидроксилизин содержит гидроксильную группу, соседнюю с эпсилон-амином. Условия реакции для создания альдегида обычно включают добавление молярного избытка метапериодата натрия в мягких условиях, чтобы избежать окисления по другим сайтам внутри полипептида. Величина pH в реакции окисления обычно составляет около 7,0. А типичная реакция включает добавление около 1,5 мол. избытка метапериодата натрия к забуференному раствору полипептида с последующим инкубированием в течение около 10 мин в темноте; см., например, патент США № 6423685, который включен в описание посредством ссылки.

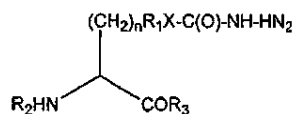
Карбонильную функциональность можно подвергнуть взаимодействию селективно с гидразин-, гидразид-, гидроксилламин- или семикарбазидсодержащим реагентом в мягких условиях в водном растворе для образования соответствующих гидразоновой, оксимной или семикарбазоновой связей, соответственно которые стабильны в физиологических условиях; см., например, Jencks, W.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 475-481 (1959); Shao, J. и Tarn, J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:3893-3899 (1995). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной группы позволяет осуществить селективную модификацию в присутствии боковых цепей других аминокислот; см., например, Cornish, V.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. & Stroh, J.G., *Bioconjug. Chem.*, 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science*, 276:1125-1128 (1997).

В. Гидразиновые, гидразидные или семикарбазидные реакционноспособные группы.

Не кодируемые в природе аминокислоты, содержащие нуклеофильные группы, такие как гидразин, гидразид или семикарбазид, позволяют вести реакции с различными электрофильными группами для

создания конъюгатов (включая, без ограничения, с ПЭГ или с другими водорастворимыми полимерами).

Примеры гидразин-, гидразид- или семикарбазидсодержащих аминокислот можно представить следующим образом:



если  $n$  принимает значения 0-10;  $R_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует;  $X$  представляет собой O, N или S или отсутствует;  $R_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминотерминальную модифицирующую группу и  $R_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбокситерминальную модифицирующую группу.

В некоторых вариантах  $n=4$ ,  $R_1$  отсутствует и  $X$  представляет собой N. В некоторых вариантах  $n=2$ ,  $R_1$  отсутствует и  $X$  отсутствует. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  представляет собой O и атом кислорода находится в пара-положении относительно алифатической группы на арильном кольце.

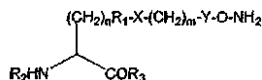
Гидразид-, гидразин- и семикарбазидсодержащие аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, L-глутамат- $\gamma$ -гидразид доступен от Sigma Chemical (St. Louis, MO). Другие аминокислоты, которые недоступны коммерчески, могут получить специалисты в данной области; см., например, патент США № 6281211, который включен в описание посредством ссылки.

Полипептиды, содержащие не кодируемые в природе аминокислоты, которые содержат гидразидные, гидразиновые или семикарбазидные функциональности, можно подвергнуть взаимодействию эффективно и селективно с различными молекулами, которые содержат альдегидные или другие функциональные группы с аналогичной реакционной способностью; см., например, Shao, J. и Tarn, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:3893-3899 (1995). Уникальная реакционная способность гидразидных, гидразиновых и семикарбазидных функциональных групп делает их значительно более реакционноспособными в отношении альдегидов, кетонов и других электрофильных групп по сравнению с нуклеофильными группами, присутствующими в 20 обычных аминокислотах (включая, без ограничения, гидроксильные группы серина или треонина или аминокислоты лизина и N-конца).

#### С. Аминооксисодержащие аминокислоты.

Не кодируемые в природе аминокислоты, содержащие аминокси (также называемые гидроксилaminaми) группы, позволяют проводить реакции с различными электрофильными группами с образованием конъюгатов (включая, без ограничения, ПЭГ или другие водорастворимые полимеры). Подобно гидразинам, гидразидам и семикарбазидам повышенная нуклеофильность аминоксигруппы позволяет вести реакции эффективно и селективно с различными молекулами, которые содержат альдегидные или другие функциональные группы с аналогичными химическими реакционными способностями; см., например, Shao, J. и Tarn, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:3893-3899 (1995); H. Hang и C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.*, 34: 727-736 (2001). В результате реакции с гидразиновой группой образуется соответствующий гидразон, однако в результате реакции аминоксигруппы с карбонилсодержащей группой, такой как кетон, образуется оксим.

Примеры аминокислот, содержащие аминоксигруппы, могут быть представлены следующим образом:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $R_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует;  $X$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  принимает значения 0-10;  $Y=C(O)$  или отсутствует;  $R_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминотерминальную модифицирующую группу и  $R_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбокситерминальную модифицирующую группу. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  представляет собой O,  $m=1$  и  $Y$  присутствует. В некоторых вариантах  $n=2$ ,  $R_1$  и  $X$  отсутствуют,  $m=0$  и  $Y$  отсутствует.

Аминооксисодержащие аминокислоты можно получить из легкодоступных аминокислотных предшественников (гомосерин, серин и треонин); см., например, M. Carrasco и R. Brown, *J. Org. Chem.*, 68: 8853-8858 (2003). Некоторые аминооксисодержащие аминокислоты, такие как L-2-амино-4-(аминокси)масляная кислота, были выделены (Rosenthal, G., *Life Sci.*, 60: 1635-1641 (1997)). Другие аминооксисодержащие аминокислоты могут получить специалисты в данной области.

#### Д. Азидные и алкинные реакционноспособные группы.

Уникальная реакционная способность азидных и алкинных функциональных групп делает их чрезвычайно подходящими для селективных модификаций полипептидов и других биологических молекул. Органические азиды, особенно алифатические азиды и алкины, достаточно стабильны в условиях обычных химических реакций. В частности, как азидные, так и функциональные группы алкина инертны в отношении боковых цепей (т.е. R групп) 20 обычных аминокислот, присутствующих в природных поли-



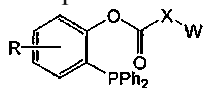
пептидах. При ближайшем рассмотрении, однако, выявляется "пружинная" природа азидных групп и групп алкина, и они селективно и эффективно участвуют в реакции [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена с образованием соответствующего триазола; см., например, Chin J., et al., *Science*, 301: 964-7 (2003); Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3192-3193 (2003); Chin, J.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124:9026-9027 (2002).

Так как реакция циклоприсоединения Хьюсгена включает реакцию селективного циклоприсоединения (см., например, Padwa, A., in *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B.M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. в *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176) скорее, чем реакцией нуклеофильного замещения, включение не кодируемых в природе аминокислот, содержащих азид- и алкинсодержащие боковые цепи, позволяет получать в результате полипептиды, которые селективно модифицированы по положению не кодируемой в природе аминокислоты. Реакцию циклоприсоединения с участием азид- или алкинсодержащих полипептидов bG-CSF можно вести при комнатной температуре в водных условиях путем добавления Cu(II) (включая, без ограничения, в виде каталитического количества CuSO<sub>4</sub>) в присутствии восстанавливающего агента для восстановления Cu(II) до Cu(I), *in situ*, в каталитическом количестве; см., например, Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C.W., et al., *J. Org. Chem.*, 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41:2596-2599 (2002). Примеры восстанавливающих агентов включают, без ограничения, аскорбат, металлическую медь, хинин, гидрохинон, витамин К, глутатион, цистеин, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, и под действием электрического потенциала.

В некоторых случаях, когда желательное проведение реакции [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена между азидом и алкином, полипептид bG-CSF включает не кодируемую в природе аминокислоту, включающую алкиновую молекулу, а водорастворимый полимер, который следует присоединить к аминокислоте, включает азидную молекулу. Альтернативно, можно осуществить обратную реакцию (т.е. реакцию с азидной молекулой у аминокислоты и алкиновой молекулой, присутствующей на водорастворимом полимере).

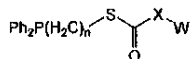
Азидная функциональная группа может также селективно реагировать с водорастворимым полимером, содержащим ариловый сложный эфир, и соответствующим образом функционализированной арилфосфиновой молекулой для создания амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и образующийся амин затем эффективно реагирует с проксимальной сложноэфирной связью с образованием соответствующего амида; см., например, E. Saxon and C. Bertozzi, *Science*, 287, 2007-2010 (2000). Азидсодержащая аминокислота может быть или алкилазидом (включая, без ограничения, 2-амино-6-азидо-1-гексановую кислоту) или арилазидом (п-азидофенилаланин).

Примеры водорастворимых полимеров, содержащих ариловые сложные эфиры и фосфиновую молекулу, могут быть представлены следующим образом:



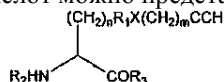
где X представляет собой O, N, S или отсутствует; Ph представляет собой фенил; W представляет собой водорастворимый полимер и R может представлять собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенные арильные группы. Примеры R групп включают, без ограничения -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -галоген, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN и -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' и R'''' , каждый независимо, представляет собой водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, без ограничения, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиоалкоксигруппы или арилалкильные группы. Если соединения настоящего изобретения включают более одной R группы, например, каждую из R групп независимо выбирают как каждую R', R'', R''' и R'''' группу, если присутствует более одной такой группы. Если R' и R'' присоединены к одному и тому же атому азота, они в комбинации с атомом азота могут образовывать 5-, 6- или 7-членное кольцо. Например, подразумевается, что -NR'R'' включает, без ограничения, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей специалисту будет понятно, что термин "алкил" подразумевает включение групп с атомами углерода, связанными с группами, отличающимися от водорода, такими как галогеноалкил (включая, без ограничения, -CF<sub>3</sub> и -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) и ацил (включая, без ограничения, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) и т.п.

Азидная функциональная группа также может селективно реагировать с водорастворимым полимером, содержащим тиоэфир, и соответствующим образом функционализированной арилфосфиновой молекулой для создания амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и образовавшийся амин затем эффективно реагирует с тиоэфирной связью с образованием соответствующего амида. Водорастворимые полимеры, содержащие тиоэфир и фосфиновую молекулу, можно представить следующим образом:



где n принимает значения 1-10; X может представлять собой O, N, S или отсутствует; Ph представляет собой фенил и W представляет собой водорастворимый полимер.

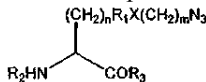
Примеры алкинсодержащих аминокислот можно представить следующим образом:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $R_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует;  $X$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  принимает значения 0-10;  $R_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминотерминальную модифицирующую группу,  $R_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбокситерминальную модифицирующую группу. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  отсутствует,  $m=0$  и ацетиленовая молекула расположена в пара-положении относительно алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  представляет собой O,  $m=1$  и пропаргиллоксигруппа расположена в пара-положении относительно алкильной боковой цепи (т.е. O-пропаргилтирозин). В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  и  $X$  отсутствуют и  $m=0$  (т.е. пропаргилглицин).

Алкинсодержащие аминокислоты коммерчески доступны. Например, пропаргилглицин коммерчески доступен от Peptech (Burlington, M.A.). Альтернативно, алкинсодержащие аминокислоты можно получить стандартными способами. Например, *p*-пропаргиллоксифенилаланин можно синтезировать, например, как раскрыто у Deiters, A., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 11782-11783 (2003), и 4-алкинил-L-фенилаланин можно синтезировать, как раскрыто у Kayser, B., et al., *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997). Другие алкинсодержащие аминокислоты могут получить специалисты в данной области.

Примеры азидсодержащих аминокислот можно представить следующим образом:



где  $n$  принимает значения 0-10;  $R_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или отсутствует;  $X$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  принимает значения 0-10;  $R_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминотерминальную модифицирующую группу;  $R_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбокситерминальную модифицирующую группу. В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  отсутствует,  $m=0$  и азидная молекула расположена в пара-положении относительно алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах  $n$  принимает значения 0-4,  $R_1$  и  $X$  отсутствуют и  $m=0$ . В некоторых вариантах  $n=1$ ,  $R_1$  представляет собой фенил,  $X$  представляет собой O,  $m=2$  и  $\beta$ -азидэтоксимолекула расположена в пара-положении относительно алкильной боковой цепи.

Азидсодержащие аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, 4-азидофенилаланин можно получить от Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Что касается азидсодержащих аминокислот, которые коммерчески недоступны, то азидную группу можно получить относительно легко, используя стандартные методы, хорошо известные специалистам в данной области, включая, без ограничения, замещение соответствующей отщепляемой группы (включая, без ограничения, галогенид, мезилат, тозилат) или используя раскрытие соответствующим образом защищенного лактона; см., например, *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Е. Аминотиольные реакционноспособные группы.

Уникальная реакционная способность бета-замещенных аминотиольных функциональных групп делает их крайне полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул, которые содержат альдегидные группы, через образование тиазолидина; см., например, J. Shao и J. Tarn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117 (14) 3893-3899. В некоторых вариантах бета-замещенные аминотиольные аминокислоты можно включить в полипептиды bG-CSF и затем подвергнуть реакции с водорастворимыми полимерами, включающими альдегидную функциональность. В некоторых вариантах водорастворимый полимер, лекарственный конъюгат или другие агенты можно присоединить к полипептиду bG-CSF, включающему бета-замещенную аминотиольную аминокислоту через образование тиазолидина.

Ф. Дополнительные реакционноспособные группы.

Дополнительные реакционноспособные группы и не кодируемые в природе аминокислоты, включая, без ограничения, пара-аминофенилаланин, которые можно включить в полипептиды bG-CSF настоящего изобретения, раскрыты в следующих патентных заявках, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте: патентная публикация США № 2006/0194256, патентная публикация США № 2006/0217532, патентная публикация США № 2006/0217289, предварительная заявка на патент № 60/755338; предварительная заявка на патент № 60/755711; предварительная заявка на патент № 60/755018; международная патентная заявка № PCT/US 06/49397; WO 2006/069246; предварительная заявка на патент США № 60/743041; предварительная заявка на патент № 60/743040; международная патентная заявка № PCT/US 06/47822; предварительная заявка на патент № 60/882819; предварительная заявка на патент № 60/882500; и предварительная заявка на патент № 60/870594. В перечисленных заявках также рассматриваются реакционноспособные группы, которые могут присутствовать у ПЭГ или у других полимеров, включая, без ограничения, группы гидроксилamina (аминоокси) для конъюгации.

Клеточный захват неприродных аминокислот.

Захват (поглощение) клеткой неприродных аминокислот является моментом, который обычно принимают во внимание, конструируя и селектируя неприродные аминокислоты, включая, без ограничения, для включения в белок. Например, высокая плотность заряда  $\alpha$ -аминокислот предполагает, что указанные соединения, по-видимому, не способны проникать в клетки. Природные аминокислоты захватываются эукариотными клетками за счет транспортных систем на основе белков. Можно осуществить быстрый скрининг, чтобы оценить, какие именно из неприродных кислот захватываются (если захватываются) клетками; см., например, анализы токсичности, например, в патентной публикации США № 2004/0198637, озаглавленной "Protein Arrays", которая включена в описание посредством ссылки; и Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code, PNAS, United States, 96:4780-4785. Хотя захват легко определяется различными анализами, альтернативой созданию неприродных аминокислот, которые поддаются схемам клеточного захвата, является разработка биосинтетических схем создания аминокислоты *in vivo*.

Биосинтез неприродных аминокислот.

Многие биосинтетические схемы уже существуют в клетках для продуцирования аминокислот и других соединений. Хотя биосинтетические способы для конкретной аминокислоты могут не существовать в природе, включая, без ограничения, клетки, в настоящем изобретении предложены такие методы. Например, биосинтетические схемы для неприродных аминокислот необязательно создаются в клетке-хозяине в результате добавления новых ферментов или модификации существующих в клетке-хозяине схем. Дополнительные новые ферменты представляют собой необязательно природные ферменты или искусственно созданные ферменты. Например, биосинтез *p*-аминофенилаланина (представленный в примере WO 2002/085923, озаглавленном "In vivo incorporation of unnatural amino acids") основан на комбинации известных ферментов из других организмов. Гены для таких ферментов можно встроить в эукариотные клетки путем трансформирования клеток плазмидой, содержащей указанные гены. Такие гены, будучи экспрессированы в клетке, обеспечивают ферментативные пути к синтезу целевого соединения. Примеры типов ферментов, которые необязательно добавляют, представлены далее в примерах. Дополнительные ферментные последовательности можно найти, например, в Банке генов. Искусственно созданные ферменты также необязательно добавляют в клетку таким же образом. Таким образом можно манипулировать клеточным механизмом и ресурсами для создания неприродных аминокислот.

Различные методы доступны для получения новых ферментов для использования в биосинтетических схемах или для эволюции уже существующих схем. Например, рекурсивную рекомбинацию, включая, без ограничения, предложенную Maxugen, Inc. (доступна на World Wide Web по адресу maxugen.com), необязательно используют для создания новых ферментов и схем; см., например, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391 и, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. Аналогично, DesignPath™, созданную Genencor (доступно на World Wide Web по адресу genencor.com), необязательно используют для метаболической схемы конструирования, включая, без ограничения, для конструирования схемы для создания *O*-метил-L-тирозин в клетке. Такая технология реконструкции существующих схем в организме хозяина с использованием комбинации новых генов, включая, без ограничения, те, которые идентифицированы с помощью функциональной геномики, и молекулярной эволюции и дизайна. Diversa Corporation (доступно на World Wide Web по адресу diversa.com) также предлагает технологию для быстрого скринирования библиотек генов и генных схем, включая, без ограничения, создание новых схем.

Обычно неприродную аминокислоту получают, используя сконструированные схемы биосинтеза настоящего изобретения в концентрации, достаточной для эффективного биосинтеза белка, включая, без ограничения, количества в клетках в природе, но не до такой степени, чтобы воздействовать на концентрации других аминокислот или исчерпания ресурсов клетки. Типичные концентрации, продуцируемые *in vivo*, таким образом, составляют от около 10 до около 0,05 мМ. После того как клетка трансформирована плазмидой, включающей гены, использованные для получения ферментов, необходимых для конкретной схемы, и создана неприродная аминокислота, необязательно используют *in vivo* селекцию для дальнейшей оптимизации продуцирования неприродной аминокислоты как для синтеза рибосомального белка, так и для клеточного роста.

Полипептиды с неприродными аминокислотами.

Встраивание неприродной аминокислоты можно осуществить для различных целей, включая, без ограничения, вспомогательные изменения в структуре и/или в функциях белка, изменения размера, кислотности, нуклеофильности, водородного связывания, гидрофобности, доступности сайтов-мишеней протеазы, нацеливания на молекулу (включая, без ограничения, структуру белка), добавления биологически активной молекулы, присоединения полимера, присоединения радионуклида, модулирование времени полужизни, модулирование тканепроницаемости (например, опухолей), модулирование активного транспорта, модулирование ткане-, клетко- или орган-специфичности или распределения, модулирование иммуногенности, модулирование протеазоустойчивости и т.д. Белки, которые включают неприрод-

ные аминокислоты, можно усилить или даже полностью придать им новые каталитические или биофизические свойства. Например, следующие свойства необязательно модифицируют путем включения неприродной аминокислоты в белок: токсичность, биораспределение, структурные характеристики, спектроскопические характеристики, химические и/или фотохимические свойства, каталитическую способность, время полужизни (включая, без ограничения, период сывороточной полужизни), способность реагировать с другими молекулами, включая, без ограничения, ковалентно или нековалентно и т.п. Композиции, включающие белки, которые содержат по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, можно использовать для, включая, без ограничения, новых терапевтических агентов, диагностических агентов, каталитических ферментов, промышленных ферментов, связывающих белков (включая, без ограничения, антитела), и включая, без ограничения, исследования структуры и функций белков; см., например, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция включает по меньшей мере один белок, включающий по меньшей мере одну, включая, без ограничения, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять или больше неприродных аминокислот. Неприродные аминокислоты могут быть одинаковыми или различными, включая, без ограничения, может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше различных сайтов в белке, который включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше различных неприродных аминокислот. В другом аспекте композиция включает белок, содержащий по меньшей мере одну, но меньше, чем все, конкретную аминокислоту, присутствующую в белке, замещенном неприродной аминокислотой. Для конкретного белка, содержащего более чем одну неприродную аминокислоту, неприродные аминокислоты могут быть идентичными или могут отличаться (включая, без ограничения, белок, который может включать два или больше различных типа неприродных аминокислот или может включать две одинаковые неприродные аминокислоты). Для конкретного белка с более чем двумя неприродными аминокислотами неприродные аминокислоты могут быть одинаковыми, различными или могут представлять собой множество неприродных аминокислот одного типа по меньшей мере с одной отличающейся неприродной аминокислотой.

Представляющие интерес белки или полипептиды, содержащие по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, являются отличительным признаком настоящего изобретения. Настоящее изобретение также включает полипептиды или белки, содержащие по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, полученную с использованием композиций и способов настоящего изобретения. Эксципиент (включая, без ограничения, фармацевтически приемлемый эксципиент) также может присутствовать вместе с белком.

При получении представляющих интерес белков или полипептидов, содержащих по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в эукариотных клетках, белки или полипептиды обычно включают эукариотные посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах белок включает по меньшей мере одну неприродную аминокислоту и по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая осуществляется *in vivo* эукариотными клетками, причем указанная посттрансляционная модификация не осуществляется прокариотными клетками. Например, пост-трансляционные модификации включают, включая, без ограничения, синтезирование, ацилирование, липидную модификацию, пальмитоилирование, добавление пальмитата, фосфорилирование, модификацию гликолипидной связи, гликозилирование и т.п. В одном аспекте посттрансляционная модификация включает присоединение олигосахарида (включая, без ограничения, (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc) к аспарагину через GlcNAc-аспарагиновую связь; см. табл. 1, в которой перечислены некоторые примеры N-связанных олигосахаридов эукариотных белков (могут присутствовать также дополнительные остатки, которые не показаны). В другом аспекте посттрансляционная модификация включает присоединение олигосахарида (включая, без ограничения, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc и т.д.) к серину или треонину через связи GalNAc-серин или GalNAc-треонин или связи GlcNAc-серин или GlcNAc-треонин.

Таблица 1

## Примеры олигосахаридов через GlcNAc-связь

| Тип                        | Базовая структура |
|----------------------------|-------------------|
| Высокомолекулярная манноза |                   |
| Гибрид                     |                   |
| Комплекс                   |                   |
| Ксилоза                    |                   |

В еще одном аспекте посттрансляционная модификация включает протеолитический процессинг предшественников (включая, без ограничения, кальцитонинный предшественник, пептидный предшественник, родственный гену кальцетонина, препропаратироидный гормон, проинсулин, препроопиомеланокортин, проопиометанокортин и т.п.), сборку в белок, состоящий из многих субъединиц или макромолекулярную сборку, трансляцию в другие сайты в клетке (включая, без ограничения, в органеллы, такие как эндоплазмический ретикулум, комплекс Гольджи, ядра, лизосомы, пероксисомы, митохондрии, хлоропласты, вакуоли и т.д. или через секреторную схему). В некоторых вариантах белок включает секреторную или локализационную последовательность, эпитопную метку, FLAG метку, полигистидиновую метку, слитых GST или т.п.

Одним из преимуществ неприродной аминокислоты является то, что она предоставляет дополнительные химические молекулы, которые можно использовать для добавления дополнительных молекул. Такие модификации можно осуществить *in vivo* в эукариотных или не эукариотных клетках или *in vitro*. Так, в некоторых вариантах пост-трансляционная модификация происходит через неприродную аминокислоту. Например, посттрансляционная модификация может быть результатом нуклеофильно-электрофильной реакции. Большинство реакций, которые в настоящее время используют для селективной модификации белков, включает образование ковалентной связи между нуклеофильным и электрофильным партнерами реакции, включая, без ограничения, реакцию  $\alpha$ -галогенокетонов с боковыми цепями гистидина или цистеина. Селективность в таких случаях определяют по количеству и доступности нуклеофильных остатков в белке. С белками настоящего изобретения можно использовать другие, более селективные реакции, такие как реакция неприродной кетоаминокислоты с гидразидами или аминокислосоединениями *in vitro* и *in vivo*; см., например, Cornish, et al. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151; Mahal, et al. (1997) *Science*, 276:1125-1128; Wang, et al. (2001) *Science*, 292:498-500; Chin, et al. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124:9026-9027; Chin, et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:11020-11024; Wang, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:56-61; Zhang, et al. (2003) *Biochemistry*, 42:6735-6746 и Chin, et al. (2003) *Science*, 301:964-7, причем все они включены в описание посредством ссылки. Это позволяет селективно вводить метки практически в любой белок, используя множество переносчиков реагентов, включая флуорофоров, сшивающие агенты, производные сахаридов и цитотоксические молекулы; см. также патент США № 6927042, озаглавленный "Glycoprotein synthesis", который включен в описание посредством ссылки. Посттрансляционные модификации, включая, без ограничения, модификации с использованием азидоаминокислоты, можно также осуществить с помощью лигирования Стаудингера (включая, без ограничения, триарилфосфиновые реагенты); см., например, Kiick et al. (2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS, 99:19-24.

В настоящем изобретении предложен другой высокоэффективный способ селективной модификации белков, который включает генетическое встраивание неприродных аминокислот, включая, без ограничения, содержащие азидную или алкинильную молекулу, в белки в ответ на селективный кодон. Такие боковые цепи аминокислоты можно затем модифицировать, включая, без ограничения, в [3+2] реакции циклоприсоединения Хьюсгена (см., например, Padwa, A. in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4. (1991) Ed. Trost, B.M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109 и Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) с использованием, включая, без ограничения, алкинили или азидопроизводных соответственно. Так как указанный способ включает скорее циклоприсоединение, а не нуклеофильное замещение, белки можно модифицировать с чрезвычайно высокой селективностью. Указанную реакцию можно вести при комнатной температуре в водных условиях с превосходной региоселективностью (1,4>1,5), добавляя к реакционной смеси каталитические количества солей Cu(I); см., например, Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.*, 67:3057-3064 и Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41:2596-2599. Другим способом, который можно использовать, является обмен лигандов на бис-мышьяксодержащем соединении с тетрацистеиновым мотивом, см., например, Griffin, et al., (1998) *Sci-*

ence, 281: 269-272.

Молекулами, которые можно добавлять к белку настоящего изобретения с помощью [3+2] циклоприсоединения, являются практически любые молекулы с азидными или алкинильными производными. Такие молекулы включают, без ограничения, красители, флуорофоры, сшивающие агенты, производные сахаридов, полимеры (включая, без ограничения, производные полиэтиленгликоля), фотосшивающие линкеры, цитотоксические соединения, аффинные метки, производные биотина, смолы, шарики, второй (или больше) белок или полипептид, полинуклеотид (политнуклеотиды) (включая, без ограничения, ДНК, РНК и т.д.), металлохелаторы, кофакторы, жирные кислоты, углеводы и т.п. Такие молекулы можно добавлять к неприродной аминокислоте с алкинильной группой, включая, без ограничения, п-пропаргилноксифенилаланин, или с азидной группой, включая, без ограничения, п-азидофенилаланин соответственно.

V. *In vivo* создание полипептидов bG-CSF, включающих не кодируемые в природе аминокислоты.

Полипептиды bG-CSF настоящего изобретения можно создать *in vivo*, используя модифицированные тРНК и тРНК синтетазы для добавления к аминокислотам или для замещения аминокислотами, которые не кодируются в природных системах.

Методы создания тРНК и тРНК синтетаз, которые используют аминокислоты, которые не кодируются в природных системах, раскрыты, например, в патенте США № 7045337 и 7083970, которые включены в описание посредством ссылки. Указанные методы включают создание трансляционного механизма, который функционирует независимо от синтетазы и тРНК эндогенных в отношении трансляционной системы (и поэтому иногда называемых "ортогональными"). Обычно трансляционная система включает ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоацил-тРНК-синтазу (О-RS). Обычно О-RS преимущественно аминоацилируют О-тРНК, содержащую по меньшей мере одну неприродную аминокислоту в трансляционной системе, и О-тРНК распознает по меньшей мере один селекторный кодон, который не распознают другие тРНК в системе. Трансляционная система, таким образом, встраивает не кодируемую в природе аминокислоту в белок, продуцируемый в системе, в ответ на кодируемый селекторный кодон, тем самым "замещая" аминокислоту в положении в кодированном полипептиде.

Специалистами был описан широкий круг ортогональных тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз для включения конкретных синтетических аминокислот в полипептиды, и они обычно пригодны для использования в настоящем изобретении. Например, кето-специфические О- и РНК/аминоацил-тРНК синтетазы раскрыты у Wang, L., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 100:56-61 (2003) и Zhang, Z. et al., Biochem., 42 (22): 6735-6746 (2003). Примеры О-RS, или их частей, кодированы полинуклеотидными последовательностями и включают аминокислотные последовательности, раскрытые в патентах США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в описание посредством ссылки. Соответствующие О-тРНК молекулы для использования с О-RS также раскрыты в патентах США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в описание посредством ссылки. Дополнительные примеры О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетазных пар раскрыты в WO 2005/007870, WO 2005/007624 и WO 2005/019415.

Пример системы азидоспецифической О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетазы раскрыт у Chin, J.W., et al., J. Am. Chem. Soc., 124:9026-9027 (2002). Примеры О-RS последовательности для п-азидо-L-Phe включают, без ограничения, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 14-16 и 29-32 и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 46-48 и 61-64, как раскрыто в патенте США № 7083970, который включен в описание посредством ссылки. Примеры О-тРНК последовательностей, пригодных для использования в настоящем изобретении, включают, без ограничения, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-3, как раскрыто в патенте США № 7083970, который включен в описание посредством ссылки. Другие примеры пар О-тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаз, специфических относительно конкретной не кодируемой в природе аминокислоты, раскрыты в патенте США № 7045337, который включен в описание посредством ссылки. О-RS и О-тРНК, которые включают как кетосодержащие, так и азидосодержащие аминокислоты, в *S. cerevisiae* раскрыты у Chin, J.W., et al., Science, 301:964-967 (2003).

Имеются сообщения о некоторых других ортогональных парах. Глутаминильная (см., например, Liu, D.R. и Schultz, P.G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4780-4785), аспартильная (см., например, Pastrnak, M., et al. (2000) Helv. Chim. Acta, 83:2277-2286) и тирозильная (см., например, Ohno, S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.), 124:1065-1068 и Kowal, A.K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:2268-2273) системы, полученные из *S. cerevisiae* тРНК и синтетазы, были раскрыты для потенциального встраивания неприродных аминокислот в *E. coli*. Системы, полученные из *E. coli* глутаминильной (см., например, Kowal, A.K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:2268-2273) и тирозильной (см., например, Edwards, H. и Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol., 10:1633-1641) синтетазы, были раскрыты для использования в *S. cerevisiae*. *E. coli* тирозильная система была использована для встраивания 3-йодо-L-тирозина *in vivo* в клетки млекопитающих; см., Sakamoto, K., et al., T2002, Nucleic Acids Res., 30:4692-4699.

Использование О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетазы включает селекцию специфического кодона, который кодирует не кодируемую в природе аминокислоту. Хотя можно использовать любой кодон, обычно желательнее выбирать такой кодон, который редко или никогда не используется в клетках, в которых экспрессируется О-тРНК/аминоацил-тРНК синтаза. Например, примеры кодонов включают бес-

смысленные кодоны, такие как стоп-кодоны (амбер-кодон, охра-кодон и опал-кодон), кодоны с четырьмя или более основаниями и другие природные трехосновные кодоны, которые редко используют или вовсе не используют.

Специфический селекторный кодон (кодоны) можно встроить в соответствующие положения в последовательности, кодирующей bG-CSF полинуклеотид, используя известные специалистам методы мутагенеза (включая, без ограничения, сайт-специфический мутагенез, кассетный мутагенез, рестрикционно-селекционный мутагенез и т.д.).

Методы создания компонентов белкового биосинтетического механизма, таких как O-RS, O-tPHK и ортогональных O-tPHK/O-RS пар, которые можно использовать для встраивания не кодируемой в природе аминокислоты, раскрыты в Wang, L., et al., *Science*, 292: 498-500 (2001); Chin, J.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. et al., *Biochemistry*, 42: 6735-6746 (2003). Методы и композиции для *in vivo* встраивания не кодируемых в природе аминокислот раскрыты в патенте США № 7045337, который включен в описание посредством ссылки. Методы селекции пар ортогональных tPHK-tPHK синтетаз для использования в *in vivo* трансляционной системе организма также раскрыты в патентах США Nos. 7045337 и 7083970, которые включены в описание посредством ссылки. В PCT публикации № WO 04/035743, озаглавленной "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids in Proteins", которая включена в описание посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыты ортогональные RS и tPHK пары для встраивания кетоаминокислоты. В PCT публикации № WO 04/094593, озаглавленной "Expanding the Eucariotic Genetic Code", которая включена в описание посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыты ортогональные RS и tPHK пары для встраивания не кодируемых в природе аминокислот в эукариотные клетки-хозяева.

Способы получения по меньшей мере одной рекомбинантной ортогональной аминоксил-тPHK синтетазы (O-RS) включают (а) создание библиотеки (необязательно мутантных) RS, полученных по меньшей мере из одной аминоксил-тPHK синтетазы (RS) из первого организма, включая, без ограничения, прокариотные организмы, такие как *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* или т.п., или эукариотный организм; (b) селекцию (и/или скрининг) библиотеки RS (необязательно мутантных RS) для членов, которые аминоксиллируют ортогональные tPHK (O-tPHK) в присутствии не кодируемой в природе аминокислоты и природной аминокислоты, тем самым обеспечивая создание пула активных (необязательно мутантных) RS; и/или (c) селекцию (необязательно через негативную селекцию) полученного пула по активным RS (включая, без ограничения, мутантные RS), которые преимущественно аминоксиллируют O-tPHK в отсутствие не кодируемой в природе аминокислоты, тем самым обеспечивая получение по меньшей мере одной рекомбинантной O-RS; где по меньшей мере одна рекомбинантная O-RS преимущественно аминоксиллирует O-tPHK не кодируемой в природе аминокислотой.

В одном варианте RS представляет собой неактивную RS. Неактивную RS можно создать путем мутирования активной RS. Например, неактивную RS можно создать в результате мутации по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6 или по меньшей мере около 10 или более аминокислот до получения другой аминокислоты, включая, без ограничения, аланин.

Библиотеки мутантных RS можно создать, используя различные методики, известные специалистам, включая, без ограничения, рациональный дизайн на основе белковой трехмерной структуры RS или мутагенез RS нуклеотидов в методике хаотичного или рационального дизайна. Например, мутантные RS можно создать в результате сайт-специфических мутаций, случайных мутаций, создающих разнообразие рекомбинантных мутаций, химерических конструкций, рационального дизайна и другими методами, раскрытыми здесь или известными специалистам.

В одном варианте селектирование (и/или скрининг) библиотеки RS (необязательно мутантной RS) в отношении активных членов, включая, без ограничения, таких, которые аминоксиллируют ортогональные tPHK (O-tPHK) в присутствии не кодируемой в природе аминокислоты и природной аминокислоты, включает введение позитивного селекционного или скринингового маркера, включая, без ограничения, ген устойчивости к антибиотикам или т.п., и библиотеки (необязательно мутантных) RS в множество клеток, где позитивный селекционный и/или скрининговый маркер включает по меньшей мере один селекторный кодон, включая, без ограничения, амбер-, охра- или опал-кодон; культивирование множества клеток в присутствии селекционного агента; идентификацию клеток, которые выжили (или демонстрируют специфическую реакцию) в присутствии селекционного и/или скринингового агента, путем супрессии по меньшей мере одного селекторного кодона в позитивном селекторном или скрининговом маркере, тем самым обеспечивая субпопуляцию селектированных клеток, которые содержат пул активных (необязательно мутантных) RS. Необязательно, можно изменять концентрацию селекционных и/или скрининговых агентов.

В одном аспекте позитивным селекционным маркером является ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и селекторным кодоном является янтарный стоп-кодон в CAT гене. Необязательно, позитивным селекционным маркером является ген  $\beta$ -лактамазы и селекторным кодоном является янтарный стоп-

кодон в гене  $\beta$ -лактамазы. В другом аспекте позитивный скрининговый маркер включает флуоресцентный или люминесцентный скрининговый маркер или скрининговый маркер на основе аффинности (включая, без ограничения, маркер клеточной поверхности).

В одном варианте негативная селекция или скрининг пула в поисках активных RS (необязательно мутантных), которые преимущественно аминокислотилируют O-тРНК в отсутствие не кодируемой в природе аминокислоты, включает введение негативного селекционного или скринингового маркера с пулом активных (необязательно мутантных) RS из позитивной селекции или скрининга во множество клеток второго организма, где негативный селекторный или скрининговый маркер включает по меньшей мере один селекторный кодон (включая, без ограничения, ген устойчивости к антибиотикам, включая, без ограничения, ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)); и идентификацию клеток, которые выживают или демонстрируют специфические реакции на скрининг в первой среде, дополненной не кодируемой в природе аминокислотой и скрининговым или селекционным агентом, но не выживают или не демонстрируют специфической реакции во второй среде, не дополненной не кодируемой в природе аминокислотой и селекционным или скрининговым агентом, тем самым обеспечивая выживание клеток или скрининг клеток, содержащих по меньшей мере одну рекомбинантную O-RS. Например, CAT идентификационный протокол необязательно действует как позитивная селекция и/или негативный скрининг при определении соответствующих O-RS рекомбинант. Например, пул клонов, необязательно реплицированных на ростовых планшетах, содержащих CAT (который включает по меньшей мере один селекторный кодон) или с одной или более из не кодируемых в природе аминокислот или без них. Колонии, развивающиеся исключительно на планшетах, содержащих не кодируемые в природе аминокислоты, рассматривают таким образом как содержащие рекомбинантные O-RS. В одном аспекте меняют концентрацию селекционного (и/или скринингового) агента. В некоторых аспектах первый и второй организмы отличаются. Так, первый и/или второй организм необязательно включает прокариот, эукариот, млекопитающих, *Escherichia coli*, грибы, дрожжи, *archaebacterium*, *eubacterium*, растения, насекомых, простейших и т.д. В других вариантах скрининговый маркер включает флуоресцентный или люминесцентный скрининговый маркер или маркер скрининга на основе аффинности.

В других вариантах скрининг или отбор (включая, без ограничения, негативный отбор) пула в поисках активных (необязательно мутантных) RS включает выделение пула активных мутантных RS со стадии позитивной селекции (b); введение негативного селекционного или скринингового маркера, где негативный селекционный или скрининговый маркер включает по меньшей мере один селекторный кодон (включая, без ограничения, ген токсического маркера, включая, без ограничения, ген рибонуклеазы-барназы, включающий по меньшей мере один селекторный кодон) и пул активных (необязательно мутантных) RS, во множество клеток второго организма; и идентификацию клеток, которые выживают или демонстрируют специфическую реакцию на скрининг в первой среде, не дополненной не кодируемой в природе аминокислотой, но не выживают и не демонстрируют специфической реакции на скрининг во второй среде, дополненной не кодируемой в природе аминокислотой, тем самым обеспечивая выживание или скринирование клеток, содержащих по меньшей мере одну рекомбинантную O-RS, где по меньшей мере одна рекомбинантная O-RS специфична для не кодируемой в природе аминокислоты. В одном аспекте по меньшей мере один селекторный кодон включает около двух или более селекторных кодонов. Такие варианты необязательно могут включать случаи, когда по меньшей мере один селекторный кодон включает два или более селекторных кодона и где первый и второй организм, включая, без ограничения, представляет собой, необязательно, включая, без ограничения, прокариот, эукариот, млекопитающих, *Escherichia coli*, грибы, дрожжи, архебактерии, эубактерии, растения, насекомых, простейших и т.д.). Также некоторые аспекты включают случаи, где негативный селекционный маркер включает ген рибонуклеазы-барназы (который включает по меньшей мере один селекторный кодон). Другие аспекты включают случаи, когда скрининговый маркер необязательно включает флуоресцентный или люминесцентный скрининговый маркер или скрининговый маркер, основанный на аффинности. В представленных здесь вариантах скрининги и/или селекции необязательно включают вариации жесткости скрининга и/или селекции.

В одном варианте указанные способы продуцирования по меньшей мере одной рекомбинантной ортогональной аминокислотилирующей синтетазы (O-RS) могут дополнительно включать (d) выделение по меньшей мере одной рекомбинантной O-RS; (e) создание второго набора O-RS (необязательно мутантных), полученных по меньшей мере из одной рекомбинантной O-RS; и (f) повторение стадий (b) и (c) до получения мутантной O-RS, которая включает способность преимущественно аминокислотилировать O-тРНК. Необязательно, стадии (d)-(f) повторяют, включая, без ограничения, по меньшей мере около двух раз. В одном аспекте второй набор мутантных O-RS, полученных по крайней мере из одной рекомбинантной O-RS, можно создать, используя мутагенез, включая, без ограничения, случайный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, рекомбинационный мутагенез или их комбинации.

Жесткость стадий селекции/скрининга, включая, без ограничения, стадию позитивной селекции/скрининга (b), стадию негативной селекции/скрининга (c) или обе стадии позитивной и негативной селекции/скрининга (b) и (c), в вышеописанных способах, необязательно, включает различную жесткость селекции/скрининга. В других вариантах стадия позитивной селекции/скрининга (b), стадия негативной



селекции/скрининга (с) или обе стадии позитивной и негативной селекции/скрининга (b) и (с) включают использование репортера, где указанный репортер детектируют, используя сортировку флуоресцентно активированных клеток (FACS) или где указанный репортер детектируют, используя люминесценцию. Обязательно, репортер расположен на клеточной поверхности, на фаговом дисплее или т.п. и селектирован на основании аффинности или каталитической активности, включающей не кодируемую в природе аминокислоту или ее аналог. В одном варианте мутантная синтетаза расположена на клеточной поверхности, на фаговом дисплее или т.п.

Способы получения рекомбинантных ортогональных тРНК (О-тРНК) включают (а) создание библиотеки мутантных тРНК, полученных по крайней мере из одной тРНК, включая, без ограничения, супрессорную тРНК из первого организма; (b) селектирование (включая, без ограничения, негативное селектирование) или скрининг библиотеки в поисках (необязательно мутантных) тРНК, которые аминокислотированы аминокислот-тРНК синтетазой (RS) из второго организма в отсутствие RS из первого организма, тем самым обеспечивая пул тРНК (необязательно мутантных); и (с) селектирование или скрининг полученного пула тРНК (необязательно мутантных) в поисках членов, которые аминокислотированы за счет введенных ортогональных RS (O-RS), тем самым обеспечивая по меньшей мере одну рекомбинантную О-тРНК; где по меньшей мере одна рекомбинантная О-тРНК распознает селекторный кодон и эффективно не распознается RS из второго организма и преимущественно аминокислотирована O-RS. В некоторых вариантах по меньшей мере одна тРНК является супрессорной тРНК и/или включает уникальный кодон из трех природных и/или не природных оснований или представляет собой бессмысленный кодон, редкий кодон, не природный кодон, кодон, включающий по меньшей мере 4 основания, амбер-кодон, охра-кодон или опал-стоп-кодон. В одном варианте рекомбинантные О-тРНК обладают повышенной ортогональностью. Должно быть очевидно, что в некоторых вариантах О-тРНК необязательно импортирована в первый организм из второго организма без необходимости модификации. В различных вариантах первый и второй организмы являются или одинаковыми либо различными и их необязательно выбирают из, включая, без ограничения, прокариот (включая, без ограничения, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium* и т.д.), эукариот, млекопитающих, грибов, дрожжей, археобактерий, эубактерий, растений, насекомых, простейших и т.д. Кроме того, рекомбинантные тРНК необязательно аминокислотированы не кодируемыми в природе аминокислотами, где не кодируемая в природе аминокислота является биосинтезированной *in vivo* или естественным путем либо в результате генетической манипуляции. Не кодируемую в природе аминокислоту необязательно добавляют к ростовой среде, по меньшей мере, для первого или второго организма.

В одном аспекте селектирование (включая, без ограничения, негативное селектирование) или скрининг библиотеки в поисках (необязательно мутантных) тРНК, которые аминокислотированы аминокислот-тРНК синтетазой (стадия (b)) включает введение гена токсического маркера, где ген токсического маркера включает по меньшей мере один из селекторных кодонов (или ген, который вызывает продуцирование токсического или статического агента или гена, незаменимого в организме, где такой маркерный ген включает по меньшей мере один селекторный кодон), и библиотеки (необязательно мутантных) тРНК во множество клеток второго организма; и селектирование выживших клеток, где выжившие клетки содержат пул (необязательно мутантных) тРНК, включающих по меньшей мере одну ортогональную тРНК или нефункциональную тРНК. Например, выжившие клетки можно выбрать, используя анализ сравнения отношения клеточной плотности.

В другом аспекте ген токсического маркера может включать два или более селекторных кодона. В других вариантах указанных способов ген токсического маркера представляет собой ген рибонуклеазы-барназы, где ген рибонуклеазы-барназы включает по меньшей мере один амбер-кодон. Необязательно, ген рибонуклеазы-барназы может включать два или более амбер-кодона.

В одном варианте селектирование или скрининг пула (необязательно мутантных) тРНК в поисках членов, которые аминокислотированы введенными ортогональными RS (O-RS) могут включать введение маркерного гена селекции или скрининга, где ген позитивного маркера включает ген устойчивости к лекарствам (включая, без ограничения, ген  $\beta$ -лактамазы, включающий по меньшей мере один из селекторных кодонов, таких как по меньшей мере один амбер-стоп-кодон) или гена, существенного для организма, или гена, который приводит к детоксификации токсического агента, наряду с O-RS, и пулом (необязательно мутантных) тРНК, во множество клеток второго организма; и идентификацию выживших или скринированных клеток, выращиваемых в присутствии селекционного или скринингового агента, включая, без ограничения, антибиотик, тем самым обеспечивая пул клеток, обладающих по меньшей мере одной рекомбинантной тРНК, где по меньшей мере одна рекомбинантная тРНК аминокислотирована O-RS и встраивает аминокислоту в продукт трансляции, кодируемый геном позитивного маркера, в ответ по меньшей мере на один селекторный кодон. В другом варианте варьируют концентрацию агента селекции и/или скрининга.

Предложены способы создания специфической О-тРНК/O-RS пары. Способы включают (а) создание библиотеки мутантных тРНК, полученных по крайней мере из одной тРНК из первого организма; (b) негативную селекцию или скрининг библиотеки в поисках (необязательно мутантных) тРНК, которые аминокислотированы аминокислот-тРНК синтетазой (RS) из второго организма в отсутствие RS из первого

организма, тем самым обеспечивая пул (необязательно мутантных) тРНК; (с) селектирование или скрининг пула (необязательно мутантных) тРНК в поисках членов, которые аминокислотированы, введенными ортогональными RS (O-RS), тем самым обеспечивая по меньшей мере одну рекомбинантную O-тРНК. По крайней мере одна рекомбинантная O-тРНК распознает селекторный кодон и не эффективно распознается RS из второго организма и преимущественно аминокислотируется O-RS. Указанный способ также включает (d) создание библиотеки (необязательно мутантных) RS, полученных по крайней мере из одной аминокислот-тРНК синтетазы (RS) из третьего организма; (e) селектирование или скрининг библиотеки мутантных RS из членов, которые предпочтительно аминокислотируют по меньшей мере одну рекомбинантную O-тРНК в присутствии не кодируемой в природе аминокислоты и природной аминокислоты, тем самым обеспечивая пул активных (необязательно мутантных) RS; и (f) негативное селектирование или скрининг пула в поисках активных (необязательно мутантных) RS, которые преимущественно аминокислотируют по меньшей мере одну рекомбинантную O-тРНК в отсутствие не кодируемой в природе аминокислоты, тем самым обеспечивая по меньшей мере одну специфическую пару O-тРНК/O-RS, где по меньшей мере одна специфическая пара O-тРНК/O-RS включает по меньшей мере одну рекомбинантную O-RS, которая специфична для не кодируемой в природе аминокислоты, и по меньшей мере одну рекомбинантную O-тРНК. Включены специфические пары O-тРНК/O-RS, полученные указанными способами. Например, специфические пары O-тРНК/O-RS могут включать, включая, без ограничения, пары mut-ПНК-Tyr-mutTyrRS, такие как пара mut-ПНК-Tyr-SSUTyrRS, пара mut-ПНК-Leu-mutLeuRS, пара mut-ПНК-Thr-mutThrRS, пара mut-ПНК-Glu-mutGluRS или т.п. Кроме того, такие методы включают случаи, когда первый и третий организмы одинаковы (включая, без ограничения, *Methanococcus jannaschii*).

Способы селектирования пар ортогональных тРНК-тРНК синтетаз для использования в *in vivo* трансляционной системе второго организма также включены в настоящее изобретение. Указанные способы включают введение маркерного гена, тРНК и аминокислот-тРНК синтетазы (RS), выделенных или полученных из первого организма, в первый набор клеток из второго организма; введение маркерного гена и тРНК в дублирующий набор клеток из второго организма и селекцию выживших клеток в первом наборе, которые не смогли выжить в наборе дубликатных клеток, или скрининг по клеткам, демонстрирующим специфическую реакцию на скрининг, которые не проявили такую реакцию в наборе дубликатных клеток, где первый набор и набор дубликатных клеток выращивают в присутствии селекционного или скринингового агента, где выжившие или скринированные клетки включают пары ортогональных тРНК-тРНК синтетаз для использования в *in vivo* трансляционной системе второго организма. В одном варианте сравнение или селектирование либо скрининг включает *in vivo* комплементационный анализ. Концентрации селекционного или скринингового агентов могут меняться.

Организмы настоящего изобретения включают различные организмы и различные комбинации. Например, первый и второй организмы указанных способов настоящего изобретения могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте организмы являются необязательно прокариотными организмами, включая, без ограничения, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* или т.п. Альтернативно, организмы, необязательно, включают эукариотный организм, включая, без ограничения, растения (включая, без ограничения, сложные растения, такие как однодольные или двудольные), водоросли, простейшие, грибы (включая, без ограничения, дрожжи и т.д.), животных (включая, без ограничения, млекопитающих, насекомых, членистоногих и т.д.) или т.п. В другом варианте второй организм представляет собой прокариотный организм, включая, без ограничения, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* или т.п. Альтернативно, второй организм может быть эукариотным организмом, включая, без ограничения, дрожжи, клетки животных, грибы, клетки млекопитающих или т.п. В различных вариантах первый и второй организмы отличаются.

#### VI. Положения неприродных аминокислот в полипептидах bG-CSF.

В настоящем изобретении рассматривают встраивание одной или более из неприродных аминокислот в полипептиды bG-CSF. Одну или более из неприродных аминокислот можно встроить в конкретное положение, которое не нарушает активности полипептида. Этого можно достичь, осуществляя "консервативные" замещения, включая, без ограничения, замещения гидрофобных аминокислот гидрофобными аминокислотами, объемных аминокислот объемными аминокислотами, гидрофильных аминокислот гидрофильными аминокислотами и/или встраивая неприродную аминокислоту в положение, которого не требуется для активности.

Можно использовать различные биохимические и структурные подходы для выбора нужных сайтов для замещения не кодируемой в природе аминокислотой в полипептиде bG-CSF. Специалистам в данной области должно быть понятно, что любое положение полипептидной цепи пригодно для выбора для включения не кодируемой в природе аминокислоты и селекция может быть основана на рациональном дизайне или на случайной селекции для любой конкретной необходимой цели. Выбор необходимых сайтов может быть сделан для продуцирования bG-CSF молекул, обладающих любыми желательными свойствами и активностями, включая, без ограничения, агонистическую, суперагонистическую, обратную агонистическую, антагонистическую, молекул-модуляторов связывания рецепторов, модуляторов актив-

ности рецепторов, образования димеров или тримеров либо мультимеров, отсутствия изменения активности или свойств, сравнимых с природными молекулами, или манипулирования любыми физическими или химическими свойствами полипептида, такими как растворимость, агрегация или стабильность. Например, положения в полипептиде, требуемые для биологической активности полипептидов bG-CSF, можно определить, используя анализ точечных мутаций, сканирование аланином, мутагенез насыщения и скрининг по биологической активности или методы сканирования гомологов, известные специалистам. Другие методы можно использовать для идентификации остатков для модификации полипептидов bG-CSF, которые включают, без ограничения, профилирование последовательности, селекцию библиотеки ротамеров, потенциалы пар остатков и рациональный дизайн, используя технологию автоматизации конструирования белков (см. патенты США Nos. 6188965; 6269312; 6403312; WO 98/47089, которые включены в описание посредством ссылки). Остатки, которые являются критичными для биоактивности bG-CSF, остатки, которые связаны с фармацевтической стабильностью, эпитопы антител или остатки связывающие рецептор, можно подвергнуть мутации. В патентах США №№ 5580723; 5834250; 6013478; 6428954 и 6451561, которые включены в описание посредством ссылки, раскрыты методы систематического анализа структур и функций полипептидов, таких как bG-CSF, путем идентификации активных доменов, которые влияют на активность полипептида веществом-мишенью. Исследования мутагенеза сканированием аланином G-CSF раскрыты в Reidhaar-Olson J.F. et al., *Biochemistry* (1996), Jul. 16; 35(28): 9034-41, Young D.C. et al., *Protein Sci.* (1997), Jun., 6(6):1228-36 и Layton et al. (1997), *JBC*, 272 (47):29735-2974]. Остатки, другие, чем те, которые идентифицированы, как критичные для биологической активности, мутагенезом сканирования аланином или его гомологами могут оказаться хорошими кандидатами на замещение не кодируемой в природе аминокислотой в зависимости от активности, которая желательна для полипептида. Альтернативно, сайты, идентифицированные как критичные для биологической активности, могут также быть хорошими кандидатами для замещения не кодируемой в природе аминокислотой, снова в зависимости от активности, которая желательна для полипептида. Другой альтернативой могут быть просто серийные замещения в каждом положении полипептидной цепи не кодируемой в природе аминокислотой и наблюдение за влиянием на активности полипептида. Специалисты в рассматриваемой области смогут легко понять, что любые средства, технологии или методы для выбора положения для замещения неприродной аминокислотой в любом полипептиде пригодны для использования в настоящем изобретении.

Структура и активность мутантов полипептидов bG-CSF, которые содержат делеции, также можно исследовать для определения участков белка, которые, по-видимому, толерантны к замещению не кодируемой в природе аминокислотой. Аналогичным образом можно использовать протеазное расщепление и моноклональные антитела для идентификации участков bG-CSF, которые ответственны за связывание его рецептора. Layton et al. (2001), *JBC*, 276 (39) 36779-36787 раскрывает исследования антитела к hG-CSF и его рецептором. После того как были удалены остатки, которые, по-видимому, нетолерантны к замещению не кодируемыми в природе аминокислотами, можно исследовать влияние предполагаемого замещения по каждому из оставшихся положений. Можно создать модели трехмерных кристаллических структур других членов семейства CSF и CSF рецепторов. Банк данных белковых структур (Protein Data Bank) (PDB, доступный на World Wide Web по адресу rcsb.org) представляет собой централизованную базу данных, содержащую данные о трехмерных структурах крупных молекул белков и нуклеиновых кислот. Можно создать модели для исследования вторичных и третичных структур полипептидов, если недоступны данные о трехмерных структурах. Результаты рентгеновских кристаллографических исследований и ЯМР структур hG-CSF доступны в банке данных белковых структур с PDB ID's: 1CD9, 1PGR, 1RHG, 1GNC так же, как в патентах США № 5581476 и 5790421, которые включены в описание посредством ссылки. Таким образом, специалисты в данной области могут легко определить положения аминокислот, которые могут быть замещены не кодируемыми в природе аминокислотами.

В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF настоящего изобретения включают одну или более из неприродных аминокислот, расположенных в участке белка, который не разрушает структуру полипептида.

Примерами остатков встраивания не кодируемой в природе аминокислоты могут быть такие, которые исключены из потенциальных участков рецепторного связывания, они могут быть полностью или частично экспонированы растворителю, могут иметь минимальные или вовсе не иметь связывающих водородных взаимодействий с близлежащими остатками, могут быть минимально экспонированы близлежащим реакционноспособным остаткам, могут быть расположены на одной или более из экспонированных сторон, могут быть сайтом или сайтами, которые расположены рядом со вторым bG-CSF, или другими молекулами или их частями, могут быть участками, которые чрезвычайно гибкие или структурно жесткие, как предсказано по данным трехмерной вторичной, третичной или четвертичной структуры bG-CSF, связанного или не связанного с его рецептором, или присоединенного или неприсоединенного к другой биологически активной молекуле, или могут модулировать конформацию самого bG-CSF или димера либо мультимера, включающего один или более из bG-CSF, путем изменения гибкости или жесткости полной структуры при желании.

Специалисту в данной области должно быть понятно, что такие анализы bG-CSF дают возможность

определить, какие аминокислотные остатки экспонированы на поверхности по сравнению с аминокислотными остатками, которые находятся в глубине третичной структуры белка. Поэтому одним вариантом целей настоящего изобретения является замещение не кодируемой в природе аминокислотой аминокислоты, которая представляет собой экспонированный на поверхности остаток.

В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений в bG-CSF: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любых их комбинаций (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2 либо соответствующих аминокислот в другом полипептиде bG-CSF).

В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включены в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любую их комбинацию из SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включены по одному или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166 и любых их комбинаций SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одну или более из не кодируемых в природе аминокислот включают по одному или более из следующих положений bG-CSF: 62, 133 и их комбинаций (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в положении 62 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот включена в положении 133 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах полипептид настоящего изобретения включает одно или более из замещений, добавлений или делеций природной аминокислоты. В некоторых вариантах одна или более из неприродных аминокислот встроены в лидерную или сигнальную последовательность, которая представляет собой N или C терминал в SEQ ID NO: 1, 2, или другой bG-CSF последовательности. В некоторых вариантах одна или более не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 1) и одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот не включает гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, триптофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, треонин или природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 2) и одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот не включает гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, триптофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, треонин или природных непротеогенных аминокислот, таких как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д. В некоторых вариантах аминокислота, встроенная в положении 133 SEQ ID NO: 1 или в соответствующее положение в SEQ ID NO: 2, является аминокислотой, другой, нежели гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, триптофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, треонин, или природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д.

В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот является рибосомально встроенной в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 1) и одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот не включает гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, триптофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, треонин, или природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот рибосомально встроена в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 2) и одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот не включает гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, триптофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, треонин, или природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д. В некоторых вариантах аминокислота, рибосомально встроенная в положении 133 SEQ ID NO: 1 или в соответствующем положении SEQ ID NO: 2, представляет собой аминокислоту, другую, нежели гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, трип-

тофан, аланин, цистеин, аспарагины, валин, глицин, серин, глутамин, тирозин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, треонин, или природные непротеогенные аминокислоты, такие как  $\beta$ -аланин, орнитин и т.д. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроена в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 1), где одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот содержит (или содержат) функциональную группу или группы, которые не распознаются эндогенной RS. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроена в одно или более из положений bG-CSF (SEQ ID NO: 2), где одна или более из не кодируемых в природе аминокислот или кислот содержит (или содержат) функциональную группу или группы, которые не распознаются эндогенной RS. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF настоящего изобретения содержит аминокислоту, встроенную в положение 133 SEQ ID NO: 1, или в соответствующем положении в SEQ ID NO: 2, где аминокислота содержит (или содержат) функциональную группу или группы, которые не распознаются эндогенной RS. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF настоящего изобретения содержит пара-ацетилфенилаланин, встроенный в положение 133 SEQ ID NO: 1, или в соответствующем положении в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах полипептид bG-CSF настоящего изобретения содержит пара-аминофенилаланин, встроенный в положение 133 SEQ ID NO: 1, или в соответствующем положении в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка), и любую их комбинацию (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2 или соответствующих аминокислот в другом полипептиде bG-CSF).

В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 3, 7, 62, 133, 166 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения 62, 133 и их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 62 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 133 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в сигнальной или лидерной последовательности N- или C-терминальной для SEQ ID NO: 1, 2 или других bG-CSF последовательностей связана с водорастворимым полимером.

Исследование кристаллической структуры члена (членов) семейства bG-CSF или bG-CSF и его взаимодействия с рецептором G-CSF может указать, какие именно аминокислотные остатки имеют боковые цепи, которые полностью или частично доступны для растворителя. Боковая цепь не кодируемой в природе аминокислоты в указанных положениях может выделиться с поверхности белка и перейти в растворитель.

Широкий круг не кодируемых в природе аминокислот может быть заместителем для или может быть встроены в конкретное положение в полипептиде bG-CSF. Обычно конкретную не кодируемую в природе аминокислоту выбирают для встраивания на основании изучения трехмерной кристаллической структуры bG-CSF полипептидов или других членов семейства G-CSF с его рецептором, причем предпочтение отдается консервативным замещениям (т.е. арилсодержащим не кодируемым в природе аминокислотам, таким как п-ацетилфенилаланин или О-пропаргилтирозин, замещающим Phe, Tug или Trp), и используют специфические реакции для конъюгирования молекулы, которую необходимо ввести в полипептид bG-CSF (например, включить 4-азидофенилаланин, если необходимо осуществить [3+2] циклоприсоединение Хьюсгена с водорастворимым полимером, содержащим алкиновую молекулу, или образование амидной связи с водорастворимым полимером, который содержит ариловый сложный эфир, который, в свою очередь, включает фосфиновую молекулу).

В одном варианте указанный способ дополнительно включает встраивание в белок неприродной аминокислоты, где неприродная аминокислота включает первую реакционноспособную группу; и осуществление контактирования белка с молекулой (включая, без ограничения, гидроксиалкилкрахмал (HAS), гидроксиэтилкрахмал (HES), метку, краситель, полимер, водорастворимый полимер, производное полиэтиленгликоля, фотосшивающий линкер, радионуклид, цитотоксическое соединение, лекарство, метку аффинности, метку фотоаффинности, реакционноспособное соединение, смола, второй белок или полипептид или аналог полипептида, антитело или фрагмент антитела, металлохелатор, кофактор, жирную кислоту, углевод, полинуклеотид, ДНК, РНК, антисмысловый полинуклеотид, сахарид, водорастворимый дендример, циклодекстрин, ингибиторную аминокислоту, биоматериал, наночастицы, спиновую метку, флуорофор, металлсодержащую молекулу, радиоактивную молекулу, новую функциональную группу, группу, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другими молекулами, фотостабилизирующую молекулу, молекулу, возбуждаемую актиничной радиацией, фотоизомеризуемую молекулу, биотин, производное биотина, аналог биотина, молекулу, включающую тяжелый атом, химически отщепляемую группу, фотоотщепляемую группу, удлиненную боковую цепь, сахар, связанный с углеродом, окислительно-восстановительный агент, аминокислоту, токсическую молекулу, изотопномеченую молекулу, биофизический зонд, фосфоресцентную группу, хемиллюминесцентную группу, электроноплотную группу, магнитную группу, интеркалирующую группу, хромофор, агент переноса энергии, биологически активный агент, детектируемую метку, малую молекулу, наночастицы, нанотрансмиттер, радионуклеотид, радиотрансмиттер, агент захвата нейтрона или любую комбинацию вышеперечисленных или других необходимых соединений или веществ), которые включают вторую реакционноспособную группу. Первая реакционноспособная группа реагирует со второй реакционноспособной группой, для присоединения молекулы к неприродной аминокислоте в результате [3+2] циклоприсоединения. В одном варианте первая реакционноспособная группа представляет собой алкинильную молекулу или азидомолекулу и вторая реакционноспособная группа представляет собой азидомолекулу или алкинильную молекулу. Например, первая реакционноспособная группа представляет собой алкинильную молекулу (включая, без ограничения, в неприродной аминокислоте *p*-пропаргилоксифенилаланин) и вторая реакционноспособная группа представляет собой азидомолекулу. В другом примере первая реакционноспособная группа представляет собой азидомолекулу (включая, без ограничения, в неприродной аминокислоте *p*-азидо-*L*-фенилаланин) и вторая реакционноспособная группа представляет собой алкинильную молекулу.

В некоторых случаях замещение (замещения) не кодируемой в природе аминокислотой могут объединяться с другими добавлениями, замещениями или делециями внутри полипептида bG-CSF для воздействия на другие биологические характеристики полипептида bG-CSF. В некоторых случаях другие добавления, замещения или делеции могут повысить стабильность (включая, без ограничения, устойчивость к протеолитическому расщеплению) полипептида bG-CSF или могут повысить аффинность полипептида bG-CSF в отношении его рецептора. В некоторых случаях другие добавления, замещения или делеции могут повысить фармацевтическую стабильность полипептида bG-CSF. В некоторых случаях другие добавления, замещения или делеции могут повысить биологическую активность полипептида bG-CSF. В некоторых случаях другие добавления, замещения или делеции могут повысить растворимость (включая, без ограничения, будучи экспрессированы в *E. coli* или другие клетки-хозяева) полипептида bG-CSF. В некоторых вариантах добавления, замещения или делеции могут повысить растворимость полипептида bG-CSF после экспрессии в *E. coli* или в других рекомбинантных клетках-хозяевах. В некоторых вариантах, таким образом, выбирают сайты для замещения кодируемой в природе или неприродной аминокислотой в добавлении к другим сайтам для встраивания неприродной аминокислоты, чтобы это привело к повышению растворимости полипептида после экспрессии в *E. coli* или в других рекомбинантных клетках-хозяевах. В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF включают другие добавления, замещения или делеции, которые модулируют сродство к рецептору, связывание белков или ассоциированных лигандов, модулируют трансдукцию сигнала после связывания с рецептором, модулируют циркуляционное время полужизни, модулируют выделение или биодоступность, облегчают очистку или улучшают или изменяют конкретный способ введения. В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF включают добавления, замещения или делеции, которые повышают сродство варианта bG-CSF к его рецептору. Аналогично, полипептиды bG-CSF могут включать химические или ферментные последовательности расщепления, протеазные последовательности расщепления, реакционноспособные группы, домены, связывающие антитела (включая, без ограничения, FLAG или poly-His) или другие последовательности на основе аффинности (включая, без ограничения, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связанные молекулы (включая, без ограничения, биотин), которые улучшают детектирование (включая, без ограничения, GFP), очистку, транспорт через ткани или клеточные мембраны, выделение пролекарств или активацию, уменьшение размера bG-CSF или другие характеристики полипептида.

В некоторых вариантах замещение не кодируемой в природе аминокислотой приводит к созданию антагониста bG-CSF. В некоторых вариантах не кодируемую в природе аминокислоту замещают или добавляют в участок, участвующий в рецепторном связывании. В некоторых вариантах антагонисты bG-CSF включают по меньшей мере одно замещение, которое заставляет bG-CSF функционировать как ан-

тагонист. В некоторых вариантах bG-CSF антагонист включает не кодируемую в природе аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером, который присутствует в участке рецепторного связывания молекулы bG-CSF.

В некоторых вариантах замещение не кодируемой в природе аминокислотой приводит к созданию антагониста bG-CSF. В некоторых вариантах антагонист bG-CSF включает не кодируемую в природе аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером, который присутствует в участке рецепторного связывания молекулы bG-CSF.

В некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислоты замещены одной или более из не кодируемых в природе аминокислот. В некоторых случаях полипептид bG-CSF включает далее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более из замещений природной аминокислоты одной или более из не кодируемых в природе аминокислот. Например, в некоторых вариантах один или более из остатков в bG-CSF замещен одной или более из не кодируемых в природе аминокислот. В некоторых случаях один или более из не кодируемых в природе остатков связан с одним или более из низкомолекулярных линейных или разветвленных ПЭГ, тем самым повышая аффинность связывания и время полужизни по сравнению с остатками, присоединенными к одному высокомолекулярному ПЭГ.

В некоторых вариантах вплоть до двух из следующих остатков bG-CSF замещены одной или более из не кодируемых в природе аминокислот.

#### VII. Экспрессия в не эукариоты и в эукариоты.

Для достижения высоких уровней экспрессии клонированных полинуклеотидов bG-CSF обычно субклонировать полинуклеотиды, кодирующие полипептид bG-CSF настоящего изобретения в вектор экспрессии, который содержит сильный промотор для управления транскрипцией, терминатор транскрипции/трансляции и, если для кодирующей белок аминокислоты, сайт связывания рибосомы для инициирования трансляции. Подходящие бактериальные промоторы известны специалистам в данной области и раскрыты, например, у Sambrook et al. и Ausubel et al.

Бактериальные экспрессионные системы для экспрессии полипептидов bG-CSF настоящего изобретения доступны в, включая, без ограничения, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* и *Salmonella* (Palva et al., *Gene*, 22:229-235 (1983); Mosbach et al., *Nature*, 302:543-545 (1983)). Наборы для таких экспрессионных систем коммерчески доступны. Эукариотные экспрессионные системы для клеток млекопитающих, дрожжей и насекомых, хорошо известны специалистам в данной области и также коммерчески доступны. В тех случаях, когда ортогональные тРНК и аминоацил-тРНК синтетазы (описанные выше) используют для экспрессии полипептидов bG-CSF настоящего изобретения, клетки-хозяева для экспрессии выбирают на основании их способности использовать ортогональные компоненты. Примеры клеток-хозяев включают грам-положительные бактерии (включая, без ограничения, *B. brevis*, *B. subtilis* или *Streptomyces*) и грам-отрицательные бактерии (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), а также дрожжи и другие эукариотные клетки. Клетки, включающие O-тРНК/O-RS пары, можно использовать, как раскрыто в данном описании.

Эукариотные клетки-хозяева или не эукариотные клетки-хозяева настоящего изобретения обеспечивают способность синтеза белков, которые включают неприродные аминокислоты в больших количествах. В одном аспекте композиция необязательно включает, без ограничения, по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 500 мкг, по меньшей мере 1, по меньшей мере 10, по меньшей мере 100 мг, по меньшей мере 1 г или больше белка, который включает неприродную аминокислоту, или такое количество, которое можно обеспечить, используя *in vivo* способы получения белка (здесь приводятся подробности получения и очистки рекомбинантных белков). В другом аспекте белок необязательно присутствует в композиции в концентрации, включая, без ограничения, по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 500 мкг на 1 л, по меньшей мере 1 или по меньшей мере 10 мг белка на 1 л или больше, включая, без ограничения, в клеточном лизате, буфере, фармацевтическом буфере или в других жидких суспензиях (включая, без ограничения, в объеме, включая, без ограничения, от около 1 мл до около 100 л или больше). Получение больших количеств (включая, без ограничения, больших, чем обычно, возможно с использованием других методов, включая, без ограничения, *in vitro* трансляцию) белка в эукариотных клетках, включающих по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, составляет отличительную особенность настоящего изобретения.

Эукариотные клетки-хозяева или не эукариотные клетки-хозяева настоящего изобретения обеспечивают способность к биосинтезу белков, которые включают неприродные аминокислоты в больших полезных количествах. Например, белки, включающие неприродную аминокислоту, можно получать в концентрациях, включая, без ограничения, по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 или по меньшей мере 500, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мг/л, 1, 5, 10 г/л или

больше белка в клеточном экстракте, в клеточном лизате, в культуральной среде, в буфере и/или т.п.

Ряд векторов, пригодных для экспрессии bG-CSF, коммерчески доступен. Подходящие экспрессионные векторы для эукариотных хозяев включают, без ограничения, векторы, включающие экспрессионные контрольные последовательности из SV40, бычьего папилломовируса, аденовируса и цитомегаловируса. Такие векторы включают pCDNA3.1(+)/Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) и pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., USA). Можно также использовать бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *E. coli*, включая pBR322, pET3a и pET12a, плазмиды из широкого круга хозяев, такие как RP4, фаговые ДНК, например многочисленные производные фага-лямбда, например NM989, и другие ДНК фаги, такие как M13 и нитчатые одноцепочечные ДНК фаги. 2-мк плазмиду и ее производные, POT1 вектор (патент США № 4931373, который включен в описание посредством ссылки), pJSO37 вектор, описанный в (Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996) и pPICZ A, B или C (Invitrogen), можно использовать с дрожжевыми клетками-хозяевами. Для клеток насекомых указанные векторы включают, без ограничения, pVL941, pBG311 (Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, p. 685-98 (1986), pBluebac 4.5 и pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид bG-CSF, может включать или не включать последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Сигнальный пептид присутствует, если полипептид должен секретироваться из клетки, в которой он экспрессируется. Таким сигнальным пептидом может быть любая последовательность. Сигнальный пептид может быть прокариотным или эукариотным. Coloma, M. (1992) J. Imm. Methods, 152:89-104 описывает сигнальный пептид для использования в клетках млекопитающих (сигнальный пептид мышины Ig-к легкой цепи). Другие сигнальные пептиды включают, без ограничения, сигнальный пептид  $\alpha$ -фактора из *S. cerevisiae* (патент США № 4870008, который включен в описание посредством ссылки), сигнальный пептид амилазы слюнной железы мыши (O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, p. 643-646), модифицированный сигнальный пептид карбоксипептидазы (L.A. Vails et al., Cell 48, 1987, p. 887-897), BARI сигнальный пептид дрожжей (WO 87/02670, который включен в описание посредством ссылки) и сигнальный пептид (YAP3) аспартик-протеазы 3 дрожжей (cf. M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, p. 127-137).

Примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих хорошо известны специалистам в данной области. Такие клетки-хозяева могут быть клетками яичников китайского хомяка (CHO) (например, CHO-K1; ATCC CCL-61), клетками зеленых обезьян (COS) (например, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); мышинными клетками (например, NS/O), клеточными линиями почек детеныша хомяка (BHK) (например, ATCC CRL-1632 или ATCC CCL-10) и человеческими клетками (например, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), также как растительными клетками в культуре тканей. Указанные клеточные линии, также как и другие, доступны из общественных депозитариев, таких как American Type Culture Collection, Rockville, Md. Для достижения улучшенного гликозилирования полипептида bG-CSF клетки-хозяева млекопитающего можно модифицировать для экспрессии сиалилтрансферазы, например 1,6-сиалилтрансферазы, например, как раскрыто в патенте США № 5047335, который включен в описание посредством ссылки.

Способы введения экзогенной ДНК в клетки-хозяева млекопитающих включают, без ограничения, кальцийфосфат-опосредованную трансфекцию, электропорацию, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, липосомами опосредованную трансфекцию, вирусные векторы и методы трансфекции, раскрытые в Life Technologies Ltd, Paisley, UK с использованием липофектамина 2000 и Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA с использованием FuGENE 6. Указанные методы хорошо известны специалистам в данной области и раскрыты у Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. Культивирование клеток млекопитающих можно осуществить в соответствии с общепринятыми способами, например, как раскрыто в (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA и Harrison Mass, и Rae I.F., General Methods of Cell Culture, Cambridge University Press, 1997).

#### I. Экспрессионные системы, культивирование и выделение.

Полипептиды bG-CSF можно экспрессировать в любых подходящих экспрессионных системах, включая, например, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и бактерии. Далее приводится описание примеров экспрессионных систем.

#### Дрожжи.

Термин "дрожжи" включает любые различные дрожжи, способные к экспрессии гена, кодирующего полипептид bG-CSF. Такие дрожжи включают, без ограничения, Ascosporogenous yeasts (Endomycetales), Basidiosporogenous yeasts и дрожжи, принадлежащие к группе Fungi imperfecti (Blastomycetes). Ascosporogenous yeasts подразделяются на два семейства, Spermophthoraceae и Saccharomycetaceae. Последнее состоит из четырех субсемейств, Schizosaccharomycoidae (например, рода Schizosaccharomyces), Nadsonioideae, Lipomycoideae и Saccharomycoidae (например, родов Pichia, Kluyveromyces и Saccharomyces). Basidiosporogenous дрожжи включают рода Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus, Filobasidium, и Filobasidiella. Дрожжи, принадлежащие к группе Fungi Imperfecti (Blastomycetes), подразделяются на



два семейства, Sporobolomycetaceae (например, род *Sporobolomyces* и *Bullera*) и Cryptococcaceae (например, род *Candida*).

Особый интерес для использования в рамках настоящего изобретения представляют виды из родов *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* и *Candida*, включая, без ограничения, *P. pastoris*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* и *H. polymorpha*.

Проблема выбора подходящих дрожжей для экспрессии полипептидов bG-CSF хорошо известна специалистам в данной области. При выборе дрожжей-хозяев для экспрессии подходящие хозяева могут включать те, которые, как показано, обладают, например, высокой секреторной способностью, низкой протеолитической активностью, хорошей секреторной способностью, хорошей производительностью растворимого белка и общей устойчивостью. Дрожжи обычно доступны из различных источников, включая, без ограничения, Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) и American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA).

Термины "дрожжи-хозяева" или "дрожжевые клетки-хозяева" включают дрожжи, которые могут быть или были использованы как реципиенты для рекомбинантных векторов или других транспортных ДНК. Термин включает потомство оригинальных дрожжевых клеток-хозяев, в которые ввели рекомбинантные векторы или другие транспортные ДНК. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки может необязательно быть полностью идентичным с точки зрения морфологии или генома либо комплемента полной ДНК с первоначальным родителем из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомки родительской клетки, которые достаточно сходны с родителем, чтобы быть охарактеризованными соответствующими свойствами, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид bG-CSF, включены в потомство в соответствии с указанным определением.

Векторы экспрессии и трансформации, включая экстрахромосомальные репликоны или интегрирующие векторы, были созданы для трансформации во многих дрожжевых хозяевах. Например, экспрессионные векторы были созданы для *S. cerevisiae* (Sikorski et al., GENETICS (1989), 122:19; Ito et al., J. BACTERIOL. (1983), 153: 163; Hinnen et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978), 75:1929); *C. albicans* (Kurtz et al., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985), 25: 141); *H. polymorpha* (Gleeson et al., J. GEN. MICROBIOL. (1986), 132:3459; Roggenkamp et al., MOL. GENETICS и GENOMICS (1986), 202:302); *K. fragilis* (Das et al., J. BACTERIOL. (1984), 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt et al., J. BACTERIOL. (1983), 154:737; Van den Berg et al., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990), 8:135); *P. guilliermondii* (Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985), 25:141); *P. pastoris* (патенты США №№ 5324639; 4929555 и 4837148; Cregg et al., MOL. CELL. BIOL. (1985), 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach et al., NATURE (1982), 300:706) и *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance et al., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983), 112:284-89; Tilburn et al., Gene (1983) 26:205-221 и Yelton et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984), 81: 1470-74); *A. niger* (Kelly и Hynes, EMBO J. (1985), 4:475-479); *T. reesia* (EP 0244234) и нитчатых грибов, таких как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium* (WO 91/00357), причём все они включены в описание посредством ссылки.

Контрольные последовательности для дрожжевых векторов хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения, промоторные участки из генов, такие как алкоголь-дегидрогеназа (ADH) (EP 0284044); энолаза; глюкокиназа; глюкозо-6-фосфат-изомераза; глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAP или GAPDH); гексокиназа; фосфофруктокиназа; 3-фосфоглицерат мутаза и пируваткиназа (PyK) (EP 0329203). Ген дрожжей PHO5, кодирующий кислую фосфатазу, также может обеспечить промоторные последовательности (Miyanohara et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983), 80:1). Другие подходящие промоторные последовательности для использования с дрожжевыми хозяевами могут включать промоторы для 3-фосфоглицераткиназы (Hitzeman et al., J. BIOL. CHEM. (1980), 255: 12073) и другие гликолитические ферменты, такие как пируват декарбоксилаза, триоцефосфат изомераза и фосфоглюкозо изомераза (Holland et al., BIOCHEMISTRY (1978), 17:4900; Hess et al., J. ADV. ENZYME REG. (1969), 7: 149). Вводимые дрожжевые промоторы обладают дополнительным преимуществом транскрипции, контролируемой условиями роста, могут включать промоторные участки для алкоголь-дегидрогеназы 2; изоцитохрома C; кислой фосфатазы; металлотронеина; глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы; деструктивных ферментов, связанных с метаболизмом азота; и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования в дрожжевой экспрессии раскрыты еще в EP 0073657.

Дрожжевые энхансеры также можно использовать с дрожжевыми промоторами. Кроме того, синтетические промоторы также могут функционировать как дрожжевые промоторы. Например, расположенные в прямом направлении активирующие последовательности (UAS) дрожжевого промотора могут быть соединены с участком активации транскрипции другого дрожжевого промотора, создавая синтетический гибридный промотор. Примеры таких гибридных промоторов включают ADH регуляторную последовательность, связанную с участком активации транскрипции GAP; см. патенты США №№ 4880734 и 4876197, которые включены в описание посредством ссылки. Другие примеры гибридных промоторов включают промоторы, которые состоят из регуляторных последовательностей ADH2, GAL4, GAL10, или PHO5 генов, объединенных с участками активации транскрипции гена гликолитического фермента, та-

кими как GAP или PyK; см. EP 0164556. Кроме того, дрожжевой промотор может включать природные промоторы не дрожжевого происхождения, которые обладают способностью связывать полимеразу дрожжевой РНК и инициировать транскрипцию.

Другие контрольные элементы, которые могут включать часть экспрессионных векторов дрожжей, включают терминаторы, например, из генов GAPDH или энолазы (Holland et al., J. BIOL. CHEM. (1981), 256:1385). Кроме того, источник репликации из 2  $\mu$  плазмидного источника пригоден для дрожжей. Подходящим селекционным геном для использования в дрожжах является *trp1* ген, присутствующий в дрожжевой плазмиде; см. Tschumper et al., Gene (1980), 10: 157; Kingsman et al., Gene (1979), 7: 141. *trp1* ген обеспечивает селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в триптофане. Аналогично, *Leu2*-дефицитные штаммы дрожжей (ATCC 20,622 или 38,626) дополнены известными плазмидами, содержащими *Leu2* ген.

Методы встраивания экзогенной ДНК в дрожжи-хозяева хорошо известны специалистам в данной области и обычно включают, без ограничения, или трансформацию сферопластов либо использование интактных дрожжевых клеток-хозяев, обработанных щелочными катионами. Например, трансформацию дрожжей можно вести в соответствии со способом, раскрытым Hsiao et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979), 76:3829 и Van Solingen et al. J. BACT. (1977), 130:946. Однако можно использовать другие методы для встраивания ДНК в клетки, такие как ядерная инъекция, электропорация, или слияние протопластов, как раскрыто в SAMBROOK ET AL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Дрожжевые клетки-хозяева можно затем культивировать, используя стандартные методики, хорошо известные специалистам в данной области.

Другие способы экспрессии гетерологичных белков в дрожжевых клетках-хозяевах хорошо известны специалистам в данной области; см. патентную публикацию США № 20020055169, патенты США Nos. 6361969; 6312923; 6,183,985; 6083723; 6017731; 5674706; 5629203; 5602034 и 5089398; пересмотренные патенты США Nos. RE37343 и RE35/749; РСТ опубликованные патентные публикации WO 99/07862; WO 98/37208 и WO 98/26080; европейские патентные заявки EP 0946736; EP 0732403; EP 0480480; WO 90/10277; EP 0340986; EP 0329203; EP 0324274 и EP 0164556; см. также Gellissen et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992), 62(1-2): 79-93; Romanos et al., Yeats (1992) 8(6): 423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990), 185: 3-7, которые включены в описание посредством ссылки.

Штаммы дрожжей-хозяев можно выращивать в ферментерах во время стадии амплификации, используя стандартные способы периодической ферментации с подпиткой, хорошо известные специалистам в данной области. Методы ферментации можно адаптировать с учетом различий в схемах использования углерода конкретными дрожжами-хозяевами или в типах контроля экспрессии. Например, ферментация *Saccharomyces* дрожжей-хозяев может потребовать только глюкозного питания, комплексного источника азота (например, казеинового гидролизата) и множества витаминных добавок. Напротив, метилотрофные дрожжи *P. pastoris* могут требовать глицерин, метанол и следовые количества минерального питания, но только простые аммонийные (азот) соли для оптимального роста и экспрессии; см., например, патент США № 5324639; Elliott et al., J. PROTEIN CHEM. (1990), 9:95 и Fieschko et al., BIOTECH. BIOENG. (1987), 29:1113, которые включены в описание посредством ссылки.

Однако такие методы ферментации могут обладать некоторыми общими чертами независимо от используемых штаммов дрожжей-хозяев. Например, ограничивающее рост питательное вещество, обычно углерод, можно добавлять в ферментер во время фазы амплификации, чтобы обеспечить максимальный рост. Кроме того, в методах ферментации обычно используют ферментационную среду, содержащую адекватные количества углерода, азота, основных солей, фосфора и других минорных питательных веществ (витаминов, следовых количеств минералов и солей и т.д.). Примеры ферментационных сред, подходящих для использования с *Pichia*, раскрыты в патентах США №№ 5324639 и 5231178, которые включены в описание посредством ссылки.

Клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом.

Термины "насекомое-хозяин" или "клетка-хозяин насекомого" относятся к насекомым, которые могут быть или были использованы в качестве реципиентов для рекомбинантных векторов или других транспортных ДНК. Термин включает потомство исходной клетки-хозяина насекомого, которая была трансфектирована. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки вовсе не обязательно будет полностью идентично морфологично или геномно или по полному ДНК комплементу исходной родительской клетке, из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомство родительской клетки, которое обладает достаточным сходством с родительской клеткой, чтобы характеризоваться соответствующими свойствами, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид bG-CSF, включены в понятие потомство в соответствии с приведенным определением.

Способы селекции подходящих клеток насекомых для экспрессии полипептидов bG-CSF хорошо известны специалистам в данной области. Некоторые виды насекомых хорошо описаны в литературе и коммерчески доступны, включая *Aedes aegypti*, *Bombux mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*. При селекции клеток-хозяев для экспрессии подходящие хозяева могут включать те, которые, как показано, обладают, наряду с другими, хорошей секреторной способностью, низкой протеолитической активностью и общей устойчивостью. Обычно насекомые доступны из различных

источников, включая, без ограничения, Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics и Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) и в American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA).

Обычно компоненты экспрессионных систем насекомых, инфицированных бакуловирусом, включают вектор переноса, обычно бактериальную плазмиду, которая содержит как фрагмент бакуловирусного генома, так и обычный рестрикционный сайт для встраивания подлежащего экспрессии гетерологического гена; дикого типа бакуловирус, последовательности которого гомологичны бакуловирус-специфическому фрагменту в векторе переноса (это обеспечивает гомологичную рекомбинацию гетерологического гена в бакуловирусный геном); соответствующие клетки-хозяева и ростовую среду. Материалы, методы и методики, используемые при конструировании векторов, трансфектировании клеток, сборе бляшек, выращивании клеток в культуре и т.п., хорошо известны специалистам в данной области и, кроме того, доступны руководства, описывающего указанные методики.

После встраивания гетерологического гена в вектор переноса указанный вектор и вирусный геном дикого типа трансфектируют в клетке-хозяине насекомого, где указанный вектор и вирусный геном рекомбинируют. Упакованный рекомбинантный вирус экспрессируется, и рекомбинантные бляшки идентифицируют и очищают. Материалы и методы создания экспрессионных систем бакуловирус/клетка насекомого коммерчески доступны в наборе, например, от Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Указанные методики обычно хорошо известны специалистам в данной области и полностью описаны в SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN № 1555 (1987), который включен в описание посредством ссылки; см. также RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING и POSCM., THE BACULOVIRUS SYSTEMS: A LABORATORY GUIDE (1992) и O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Действительно, продуцирование различных гетерологических белков с использованием экспрессионных систем бакуловирус/клетка насекомого хорошо известно специалистам в данной области; см., например, патенты США №№ 6368825; 6342216; 338846; 6261805; 6245528, 6225060; 6183987; 6168932; 6126944; 6096304; 6013433; 5965393; 5939285; 5891676; 5871986; 5861279; 5858,368; 5843733; 5762939; 5753220; 560827; 5583023; 5571709; 5516657; 5290686; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082, которые включены в описание посредством ссылки.

Векторы, которые можно использовать в экспрессионных системах бакуловирус/клетка насекомого, известны специалистам и включают, например, векторы экспрессии и переноса насекомых, полученные из бакуловируса *Autographa californica*, вируса ядерного полиэдрома (AcNPV), который является хелпер-независимым вектором вирусной экспрессии. Вирусные экспрессионные векторы, полученные из такой системы, обычно используют сильный промотор вирусного гена полиэдрина для управления экспрессией гетерологических генов; см. O'Reilly et al., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Прежде чем встраивать чужеродный ген в бакуловирусный геном, вышеописанные компоненты, включающие промотор, лидер (при желании), представляющую интерес кодирующую последовательность и последовательность окончания транскрипции, обычно собирают в промежуточную конструкцию перемещения (вектор переноса). Промежуточные конструкции перемещения часто сохраняют в репликоне, таком как дополнительный хромосомальный элемент (например, плазмиды), способный стабильно сохраняться в хозяине, таком как бактерия. Такой репликон имеет репликационную систему, что позволяет ему сохраняться в подходящем хозяине для клонирования и амплификации. Более конкретно, плазида может содержать сигнал полиаденилирования полиэдрина (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988), 42: 177) и прокариотный ген устойчивости к ампициллину (амп) и источник репликации для селекции и размножения в *E. coli*.

Одним обычно используемым вектором переноса для введения чужеродных генов в AcNPV является pAc373. Было сконструировано множество других векторов, хорошо известных специалистам в данной области, включая, например, pVL985, который изменяет стартовый кодон полиэдрина с ATG на ATT и который встраивает BamHI сайт клонирования 32 пар оснований в прямом направлении от ATT; см. Luckow and Summers, VIROLOGY, 170:31 (1989). Другие коммерчески доступные векторы включают, например, pBlueBac4.5N5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

После встраивания гетерологического гена вектор переноса и дикого типа бакуловирусный геном совместно трансфектируют в клетку-хозяина. Методы введения гетерологической ДНК в бакуловирусный вирус хорошо известны специалистам в данной области; см. SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN № 1555 (1987); Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983), 3:2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Например, встраивание можно осуществить в ген, такой как ген полиэдрина, с помощью двойной кроссовер рекомбинации; встраивание

можно также осуществить в сайт рестрикционного фермента, сконструированного в целевом бакуловирусном гене; см. Miller et al., *BIOESSAYS* (1989), 11(4): 91.

Трансфекцию можно осуществить, используя электропорацию; см. TROTTER and WOOD, 39 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1995); Mann и King, *J. GEN. VIROL.* (1989), 70: 3501. Альтернативно, липосомы можно использовать для трансфектирования клеток насекомых рекомбинантным вектором экспрессии и бакуловирусом; см., например, Liebman et al., *BIOTECHNIQUES* (1999), 26(1): 36; Graves et al., *BIOCHEMISTRY* (1998), 37:6050; Nomura et al., *J. BIOL. CHEM.* (1998), 273(22): 13570; Schmidt et al., *PROTEIN EXPRESSION and PURIFICATION* (1998), 12: 323; Siffert et al., *NATURE GENETICS* (1998), 18: 45; TILKINS ET AL., *CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK* 145-154 (1998); Cai et al., *PROTEIN EXPRESSION and PURIFICATION* (1997), 10: 263; Dolphin et al., *NATURE GENETICS* (1997), 17: 491; Kost et al., *Gene* (1997), 190: 139; Jakobsson et al., *J. BIOL. CHEM.* (1996), 271: 22203; Rowles et al., *J. BIOL. CHEM.* (1996), 271(37): 22376; Reverey et al., *J. BIOL. CHEM.* (1996), 271(39): 23607-10; Stanley et al., *J. BIOL. CHEM.* (1995), 270: 4121; Sisk et al., *J. VIROL.* (1994), 68(2): 766 и Peng et al., *BIOTECHNIQUES* (1993), 14(2): 274. Коммерчески доступные липосомы включают, например, Cellfectin® и Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Кроме того, можно использовать трансфекцию с использованием кальцийфосфата; см. TROTTER and WOOD, 39 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1995); Kitts, *NAR* (1990), 18(19): 5667 и Mann and King, *J. GEN. VIROL.* (1989), 70: 3501.

Бакуловирусные экспрессионные векторы обычно содержат бакуловирусный промотор. Бакуловирусный промотор представляет собой любую ДНК последовательность, способную связывать бакуловирусную РНК полимеразу и инициировать в прямом направлении (3') транскрипцию кодирующей последовательности (например, структурный ген) в мРНК. Промотор должен содержать участок инициирования транскрипции, который обычно расположен проксимально к 5'-концу кодирующей последовательности. Такой участок инициирования транскрипции обычно включает сайт связывания РНК полимеразы и сайт инициирования транскрипции. Бакуловирусный промотор может также содержать второй домен, называемый энхансером, который, если присутствует, обычно расположен вдали от структурного гена. Кроме того, экспрессия может быть как регулируемой, так и конститутивной.

Структурные гены, которые в большом количестве транскрибируются в последней части цикла инициирования, представляют собой особенно полезные промоторные последовательности. Примеры включают последовательности, полученные из гена, кодирующего вирусный белок полиедрона (FRIESEN ET AL., *The Regulation of Baculovirus gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES* (1986); EP 0127839 и 0155476) и гена, кодирующего p10 белок (Vlak et al., *J. GEN. VIROL.* (1988), 69: 765).

Вновь созданный бакуловирусный вектор экспрессии упаковывают в инфекционные рекомбинантные бакуловирусы и затем выращиваемые блишки можно очистить, используя методики, хорошо известные специалистам в данной области; см. Miller et al., *BIOESSAYS* (1989), 11(4): 91; SUMMERS and SMITH, *TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN*, No. 1555 (1987).

Рекомбинантные бакуловирусные экспрессионные векторы были созданы для инициирования различных клеток насекомых. Например, рекомбинантные бакуловирусы были созданы, наряду с другими, для *Aedes aegypti* (ATCC № CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC № CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC № 1963), *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*; см. Wright, *NATURE* (1986), 321:718; Carbonell et al., *J. VIROL.* (1985), 56:153; Smith et al., *MOL. CELL. BIOL.* (1983), 3:2156; см., в общем, Fraser et al., *IN VITRO CELL. DEV. BIOL.* (1989), 25:225. Более конкретно, клеточные линии, используемые для систем бакуловирусных векторов экспрессии, обычно включают, без ограничения, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC № CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*) и High-Five™ VTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*).

Клетки и культуральные среды коммерчески доступны как для прямой экспрессии, так и для экспрессии слияния гетерологичных полипептидов в системе бакуловирус/экспрессия, и технология клеточных культур обычно известна специалистам в данной области.

Виды *E. Coli*, *Pseudomonas* и другие прокариоты.

Методики бактериальной экспрессии известны специалистам в данной области. Широкий круг векторов доступен для использования в бактериальных хозяевах. Указанные векторы могут быть векторами одной копии или векторами небольшого количества или множества копий. Векторы могут служить для клонирования и/или экспрессии. Учитывая большое количество литературы, посвященной векторам, коммерческую доступность многих векторов, и даже руководств, описывающих векторы и их рестрикционные карты и характеристики, нет необходимости все это здесь подробно обсуждать. Как хорошо известно, указанные векторы обычно включают маркеры, обеспечивающие селекцию, причем эти маркеры могут обеспечивать устойчивость к цитотоксическому агенту, прототрофность или иммунитет. Часто присутствуют несколько маркеров, которые обеспечивают различные характеристики.

Бактериальный промотор представляет собой любую последовательность ДНК, способную связывать бактериальную РНК полимеразу и инициировать транскрипцию в прямом направлении (3') кодирующей последовательности (например, структурный ген) в мРНК. Промотор должен иметь участок инициирования транскрипции, который обычно расположен проксимально к 5'-концу кодирующей по-

следовательности. Такой участок иницирования транскрипции обычно включает сайт связывания РНК полимеразы и сайт иницирования транскрипции. Бактериальный промотор может также содержать второй домен, называемый оператором, который может перекрывать соседний сайт связывания РНК-полимеразы, который начинает синтез РНК. Такой оператор позволяет негативно регулировать (индуцируемо) транскрипцию, а ген репрессорного белка может связывать оператор и тем самым ингибировать транскрипцию специфического гена. Конститутивная экспрессия может происходить в отсутствие негативных регуляторных элементов, таких как оператор. Кроме того, позитивную регуляцию может обеспечивать последовательность, связывающая белок активирующего гена, который, если присутствует, обычно расположен проксимально (5') к последовательности, связывающей РНК-полимеразу. Примером белка, активирующего ген, является катаболитный активаторный белок (CAP), который помогает иницировать транскрипцию *lac* оперона в *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984), 18: 173]. Поэтому регулируемая экспрессия может быть или позитивной или негативной, тем самым или увеличивая, или уменьшая транскрипцию.

Последовательности, кодирующие метаболический путь ферментов, представляют собой особенно полезные промоторные последовательности. Примеры включают промоторные последовательности, полученные из метаболизирующих сахар ферментов, таких как галактоза, лактоза (*lac*) [Chang et al., NATURE (1977), 198: 1056] и мальтоза. Дополнительные примеры включают промоторные последовательности, полученные из биосинтетических ферментов, таких как триптофан (*trp*) [Goeddel et al., Nuc. ACIDS RES. (1980), 8: 4057; Yelverton et al., NUCL. ACIDS RES. (1981), 9: 731; патент США № 4738921; публикации EP №№ 036776 и 121775, которые включены в описание посредством ссылки]. Промоторная система  $\beta$ -галактозидазы (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], бактериофага лямбда PL [Shimatake et al., NATURE (1981), 292: 128] и T5 [патент США № 4689406, который включен в описание посредством ссылки], системы промоторов также предоставляют полезные промоторные последовательности. В предпочтительных способах настоящего изобретения используют сильные промоторы, такие как T7 промотор, чтобы индуцировать полипептиды bG-CSF на высоких уровнях. Примеры таких векторов хорошо известны специалистам в данной области и включают серии pET29 от Novagen и pPOP векторы, описанные в WO 99/05297, который включен в описание посредством ссылки. Такие экспрессионные системы могут продуцировать высокие уровни полипептидов bG-CSF в хозяевах, не поступаясь жизнеспособностью клетки-хозяина или параметрами роста. Другим известным специалистам вектором является pET19 (Novagen).

Кроме того, синтетические промоторы, которые не встречаются в природе, также функционируют как бактериальные промоторы. Например, последовательности, активирующие транскрипцию одного бактериального или бактериофагового промотора, можно соединить с последовательностью оперона другого бактериального или бактериофагового промотора, создавая синтетический гибридный промотор [патент США № 4551433, который включен в описание посредством ссылки]. Например, *tac* промотор представляет собой гибридный *trp-lac* промотор, включающий обе (*trp* промоторную и *lac* опероновую) последовательности, что регулируется *lac* репрессором [Amann et al., Gene (1983), 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983), 80:21]. Кроме того, бактериальный промотор может включать природные промоторы не бактериального происхождения, которые обладают способностью связывать бактериальную РНК полимеразу и инициатор транскрипции. Природные промоторы не бактериального происхождения можно также соединить РНК полимеразой для достижения высоких уровней экспрессии некоторых генов в прокариотах. Система РНК полимеразы T7 бактериофага/промотор представляет собой пример промоторной системы [Studier et al., J. MOL. BIOL. (1986), 189: 113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985), 82: 1074]. Кроме того, гибридный промотор также может состоять из бактериофагового промотора и *E. coli* операторного участка (публикация EP № 267851).

В дополнение к функционирующей промоторной последовательности эффективный сайт связывания рибосомы также можно использовать для экспрессии чужеродных генов в прокариотах. В *E. coli* сайт связывания рибосомы называют Shine-Dalgarno (SD) последовательностью, и он включает кодон иницирования (ATG) и последовательность из 3-9 нуклеотидов в длину, расположенную на 3-11 нуклеотидах в обратном направлении от кодона иницирования [Shine et al., NATURE (1975), 254: 34]. Считают, что SD последовательность промотирует связывание мРНК с рибосомой путем спаривания оснований между SD последовательностью и 3' и *E. coli* 16S рРНК [Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger РНК", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R.F. Goldberger, 1979)]. Для экспрессии эукариотных генов и прокариотных генов со слабыми сайтами связывания рибосомы [Sambrook et al. "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

Термины "бактериальный хозяин" или "бактериальная клетка-хозяин" относятся к бактериям, которые могут быть или были использованы в качестве реципиентов для рекомбинантных векторов или других трансферных ДНК. Термины включают потомство исходной бактериальной клетки-хозяина, которая была трансфектирована. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки совсем не обязательно будет полностью идентично в плане морфологии или в геноме или полном ДНК комплементе с исходной родительской клеткой из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомство родительской

клетки, которое достаточно близко к родительской клетке при характеристике по соответствующим свойствам, таким как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид bG-CSF, включены в потомство, рассматриваемое в таком определении.

Селекция подходящих бактерий-хозяев для экспрессии полипептидов bG-CSF известна специалистам в данной области. При выборе бактериальных хозяев для экспрессии подходящие хозяева могут включать такие, которые, как было показано, обладают, наряду с другими, хорошей способностью включаться в организм, низкой протеолитической активностью и общей устойчивостью. Бактериальные хозяева обычно доступны из различных источников, включая, без ограничения, the Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); и в American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA). При промышленной/фармацевтической ферментации обычно используют бактерии, полученные из K штаммов (например, W3110) или из бактерий, полученных из B штаммов (например, BL21). Указанные штаммы особенно удобны, так как параметры их роста хорошо изучены и устойчивы. Кроме того, указанные штаммы не патогенны, что коммерчески важно из соображений безопасности окружающей среды. Другие примеры подходящих *E. coli* хозяев включают, без ограничения, штаммы BL21, DH10B или их производные. В других вариантах указанных способов настоящего изобретения *E. coli* хозяин представляет собой протеазный минус штамм, включая, без ограничения, OMP- и LON-. Штамм клеток-хозяев может быть видом *Pseudomonas*, включая, без ограничения, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*. Известно, что *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, сконструированный штамм MB101, можно использовать для получения рекомбинантов и он доступен для процессов получения терапевтических белков. Примеры экспрессионной системы *Pseudomonas* включают систему, доступную от The Dow Chemical Company в виде штамма-хозяина (Midland, MI available on the World Wide Web at dow.com).

После того как штамм рекомбинантных клеток-хозяев установлен (т.е. экспрессионная конструкция была введена в клетку-хозяина и клетки-хозяева с соответствующей экспрессионной конструкцией выделены), штамм рекомбинантных клеток-хозяев культивируют в условиях, подходящих для продуцирования полипептидов bG-CSF. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, способ культивирования штамма рекомбинантных клеток-хозяев будет зависеть от природы используемой экспрессионной конструкции и индивидуальности клетки-хозяина. Штаммы рекомбинантных хозяев обычно культивируют, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области. Рекомбинантные клетки-хозяева обычно культивируют в жидкой среде, содержащей ассимилируемые источники углерода, азота и неорганических солей и, необязательно, содержащей витамины, аминокислоты, факторы роста и другие белковоподобные дополнения к культуральной среде, хорошо известные специалистам в данной области. Жидкая среда для культивирования клеток-хозяев может необязательно содержать антибиотики или противогрибковые агенты, чтобы предотвратить рост нежелательных микроорганизмов, и/или соединения, включая, без ограничения, антибиотики для отбора клеток-хозяев, содержащих вектор экспрессии.

Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать партиями или непрерывно, или собирая клетки (в случае, если полипептид bG-CSF накапливается внутриклеточно), или собирая надосадочную жидкость культуры или порциями либо непрерывно. Для производства в прокариотных клетках-хозяевах предпочтительно порционное культивирование и сбор клеток.

Полипептиды bG-CSF настоящего изобретения обычно очищают после экспрессии в рекомбинантных системах. Полипептид bG-CSF можно выделить из клетки-хозяина или культуральной среды различными способами, хорошо известными специалистам в данной области. В патенте США № 5849883 и WO 89/10932, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыто клонирование b-GCSF и их аналогов в клетках-хозяевах и методы выделения и очистки. Полипептиды bG-CSF, продуцированные в бактериальных клетках-хозяевах, могут быть плохо растворимыми или нерастворимыми (в виде телец включения). В одном варианте настоящего изобретения аминокислотные замещения можно легко осуществить в полипептиде bG-CSF, который выбирают с целью повышения растворимости рекомбинантного получаемого белка, используя раскрытые здесь способы так же, как и те, что известны специалистам. В случае нерастворимого белка белок можно собирать из лизатов клеток-хозяев центрифугированием и возможно затем используя гомогенизацию клеток. В случае плохо растворимого белка соединения, включая, без ограничения, полиэтиленмин (PEI) можно добавлять для того, чтобы вызвать осаждение частично растворимого белка. Выпавший в осадок белок можно затем обычным образом собрать центрифугированием. Рекомбинантные клетки-хозяева можно разрушить или гомогенизировать для выделения нерастворимых телец из внутренностей клеток, используя различные методы, известные специалистам в данной области. Разрушение клеток или гомогенизацию можно осуществить, используя хорошо известные методики, включая, без ограничения, ферментативное разрушение клеток, обработку ультразвуком, в гомогенизаторе Даунса или осуществление разрушения высоким давлением. В одном варианте соединения настоящего изобретения используют методику высокого давления для разрушения *E. coli* клеток-хозяев для высвобождения телец включения полипептидов bG-CSF. При манипулировании с полипептидом bG-CSF может оказаться выгодным минимизировать время гомогенизации при повторениях, чтобы добиться максимального выхода телец включения без потерь, связанных с

такими факторами, как солюбилизация, механический сдвиг или протеолиз.

Нерастворимые или выпавшие в осадок полипептиды bG-CSF можно затем солюбилизировать, используя любой из ряда подходящих агентов для солюбилизации, известных специалистам в данной области. Полипептид bG-CSF можно солюбилизировать, используя мочевины или гуанидингидрохлорид. Объем солюбилизированного полипептида bG-CSF следует минимизировать с тем, чтобы можно было получать крупные партии, используя обычные размеры партий, которые удобны в обращении. Указанный фактор может оказаться значительным при крупномасштабном коммерческом производстве, где рекомбинантные хозяева можно выращивать партиями объемом в тысячи литров. Кроме того, при производстве полипептида bG-CSF в промышленном крупном масштабе, особенно для использования в фармацевтических препаратах для людей, если это возможно, следует избегать агрессивных химикатов, которые могут повредить механизмы и контейнеры, или сам белковый продукт. В способе настоящего изобретения было показано, что более мягкий денатурирующий агент мочевины можно использовать для солюбилизации телец включения полипептида bG-CSF вместо более агрессивного денатурирующего агента гуанидингидрохлорида. Использование мочевины значительно увеличивает риск повреждения оборудования из нержавеющей стали в процессе получения и очистки полипептида bG-CSF, хотя эффективно солюбилизирова тельца включения полипептида bG-CSF.

В случае растворимого bG-CSF белка bG-CSF могут секретироваться в периплазмическое пространство или в культуральную среду. Кроме того, растворимые bG-CSF могут присутствовать в цитоплазме клетки-хозяина. Может оказаться желательным концентрировать растворимые bG-CSF перед проведением стадий очистки. Для концентрирования растворимых bG-CSF, например, из клеточных лизатов или культуральной среды можно использовать стандартные методики, хорошо известные специалистам в данной области. Кроме того, стандартные методики, хорошо известные специалистам в данной области, можно использовать для разрушения клетки-хозяина и выделения растворимых bG-CSF из цитоплазмы или периплазмического пространства клеток-хозяев.

Если полипептид bG-CSF получают как белок слияния, последовательность слияния можно удалить. Удаление последовательности слияния можно осуществить ферментативно или используя химическое расщепление. Ферментативное удаление последовательностей слияния можно осуществить, используя методы, известные специалистам в данной области. Выбор фермента для удаления последовательности слияния можно определить, идентифицируя слияние, и условия реакции будут определяться выбором фермента, как должно быть понятно специалистам в данной области. Химическое расщепление можно осуществить, используя реагенты, хорошо известные специалистам в данной области, включая, без ограничения, цианогенбромид, TEV протеазу и другие реагенты. Расщепленный полипептид bG-CSF можно очистить от расщепленной последовательности слияния методами, известными специалистам в данной области. Такие методы будут определяться в зависимости от идентичности и свойств последовательности слияния и полипептида bG-CSF, как должно быть очевидно специалистам в данной области. Способы очистки могут включать, без ограничения, хроматографию с исключением по размерам, хроматографию гидрофобных взаимодействий, ионообменную хроматографию или диализ или любые их комбинации.

Полипептид bG-CSF можно также очистить для удаления ДНК из белкового раствора. ДНК можно удалить любым подходящим способом, известным специалистам, таким как осаждение или ионообменная хроматография, но можно удалить, используя осаждение агентом, осаждающим нуклеиновую кислоту, таким как, без ограничения, протаминсульфат. Полипептид bG-CSF можно отделить от осажденной ДНК, используя стандартные, хорошо известные способы, включая, без ограничения, центрифугирование или фильтрацию. Удаление молекулы нуклеиновой кислоты хозяина является важным фактором в определении того, где должен использоваться полипептид bG-CSF, для лечения животных или людей, и способы настоящего изобретения уменьшают содержание ДНК клеток-хозяев до фармацевтически приемлемых уровней.

Методы ферментации в лабораторном масштабе или в промышленном масштабе можно также использовать при экспрессии белка, включая, без ограничения, ферментеры, встряхиваемые флаконы, биореакторы с псевдооживленным слоем, полые волоконные биореакторы, системы культур в роллерных флаконах и системы перемешиваемых биореакторов танкового типа. Каждый из указанных методов можно осуществить в периодическом процессе, в культуре с подпиткой или в непрерывном процессе.

Полипептиды bG-CSF настоящего изобретения обычно можно выделить, используя стандартные методы в данной области. Например, культуральную среду или клеточный лизат можно центрифугировать или фильтровать для удаления клеточного дебриса. Надосадочную жидкость можно сконцентрировать или разбавить до нужного объема или подвергнуть диафильтрации в подходящий буфер до состояния препарата для дальнейшей очистки. Дальнейшая очистка полипептида bG-CSF настоящего изобретения включает отделение деамидированных и усеченных форм варианта полипептида bG-CSF от интактной формы.

Любую из следующих примерных процедур можно использовать для очистки полипептидов bG-CSF настоящего изобретения: аффинную хроматографию; анионо- или катионообменную хроматографию (используя, без ограничения, DEAE SEPHAROSE); хроматографию на силикагеле; высокоэффек-

тивную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ); ВЭЖХ с обращенной фазой; гель-фильтрацию (используя, включая, без ограничения, SEPHADEX G-75); хроматографию гидрофобных взаимодействий; хроматографию с исключением по размерам; металл-хелатную хроматографию; ультрафильтрацию/диафильтрацию; осаждение этанолом; осаждение сульфатом аммония; хроматофокусирование; хроматографию замещения; электрофоретические процедуры (включая, без ограничения, препаративное изоэлектрическое фокусирование), дифференциальную растворимость (включая, без ограничения, осаждение сульфатом аммония), SDS-PAGE или экстракцию.

Белки настоящего изобретения, включая, без ограничения, белки, включающие неприродные аминокислоты, пептиды, включающие неприродные аминокислоты, антитела к белкам, включающим неприродные аминокислоты, связывающие партнеры для белков, включающих неприродные аминокислоты и т.д., можно очистить или частично, или практически до гомогенности в соответствии со стандартными процедурами, хорошо известными специалистам в данной области. Соответственно полипептиды настоящего изобретения можно выделить и очистить любым из ряда способов, известных специалистам, включая, без ограничения, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой или основанием, с помощью колоночной хроматографии, аффинной хроматографии, анионо- или катионообменной хроматографии, хроматографии на фосфоцеллюлозе, хроматографии гидрофобных взаимодействий, хроматографии на гидроксилатаптите, хроматографии на лектине, гелеэлектрофореза и т.п. Стадии рефолдинга белка можно использовать при желании для получения правильно сложенных зрелых белков. Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), аффинную хроматографию или другие подходящие методы можно использовать на стадиях окончательной очистки, когда необходима высокая степень чистоты. В одном варианте антитела, полученные против неприродных аминокислот (или белков или пептидов, включающих неприродные аминокислоты), используют в качестве очищающих реагентов, включая, без ограничения, для очистки на основе аффинности белков или пептидов, включающих одну или более из неприродных аминокислот. После очистки частично или до гомогенности при желании полипептиды необязательно используют в широком круге применений, включая, без ограничения, в качестве аналитических компонентов, терапевтических агентов, профилактических агентов, диагностических агентов, реагентов для исследований и/или в качестве иммуногенов для получения антител. Антитела, созданные против полипептидов настоящего изобретения, можно получить, вводя полипептиды или эпителиосодержащие фрагменты или клетки животному, предпочтительно животному, не являющемуся человеком, используя рутинные протоколы. Любой специалист в данной области может создать антитела, используя различные известные методики. Кроме того, трансгенных мышей или другие организмы, включая других млекопитающих, можно использовать для экспрессии гуманизированных антител. Вышеописанные антитела можно использовать для выделения или для идентификации клонов, экспрессирующих полипептид или для очистки полипептидов. Антитела против полипептидов настоящего изобретения можно также использовать для лечения заболеваний.

Полипептиды и полинуклеотиды настоящего изобретения можно также использовать в качестве вакцин. Соответственно в следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу выработки иммунологической реакции у млекопитающего, который включает инокулирование млекопитающего полипептидом настоящего изобретения, адекватным для выработки антител и/или иммунной реакции Т-клеток, включая, например, цитокин-продуцирующие Т-клетки или цитотоксические Т-клетки, для защиты указанного животного от заболевания, независимо от того, проявилось ли уже это заболевание у индивидуума, или нет. Иммунологическую реакцию у млекопитающего можно также вызвать способом, который включает доставку полипептида настоящего изобретения с помощью вектора, управляющего экспрессией полинуклеотида и кодирующего полипептид *in vivo*, для индуцирования такой иммунологической реакции, чтобы вызвать продуцирование антител для защиты указанного животного от заболеваний, указанных в настоящем изобретении. Одним из способов введения указанного вектора является направление его в нужные клетки в виде покрытия на частицах или другим способом. Такие векторы нуклеиновых кислот могут включать ДНК, РНК, модифицированные нуклеиновые кислоты или ДНК/РНК гибриды. Для использования в качестве вакцины полипептидный вектор или вектор нуклеиновой кислоты приготавливают в виде лекарственной формы вакцины (композиции). Лекарственная форма может включать далее подходящий носитель. Так как полипептид может быть разрушен в желудке, его можно вводить парентерально (например, с помощью подкожной, внутримышечной, внутривенной или внутрикожной инъекции). Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферные агенты, бактериостаты и солюты, которые придают лекарственной форме изотоничность в отношении крови реципиента; водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты или загущающие агенты. Лекарственная форма вакцин может также включать системы адьювантов для повышения иммуногенности лекарственной формы, как хорошо известно специалистам в данной области. Дозировка будет зависеть от специфической активности вакцины, и ее можно легко определить в рутинных экспериментах.

В дополнение к другим перечисленным здесь ссылкам специалистам в данной области известны разнообразные другие методы очистки/укладки белка, включая, без ограничения, те, что перечислены в



R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology, Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins. Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris и Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris и Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson и Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ и цитированные в них ссылки.

Одно из преимуществ получения представляющих интерес белков или полипептидов с неприродными аминокислотами в эукариотных клетках-хозяевах или в не эукариотных клетках-хозяевах состоит в том, что обычно белки или полипептиды будут упаковываться в свои естественные конформации. Однако в некоторых вариантах настоящего изобретения специалистам должно быть понятно, что после синтеза, экспрессии и/или очистки белки или пептиды могут обладать конформацией, которая отличается от желательных конформаций соответствующих полипептидов. В одном аспекте настоящего изобретения экспрессированный белок или полипептид необязательно денатурируют и затем ренатурируют. Это осуществляют, используя методы, известные специалистам, включая, без ограничения, добавление шаперонина к представляющим интерес белку или полипептиду, солюбилизацию белков в разбавляющем агенте, таком как гуанидин HCl, использование протеиндисульфидизомеразы и т.д.

Вообще, иногда бывает желательно денатурировать и восстановить экспрессированные полипептиды и затем вызвать процесс сворачивания полипептидов в предпочтительной конформации. Например, гуанидин, мочевины, DTT, DTE и/или шаперонин можно добавлять к представляющему интерес продукту трансляции. Методы восстановления, денатурирования и ренатурирования белков хорошо известны специалистам в данной области (см. приведенные выше ссылки Debinski, et al. (1993), J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993), Bioconjug. Chem., 4: 581-585 и Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski, et al., например, описывает денатурирование и восстановление белка в тельцах включения в гуанидин-DTE. Такие белки могут быть заново упакованы в окислительно-восстановительном буфере, содержащем, включая, без ограничения, окисленный глутатион и L-аргинин. Реагенты рефолдинга в потоке или каким-либо другим образом вступают в контакт с одним или более из полипептидов или других продуктов экспрессии, или наоборот.

В случае прокариотного продуцирования полипептида bG-CSF полученный таким образом полипептид bG-CSF может быть неправильно упакован и таким образом может утратить биологическую активность или может обладать слабой биологической активностью. Биоактивность белка можно восстановить, используя "рефолдинг". Обычно неправильно свернутый полипептид bG-CSF подвергают рефолдингу путем солюбилизации (когда полипептид bG-CSF также нерастворим), разворачиванию и восстановлению полипептидной цепи, используя, например, один или более из разбавляющих агентов (например, мочевины и/или гуанидин) и восстанавливающий агент, способный восстановить дисульфидные связи (например, дитиотреитол, DTT или 2-меркаптоэтанол, 2-ME). При умеренных концентрациях разбавляющего агента затем добавляют окисляющие агенты (например, кислород, цистин или цистамин), которые позволяют реформировать дисульфидные связи. Можно заново упаковать полипептид bG-CSF, используя стандартные известные специалистам методы, такие как раскрыты в патентах США №№ 4511502, 4511503 и 4512 922, которые включены в описание посредством ссылки. Полипептид bG-CSF можно также упаковать вместе с другими белками с образованием гетеродимеров или гетеромультимеров.

После рефолдинга bG-CSF можно дополнительно очистить. Очистку bG-CSF можно осуществить, используя различные методики, известные специалистам в данной области, включая хроматографию гидрофобных взаимодействий, хроматографию с исключением по размерам, ионообменную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой, аффинную хроматографию и т.п. или любую их комбинацию. Дополнительная очистка может также включать стадию сушки или осаждения очищенного белка.

После очистки bG-CSF можно обменять в различных буферах и/или сконцентрировать любым из различных способов, известных специалистам в данной области, включая, без ограничения, диализ, ультрафильтрацию и диализ. G-CSF, который представлен в виде отдельного очищенного белка, можно подвергнуть агрегации и осаждению.

Очищенный bG-CSF может иметь степень чистоты по меньшей мере 90% (по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, RP-HPLC, или электрофореза в натрийдодецилсульфат-полиакриламидном геле, SDS-PAGE), или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% либо больше. Независимо от точного численного значения степени чистоты bG-CSF, bG-CSF является достаточно чистым для использования в качестве фармацевтического продукта или для последующего процессинга, такого как конъюгирование с водорастворимым полимером, таким как ПЭГ.

Некоторые молекулы bG-CSF можно использовать в качестве терапевтических агентов в отсутствие

других активных ингредиентов или белков (других нежели эксципиенты, носители, стабилизаторы, сывороточный альбумин и т.п.) или они могут образовать комплексы с другими белками или полимерами.

Общие методы очистки.

Любую из различных стадий выделения можно осуществить, используя клеточный лизат, экстракт, культуральную среду, тельца включения, периплазмическое пространство клетки-хозяина, цитоплазму клетки-хозяина или другой материал, включающий полипептид bG-CSF или любые полипептидные bG-CSF смеси, полученные на любой стадии выделения, включая, без ограничения, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, гель-фильтрационную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию ("ВЭЖХ", HPLC), ВЭЖХ с обращенной фазой ("RP-HPLC"), адсорбцию на слой вспученного реагента или любую их комбинацию и/или их повторение в любом подходящем порядке.

Оборудование и другие необходимые материалы, используемые при осуществлении раскрытых выше методов, коммерчески доступны. Насосы, коллекторы фракций, мониторы, записывающие устройства и целые системы доступны, например, от Applied Biosystems (Foster City, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) и Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ). Хроматографические материалы, включая, без ограничения, материалы обменных матриц, среды и буферы также доступны от указанных компаний.

Уравновешивание и другие стадии в процессе колоночной хроматографии, раскрытые здесь, такие как промывка и элюирование можно осуществлять более быстро, используя специализированное оборудование, такое как насос. Коммерчески доступные насосы включают, без ограничения, HILOAD® Pump P-50, Peristaltic Pump P-1, Pump P-901 и Pump P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Примеры коллекторов фракций включают RediFrac Fraction Collector, FRAC-100 и FRAC-200 Fraction Collectors, SUPERFRAC® Fraction Collector (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Доступны также смеси для создания нужной величины pH и линейных градиентов концентраций. Коммерчески доступные смеси включают Gradient Mixer GM-1 и In-Line Mixers (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Хроматографический процесс можно контролировать, используя любой коммерчески доступный монитор. Такие мониторы можно использовать для сбора информации, такой как УФ, pH и проводимость. Примеры детекторов включают Monitor UV-I, UVICORD® S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 и Conductivity Monitor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Кроме того, коммерчески доступны целые системы, включая различные АКТА® системы от Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

В одном варианте настоящего изобретения, например, полипептид bG-CSF можно восстановить и денатурировать, вначале денатурируя полученный очищенный полипептид bG-CSF в мочеvine, с последующим разбавлением в TRIS буфере, содержащем восстанавливающий агент (такой как DTT) при подходящих значениях pH. В других вариантах полипептид bG-CSF денатурируют в мочеvine в интервале концентраций от около 2 до около 9 М, с последующим разбавлением TRIS буфером при pH в интервале от около 5,0 до около 8,0. Затем рефолдинговую смесь указанного варианта можно инкубировать. В одном варианте рефолдинговую смесь инкубируют при комнатной температуре в течение от 4 до 24 ч. Восстановленную и денатурированную полипептидную bG-CSF смесь можно затем далее выделить или очистить.

Как здесь указано, pH первой полипептидной bG-CSF смеси можно установить до осуществления любой из последующих стадий выделения. Кроме того, первую полипептидную bG-CSF смесь или любую последующую смесь поэтому можно концентрировать, используя методики, известные специалистам. Кроме того, элюирующий буфер, включающий первую полипептидную bG-CSF смесь или любую последующую смесь, поэтому можно заменить на буфер, подходящий для следующей стадии выделения, используя методики, хорошо известные специалистам в данной области.

Ионообменная хроматография.

В одном варианте, и как необязательном, дополнительную стадию ионообменной хроматографии можно осуществить для первой полипептидной bG-CSF смеси; см. в общем ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES and METHODS (Cat. № 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Коммерчески доступные ионообменные колонки включают HITRAP®, HIPREP® и HILOAD® колонки (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). В таких колонках используют сильные анионообменные смолы, такие как Q SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance и Q SEPHAROSE® XL; сильные катионообменные смолы, такие как SP SEPHAROSE® High Performance, SP SEPHAROSE® Fast Flow и SP SEPHAROSE® XL; слабые анионообменные смолы, такие как DEAE SEPHAROSE® Fast Flow; и слабые катионообменные смолы, такие как см. SEPHAROSE® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Обработку с помощью анионо- или катионообменной колоночной хроматографии можно осуществить для полипептида bG-CSF на любой стадии процесса очистки для выделения практически очищенного полипептида bG-CSF. Стадию катионообменной хроматографии можно осуществить, используя любую подходящую катионообменную матрицу.

Катионообменные матрицы, которые можно использовать, включают, без ограничения, волокни-

стые, пористые, непористые, микрогранулированные, в виде шариков или сшитые катионообменные материалы матриц. Такие катионообменные материалы матриц включают, без ограничения, целлюлозу, агарозу, декстран, полиакрилат, поливинил, полистирол, двуокись кремния, полиэфир или композиты любого из перечисленных.

Катионообменной матрицей может быть любой катионообменный агент, включая сильные и слабые катионообменные агенты. Сильные катионообменные агенты могут оставаться ионизированными в широком интервале значений pH и поэтому способны связывать bG-CSF в широком интервале значений pH. Слабые катионообменные агенты могут терять ионизацию как функцию pH. Например, слабый катионообменный агент может терять заряд, когда pH снижается ниже, чем около pH 4 или 5. Подходящие сильные катионообменные агенты включают, без ограничения, заряженные функциональные группы, такие как сульфопропил (SP), метилсульфонат (S) или сульфэтил (SE). Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником предпочтительно со связыванием bG-CSF в интервале pH от около 2,5 до около 6,0. Альтернативно, сильный катионообменник может быть со связыванием bG-CSF в интервале pH от около 2,5 до около pH 5,5. Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником со связыванием bG-CSF при значениях pH около 3,0. Альтернативно, катионообменная матрица может быть сильным катионообменником предпочтительно со связыванием bG-CSF при значениях pH в интервале от около 6,0 до около 8,0. Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником предпочтительно со связыванием bG-CSF при значениях pH в интервале от около 8,0 до около 12,5. Альтернативно, сильный катионообменный агент может связывать bG-CSF при значениях pH в интервале от около 8,0 до около 12,0.

Перед загрузкой bG-CSF катионообменную матрицу можно уравновесить, например, используя несколько объемов колонки разбавленной слабой кислотой, например четыре объема колонки 20 mM уксусной кислоты, pH 3. После уравновешивания можно ввести bG-CSF и колонку промыть от одного до нескольких раз перед элюированием практически чистого bG-CSF, также используя слабый кислотный раствор, такой как слабый раствор уксусной кислоты или слабый раствор фосфорной кислоты. Например, приблизительно 2-4 об. колонки 20 mM уксусной кислоты, pH 3, можно использовать для промывки колонки. Можно также использовать дополнительные промывки, используя, например, 2-4 об. колонки 0,05 M ацетата натрия, pH 5,5 или 0,05 M ацетата натрия в смеси с 0,1 M хлорида натрия, pH 5,5. Альтернативно, используя методы, известные специалистам, можно уравновесить катионообменную матрицу, используя несколько объемов колонки разбавленного слабого основания.

Альтернативно, практически чистый bG-CSF можно элюировать, используя контактирование катионообменной матрицы с буфером, обладающим достаточно низким значением pH или ионной силой, чтобы вытеснить bG-CSF из матрицы. Величина pH буфера для элюирования может меняться в интервале значений от около pH 2,5 до около 6,0. Более конкретно, величина pH буфера для элюирования может меняться в интервале значений от около pH 2,5 до около 5,5, от около pH 2,5 до около 5,0. Буфер для элюирования может иметь значение pH около 3,0. Кроме того, количество буфера для элюирования может меняться в широких пределах и обычно бывает в интервале от около 2 до около 10 об. колонки.

После адсорбирования полипептида bG-CSF на катионообменной матрице практически очищенный полипептид bG-CSF можно элюировать, осуществляя контактирование матрицы с буфером, имеющим достаточно высокое значение pH или ионную силу, чтобы вытеснить полипептид bG-CSF из матрицы. Подходящие буферы для использования при высокоэффективном элюировании практически чистого полипептида bG-CSF могут включать, без ограничения, цитратный, фосфатный, формиатный, ацетатный, HEPES и MES буферы в интервале концентраций по меньшей мере от около 5 до по меньшей мере около 100 mM.

Хроматография с обращенной фазой.

ОФ-ВЭЖХ можно осуществить для очистки белков, следуя подходящим протоколам, которые хорошо известны специалистам в данной области; см., например, Pearson et al., ANAL BIOCHEM. (1982), 124: 217-230 (1982); Rivier et al., J. CHROM. (1983), 268: 112-119; Kunitani et al., J. CHROM. (1986), 359: 391-402. ОФ-ВЭЖХ можно осуществить для полипептида bG-CSF для выделения практически чистого полипептида bG-CSF. В таком случае используют двуокись кремния, модифицированную смолами с алкильными функциональностями с большим разнообразием длин цепей, включая, без ограничения, смолы по меньшей мере от около C<sub>3</sub> до по меньшей мере около C<sub>30</sub>, от по меньшей мере около C<sub>3</sub> до по меньшей мере около C<sub>20</sub> или по меньшей мере от около C<sub>3</sub> до по меньшей мере около C<sub>18</sub>. Альтернативно, можно использовать полимерную смолу. Например, можно использовать смолу TosoHaas Amberchrome CG1000sd, которая представляет собой смолу полистирола. Можно также использовать цианосмолы или полимерные смолы с большим разнообразием длин алкильных цепей. Кроме того, ОФ-ВЭЖХ колонку можно промыть растворителем, таким как этанол. Колонка Source RP является другим примером ОФ-ВЭЖХ колонок.

Подходящие буферы для элюирования, содержащие агент для образования пары ионов, и органический модификатор, такой как метанол, изопропанол, тетрагидрофуран, ацетонитрил или этанол, можно использовать для элюирования полипептида bG-CSF из ОФ-ВЭЖХ колонки. Наиболее часто используемые образующие ионные пары агенты включают, без ограничения, уксусную кислоту, муравьиную ки-

слоту, перхлоркислоту, фосфорную кислоту, трифторуксусную кислоту, гептафтормасляную кислоту, триэтиламин, тетраметиламмоний, тетрабутиламмоний и ацетат триэтиламония. Элюирование можно осуществить, используя один или более из градиентов или изократических условий, причем условия градиента должны предпочтительно быть такими, чтобы уменьшить время разделения и снизить ширину пиков. Другой способ включает использование двух градиентов с различными интервалами концентраций растворителя. Примеры подходящих для элюирования буферов для использования в настоящем изобретении могут включать, без ограничения, растворы ацетата аммония и ацетонитрила.

Методы очистки с использованием хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC) можно применить для полипептида bG-CSF; см. HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES and METHODS (Cat. № 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), которая включена в описание посредством ссылки. Подходящие HIC матрицы могут включать, без ограничения, алкил- или арилзамещенные матрицы, такие как бутил-, гексил-, октил- или фенилзамещенные матрицы, включая агарозу, сшитую агарозу, сефарозу, целлюлозу, двуокись кремния, декстран, полистирол, матрицы поли(метакрилата) и смолы смешанного типа, включая, без ограничения, смолу полиэтиленамина или матрицу бутил- или фенилзамещенного поли(метакрилата). Коммерчески доступные источники для колонок для хроматографии гидрофобных взаимодействий включают, без ограничения, HITRAP®, HIPREP® и HILOAD® колонки (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Короче, перед введением HIC колонку можно уравновесить, используя стандартные буферы, известные специалистам в данной области, такие как раствор уксусная кислота/натрийхлорид или HEPES, содержащий сульфат аммония. Сульфат аммония можно использовать в качестве буфера для загрузки HIC колонки. После введения полипептида bG-CSF колонку можно промыть, используя стандартные буферы и условия для удаления нежелательных материалов, но оставляя полипептид bG-CSF в HIC колонке. Полипептид bG-CSF можно элюировать, используя от около 3 до около 10 об. колонки стандартного буфера, такого как HEPES буфер, содержащий EDTA и более низкую концентрацию сульфата аммония, чем его концентрация в уравнивающем буфере, или буфера уксусная кислота/натрийхлорид, наряду с другими. Можно также использовать градиент линейного уменьшения соли, используя, например, градиент фосфата калия, для элюирования молекул bG-CSF. Затем элюент можно сконцентрировать, например, фильтрацией, такой как диафильтрация или ультрафильтрация. Диафильтрацию можно использовать для удаления соли, использованной для элюирования полипептида bG-CSF.

Другие способы очистки.

Еще другие стадии выделения, используя, например, гель-фильтрацию (GEL FILTRATION: PRINCIPLES and METHODS (Cat. № 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), который включен в описание посредством ссылки, хроматографию на гидроксипатите (подходящие матрицы включают, без ограничения, HA-Ultrogel, High Resolution (Calbiochem), СHT Ceramic Hydroxyapatite (BioRad), Bio-Gel НТР Hydroxyapatite (BioRad)), ВЭЖХ, адсорбцию на вспученном слое, ультрафильтрацию, диафильтрацию, лиофилизацию и т.п., можно осуществить для первой полипептидной bG-CSF смеси или любой последующей его смеси, для удаления любой избыточной соли для замены буфера подходящим буфером для следующей стадии выделения или даже для получения целевого продукта лекарственного средства.

Выход полипептида bG-CSF, включая практически очищенный полипептид bG-CSF, можно контролировать на каждой раскрытой здесь стадии, используя методики, известные специалистам в данной области. Такие методики можно также использовать для оценки выхода практически очищенного полипептида bG-CSF после последней стадии выделения. Например, выход полипептида bG-CSF можно контролировать, используя любую из нескольких колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, такую как циано ОФ-ВЭЖХ, C<sub>18</sub> ОФ-ВЭЖХ; также как катионообменную ВЭЖХ и гель-фильтрационную ВЭЖХ.

В конкретных вариантах настоящего изобретения выход bG-CSF после каждой стадии очистки может составлять по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 91, по меньшей мере около 92, по меньшей мере около 93, по меньшей мере около 94, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 96, по меньшей мере около 97, по меньшей мере около 98, по меньшей мере около 99, по меньшей мере около 99,9 или по меньшей мере около 99,99% bG-CSF в исходном материале для каждой стадии очистки.

Степень чистоты можно определить, используя стандартные методики, такие как SDS-PAGE, или измеряя полипептид bG-CSF, используя вестерн-блоттинг и ELISA анализы. Например, можно создать поликлональные антитела против белков, выделенных из негативной контрольной дрожжевой ферментации и катионообменного выделения. Полученные антитела можно также использовать для зондирования в отношении присутствия белков, загрязняющих клетки-хозяева.

ОФ-ВЭЖХ материал Vydac C4 (Vydac) состоит из частиц силикагеля, на поверхностях которых расположены C4-алкильные цепи. Выделение полипептида bG-CSF из белковых примесей основано на

различиях в прочности гидрофобных взаимодействий. Элюирование осуществляют, используя градиент ацетонитрила в разбавленной трифторуксусной кислоте. Препаративную ВЭЖХ осуществляют, используя колонку из нержавеющей стали (заполненную 2,8-3,2 л Vydac C4 силикагеля). Элюат из колонки с гидроксипатитным ультрагелем (Hydroхуаратите Ultrogel) подкисляют, добавляя трифторуксусную кислоту, и загружают в Vydac C4 колонку. Для промывки и элюирования используют градиент ацетонитрила в разбавленной трифторуксусной кислоте. Фракции собирают и немедленно нейтрализуют фосфатным буфером. Фракции полипептида bG-CSF, которые находятся в пределах ИРС, объединяют.

Материал DEAE Sepharose (Pharmacia) состоит из групп диэтиламиноэтила (DEAE), которые ковалентно связаны с поверхностью шариков сефарозы. Связывание полипептида bG-CSF с DEAE группами происходит за счет ионных взаимодействий. Ацетонитрил и трифторуксусная кислота проходят через колонку без задержки. После того как указанные вещества были вымыты, следовые примеси удаляют, промывая колонку ацетатным буфером с низким значением pH. Затем колонку промывают нейтральным фосфатным буфером и полипептид bG-CSF элюируется вместе с буфером с повышенной ионной силой. Колонку заполняют сорбентом DEAE сефароза fast flow. Объем колонки выбирают таким, чтобы обеспечить загрузку полипептида bG-CSF в интервале 3-10 мг полипептида bG-CSF/мл геля. Колонку промывают водой и уравнивают буфером (натрий/калийфосфат). Вводят объединенные фракции элюата после ВЭЖХ и колонку промывают уравнивающим буфером. Затем колонку промывают промывочным буфером (натрийацетатный буфер), затем промывают уравнивающим буфером. Затем полипептид bG-CSF элюируют из колонки элюирующим буфером (натрий хлорид, натрий/калий фосфат) и его собирают отдельными фракциями в соответствии с параметрами мастера элюирования. Элюат из колонки с DEAE сефарозой доводят до установленного значения проводимости. Полученное лекарственное вещество фильтруют в стерильных условиях в тефлоновые контейнеры и хранят при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Дополнительные методы, которые можно использовать, включают, без ограничения, стадии для удаления эндотоксинов. Эндотоксины представляют собой липополисахариды (LPS), которые расположены на внешней мембране грам-отрицательных клеток-хозяев, таких как, например, *Escherichia coli*. Методы снижения уровней эндотоксина хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения, методики очистки с использованием подложки двуокиси кремния, стеклянного порошка или гидроксипатита, хроматографию с обращенной фазой, аффинную хроматографию, хроматографию с исключением по размерам, анионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, комбинации указанных методов и т.п. Могут потребоваться модификации или дополнительные методы для удаления из представляющего интерес полипептида примесей, таких как совместно мигрирующие белки. Методы измерения уровней эндотоксина хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения, анализы *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*. *Endosafe™-PTS* анализ является колориметрическим и включает систему с одной трубкой, в которой используют картриджи, предварительно заполненные LAL реагентом, хромогенный субстрат и контрольный стандартный эндотоксин вместе с ручным спектрофотометром. Альтернативные методы включают, без ограничения, кинетический LAL метод, который является турбодиметрическим и его используют в формате 96-луночного планшета.

Широкий круг методов и процедур можно использовать для оценки выхода и степени чистоты bG-CSF белка, включающего одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, включая, без ограничения, анализ Брэдфорда, SDS-PAGE, SDS-PAGE с окрашиванием серебром, SDS-PAGE с окрашиванием кумасси бриллиантовым голубым, масс-спектрометрию (включая, без ограничения, MALDI-TOF) и другие методы характеристики белков, хорошо известные специалистам в данной области.

Дополнительные методы включают, без ограничения, SDS-PAGE, совмещенный с методами окрашивания белка, иммуноблоттинг, матричную лазерную десорбционно/ионизационную масс-спектрометрию (MALDI-MS), жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию, изоэлектрическое фокусирование, аналитический анионообмен, хроматофокусирование и круговой дихроизм.

#### VIII. Экспрессия в альтернативных системах.

Было использовано несколько подходов для введения неприродных аминокислот в белки в нереккомбинантных клетках-хозяевах, мутагенезированных клетках-хозяевах или в несодержащих клеток системах. Такие системы также пригодны для использования при получении полипептидов bG-CSF настоящего изобретения. Получение производных аминокислот с реакционноспособными боковыми цепями, такими как Lys, Cys и Tug, приводит к превращению лизина в  $\text{N}^2$ -ацетил-лизин. Химический синтез также предлагает метод прямого включения неприродных аминокислот. Учитывая последние достижения в области ферментативного лигирования и нативного химического лигирования пептидных фрагментов, становится возможным получать более крупные белки; см., например, P.E. Dawson и S.B.H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 923 (2000). Химическое лигирование пептидов и нативное химическое лигирование раскрыты в патенте США № 6184344, в патентной публикации США № 2004/0138412, в патентных публикациях США № 2003/0208046, WO 02/098902 и WO 03/042235, которые включены в описание посредством ссылки. Общий *in vitro* биосинтетический способ, в котором супрессорную тРНК, химически ацилированную неприродной аминокислотой, добавляют к *in vitro* экстракту, способному поддерживать

биосинтез белка, использовали для сайт-специфического встраивания более 100 не природных аминокислот в различные белки практически любого размера; см., например, V.W. Cornish, D. Mendel and P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahili, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244:182-188 (1989) и J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dials, Biosynthetic site-specific incorporation of non-natural amino acids into polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8013-8014 (1989). Широкий круг функциональных групп вводили в белки для исследований стабильности белка, укладки белка, ферментного механизма и сигнальной трансдукции.

Был разработан *in vivo* способ, называемый встраиванием при селективном давлении, чтобы использовать промискуитет дикого типа синтетазы; см., например, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F.M. Dong, L. Moroder и R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Ауксотропный штамм, в котором включен соответствующий метаболический путь, который снабжает клетку конкретной природной аминокислотой, выращивают в минимальной среде, содержащей ограниченные концентрации природной аминокислоты, причем транскрипция мишеневого гена подавлена. При наступлении стационарной фазы роста природная аминокислота истощается и ее заменяют аналогом не природной аминокислоты. Индуцирование экспрессии рекомбинантного белка приводит к накоплению белка, содержащего не природный аналог. Например, используя указанную стратегию, о-, м- и п-фторфенилаланины были встроены в белки, и они демонстрируют два характеристических плеча в УФ-спектре, которые легко определяются, см., например, C. Minks, R. Huber, L. Moroder и N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); трифторметионин был использован для замены метионина в лизоциме T4 бактериофага для исследования его взаимодействия с хитоолигосахаридными лигандами с помощью <sup>19</sup>F ЯМР, см., например, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J.F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); и трифторлейцин был встроен вместо лейцина, что привело к повышенной термической и химической стабильности белка лейциновой-"молнии"; см., например, Y. Tang, G. Ghirlanda, W.A. Petka, T. Nakajima, W.F. DeGrado и D.A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40: 1494 (2001). Кроме того, селенометионин и теллуromетионин включают в различные рекомбинантные белки для облегчения фаз разрешения в рентгеновской кристаллографии; см., например, W.A. Hendrickson, J.R. Horton and D.M. Lemaster, *EMBO J.*, 9: 1665 (1990); J.O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J.D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1: 283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann и R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230: 788 (1995) и N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270: 616 (1997). Аналоги метионина с алкеновой или алкиновой функциональностями также были эффективно встроены, что позволило осуществить дополнительные модификации белков химическими средствами; см., например, J.C. van Hest и D.A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428: 68 (1998); J.C. van Hest, K.L. Kiick and D.A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 1282 (2000) и K.L. Kiick and D.A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56: 9487 (2000); патент США № 6586207; патентную публикацию США 2002/0042097, которые включены в описание посредством ссылки.

Успех указанного способа зависит от распознавания аналогов не природной аминокислоты аминоксил-тРНК синтетазой, что обычно требует высокой селективности, чтобы гарантировать точность трансляции белка. Одним из путей увеличения объема указанного способа является ослабление субстратной специфичности аминоксил-тРНК синтетазы, что было достигнуто в ограниченном числе случаев. Например, замена Ala<sup>294</sup> на Gly в *Escherichia coli* фенилаланил-тРНК синтетазе (PheRS) увеличивает размер субстратного связывающего кармана и в результате приводит к ацилированию тРНК Phe п-Cl-фенилаланином (p-Cl-Phe); см. M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33: 7107 (1994). Штамм *Escherichia coli*, несущий эту мутантную PheRS, обеспечивает встраивание п-Cl-фенилаланина или п-Br-фенилаланина вместо фенилаланина; см., например, M. Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364: 272 (1995) и N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D.A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467: 37 (2000). Аналогично, точечная мутация Phe130Ser вблизи сайта связывания аминокислоты *Escherichia coli* тирозил-тРНК синтетазы, как было показано, позволяет встраивать азатирозин более эффективно, чем тирозин; см. F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil and S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275: 40324 (2000).

Другая стратегия включения не природных аминокислот в белки *in vivo* сводится к модификации синтетазы, которая имеет корректирующие механизмы. Такие синтетазы нельзя различить, поэтому активируют аминокислоты, которые структурно близки к когнатным природным аминокислотам. Указанная ошибка исправляется в отдельном сайте, который деацилирует неправильно сосчитанную аминокислоту от тРНК для сохранения точности трансляции белка. Если корректирующую активность синтетазы отключают, структурные аналоги, которые ошибочно активированы, могут избежать функции редактирования и могут быть встроены. Такой подход был недавно продемонстрирован на валил-тРНК синтетазе (ValRS); см. V. Doring, H.D. Mootz, L.A. Nangle, T.L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel и P. Marliere, *Science*, 292: 501 (2001). ValRS могут ошибочно аминоацилировать тРНК Val Cys, Thr или аминобутиратом (Abu); указанные некогнатные аминокислоты затем гидролизуют по редактирующему домену. После случайного мутагенеза хромосомы *Escherichia coli* селективируют мутантный штамм *Escherichia coli*, который содержит мутацию в сайте редактирования ValRS. Такая дефективно-

редактированная ValRS ошибочно считывает тРНК Val с Cys. Так как Abu стерически напоминает Cys (-SH группа в Cys заменена -CH<sub>3</sub> в Abu), мутантная ValRS также встраивает Abu в белки, если указанный мутантный штамм *Escherichia coli* выращивают в присутствии Abu. Масс-спектрометрический анализ показывает, что около 24% валинов заменены на Abu в каждом положении валина в нативном белке.

Твердофазный синтез и полусинтетические методы также позволяют проводить синтез многих белков, содержащих новые аминокислоты. Например, см. следующие публикации и цитированные в них ссылки: Crick, F.H.C., Barrett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am Chem Soc.*, 88(24): 5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc. Chem. Res.*, 22: 47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc.*, 109: 3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S.B.H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*, 256(5054): 221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem*, 11(3): 255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.*, 1(3): 151-157 (1987) и Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, *Science*, 266 (5183): 243 (1994).

Химическая модификация была использована для введения различных неприродных боковых цепей, включая кофакторы, спиновые метки и олигонуклеотиды, в белки *in vitro*; см., например, Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*, 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem*, 54: 565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*, 226(4674): 505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A., Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J. Biol. Chem.*, 243(24): 6392-6401 (1968); Polgar, L., M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc.*, 88: 3153-3154 (1966) и Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242(4881): 1038-1040 (1988).

Альтернативно, биосинтетические методы, в которых используют химически модифицированные аминоксил-тРНК, были использованы для встраивания нескольких биофизических зондов в белки, синтезированные *in vitro*; см. следующие публикации и цитированные в них ссылки: Brunner, J. New Photo-labeling and crosslinking methods, *Annu. Rev. Biochem.*, 62:483-514 (1993) и Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22): 8604-8608 (1986).

Ранее было показано, что неприродные аминокислоты могут быть сайт-специфически встроены в белки *in vitro*, путем добавления химически аминоксиллированных супрессорных тРНК в реакции синтеза белка, программируемые геном, содержащим необходимую амберную бессмысленную мутацию. Используя такие подходы, можно заменить ряд из обычных двадцати аминокислот близкими структурными гомологами, например фторфенилаланином вместо фенилаланина, используя штаммы, ауксотропные для конкретной аминокислоты; см., например, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., *Science*, 268: 439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc.*, 111: 8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.*, 13: 41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992) и Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.*, 24, 435-62 (1995).

Например, получают супрессорную тРНК, которая распознает стоп-кодон UAG, и химически аминоксиллируют неприродной аминокислотой. Обычный сайт-направленный мутагенез используют для введения стоп-кодона TAG в представляющий интерес сайт в гене белка; см., например, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioat-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3): 791-802 (1988). Если аминоксиллированная супрессорная тРНК и мутантный ген объединяют в *in vitro* транскрипционно/трансляционную систему, неприродную аминокислоту встраивают в ответ на UAG кодон, что приводит к получению белка, содержащего указанную аминокислоту в специфическом положении. Эксперименты с использованием [<sup>3</sup>H]-Phe и эксперименты с α-гидроксикислотами продемонстрировали, что только целевая аминокислота встроена в положение, специфицированное UAG кодоном, и что указанная аминокислота не встроена ни в какие другие сайты в белке; см., например, Noren, et al., см. выше; Kobayashi et al. (2003) *Nature Structural Biology*, 10 (6): 425-432 и Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures in proteins, *Science*, 255 (5041): 197-200 (1992).

тРНК может быть аминоксиллирована нужной аминокислотой с помощью любого способа или методики, включая, без ограничения, химическое или ферментативное аминоксиллирование.

Аминоксиллирование можно осуществить с помощью аминоксил-тРНК синтетазы или другой фер-

ментной молекулы, включая, без ограничения, рибозимы. Термин "рибозим" является взаимозаменяемым с термином "каталитическая РНК". Cech с сотрудниками (Cech, 1987, *Science*, 236: 1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.*, 64: 221-226) продемонстрировали присутствие природных РНК, которые действуют как катализаторы (рибозимы). Однако, хотя указанные природные РНК катализаторы должны были действовать только на субстраты рибонуклеиновой кислоты для расщепления и сплайсинга, последнее развитие искусственной эволюции рибозим расширило репертуар катализаторов для различных химических реакций. Исследования идентифицировали РНК молекулы, которые могут катализировать аминокислот-РНК связи по их собственным (2')3'-концам (Illangakere et al., 1995, *Science*, 267: 643-647), и РНК молекулу, которая способна переносить аминокислоту с одной РНК молекулы на другие (Lohse et al., 1996, *Nature*, 381: 442-444).

В опубликованной заявке на патент США 2003/0228593, которая включена в описание посредством ссылки, раскрыты методы конструирования рибозимов и их использование при аминокислотировании тРНК кодируемыми в природе и не кодируемыми в природе аминокислотами. Субстрат-иммобилизованные формы ферментных молекул, которые способны аминокислотировать тРНК, включая, без ограничения, рибозимы, могут способствовать эффективной аффинной очистке аминокислотированных продуктов. Примеры подходящих субстратов включают агарозу, сефарозу и магнитные шарики. Получение и использование субстрат-иммобилизованных форм рибозимов для аминокислотирования раскрыто в *Chemistry and Biology*, 2003, 10: 1077-1084 и в опубликованной патентной заявке США 2003/0228593, которые включены в описание посредством ссылки.

Методы химического аминокислотирования включают, без ограничения, те, которые представлены Hecht с сотрудниками (Hecht, S.M. *Acc. Chem. Res.*, 1992, 25, 545; Heckler, T.G.; Roesser, J.R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S.M. *Biochemistry*, 1988, 27, 7254; Hecht, S.M.; Alford, B.L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 4517) and by Schultz, Chamberlin, Dougherty and others (Cornish, V.W.; Mendel, D.; Schultz, P.G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 621; Robertson, S.A.; Ellman, J.A.; Schultz, P.G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 2722; Noren, C.J.; Anthony-Cahill, S.J.; Griffith, M.C.; Schultz, P.G. *Science*, 1989, 244, 182; Bain, J.D.; Glabe, C.G.; Dix, T.A.; Chamberlin, A.R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 8013; Bain, J.D. et al., *Nature*, 1992, 356, 537; Gallivan, J.P.; Lester, H.A.; Dougherty, D.A. *Chem. Biol.*, 1997, 4, 740; Turcatti, et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 19991; Nowak, M.W. et al., *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M.E. et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23169; Hoshaka, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 34), которые включены в описание посредством ссылки, чтобы избежать использования синтетазы при аминокислотировании. Такие методы или другие химические методы аминокислотирования можно использовать для аминокислотирования тРНК молекул.

Методы создания каталитических РНК могут включать создание отдельных пулов случайных рибозимных последовательностей, осуществления направленной эволюции пулов, скрининг пулов в поисках желательной активности аминокислотирования и селекцию последовательностей таких рибозимов, которые демонстрируют необходимую активность аминокислотирования.

Рибозимы могут включать мотивы и/или участки, которые увеличивают активность ацилирования, такие как GGU мотив и U-обогащенный участок. Например, сообщалось, что U-обогащенный участок может облегчить распознавание субстрата аминокислоты и GGU-мотив может образовывать пары оснований с 3'-концом тРНК. В комбинации GGU и мотив и U-обогащенный участок облегчают одновременное распознавание и аминокислоты, и тРНК и тем самым облегчают аминокислотирование 3'-конца тРНК.

Рибозимы можно создать, используя *in vitro* селекцию, используя частично рандомизированный t24mini конъюгированный с tRNA<sup>Asn</sup><sub>CCCG</sub>, с последующим систематическим конструированием консенсусной последовательности, найденной в активных клонах. Пример рибозима, полученного указанным способом, называют "Fх3 рибозим" и он раскрыт в опубликованной заявке на патент США № 2003/0228593, содержание которой включено в описание посредством ссылки, действует как разносторонний катализатор для синтеза различных аминокислот-тРНК, содержащих когнатные неприродные аминокислоты.

Иммобилизацию на субстрате можно использовать для обеспечения эффективной аффинной очистки аминокислотированных тРНК. Примеры подходящих субстратов включают, без ограничения, агарозу, сефарозу и магнитные шарики. Рибозимы можно иммобилизовать на смолах, используя преимущество химического строения РНК, такое как то, что 3'-цис-диол на рибозе РНК может быть окисленным периодом с получением соответствующего диальдегида для облегчения иммобилизации РНК на смоле. Можно использовать различные типы смол, включая дешевые гидразидные смолы, где восстановительное аминирование превращает взаимодействие между смолой и рибозимом в необратимую связь. Синтез аминокислот-тРНК можно значительно облегчить, используя указанную методику аминокислотирования на колонке. Kourouklis et al., *Methods*, 2005, 36:239-4 описывает систему аминокислотирования с использованием колонки.

Выделение аминокислотированных тРНК можно осуществить различными способами. Один подходящий способ представляет собой элюирование аминокислотированных тРНК из колонки с помощью буфера, такого как раствор ацетата натрия с 10 mM EDTA, буфера, содержащего 50 mM N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(3-пропансульфоновой кислоты), 12,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM EDTA или



просто EDTA, забуференной воды (pH 7,0).

Аминоацилированные тРНК можно добавлять в реакции трансляции для того, чтобы встроить аминокислоту, которой была аминоацилирована тРНК, в положение, выбранное в полипептиде, полученном в реакции трансляции. Примеры трансляционных систем, в которых можно использовать аминоацилированную тРНК настоящего изобретения, включают, без ограничения, клеточные лизаты. Клеточные лизаты представляют собой компоненты реакции, необходимые для *in vitro* трансляции полипептида из добавленной мРНК. Примеры таких компонентов реакций включают, без ограничения, рибосомальные белки, рРНК, аминокислоты, тРНК, GTP, ATP, инициаторы трансляции, факторы элонгации и дополнительные факторы, связанные с трансляцией. Кроме того, системы трансляции могут быть периодически или отдельными трансляциями. В системе периодической трансляции скомбинированы компоненты системы в одном отделении, тогда как в системе отдельной трансляции компоненты реакции трансляции отделены от продуктов реакции, которые могут снизить эффективность трансляции. Такие трансляционные системы доступны коммерчески.

Кроме того, можно использовать объединенную систему транскрипции/трансляции. Объединенные системы транскрипции/трансляции позволяют осуществлять как транскрипцию вводимой ДНК в соответствующие мРНК, которые, в свою очередь, транслируются компонентами реакции. Примером коммерческой объединенной системы транскрипции/трансляции является Rapid Translation System (RTS, Roche Inc.). Указанная система включает смесь, содержащую лизат *E. coli*, для обеспечения трансляционных компонентов, таких как рибосомы и факторы трансляции. Кроме того, РНК полимеразу включают для транскрипции вводимой ДНК в матрицу мРНК для использования при трансляции. RTS может использовать разделение компонентов реакции, располагая мембрану между отделениями для реакции, включая отделение подачи/отходов и отделение транскрипции/трансляции.

Аминоацилирование тРНК можно осуществить другими агентами, включая, без ограничения, трансферазы, полимеразы, каталитические антитела, многофункциональные белки и т.п.

Stehan в *Scientist*, 2005, Oct. 10; p. 30-33 описывает дополнительные методы встраивания не кодируемых в природе аминокислот в белки. Lu et al., in *Mol. Cell.*, 2001, Oct.; 8(4): 759-69 раскрывают способ, в котором белок химически лигируют с синтетическим пептидом, содержащим не природные аминокислоты (лигирование экспрессированного белка).

Микроинъекционные методики также были использованы для внедрения не природных аминокислот в белки; см., например, M.W. Nowak, P.C. Kearney, J.R. Sampson, M.E. Saks, C.G. Labarca, S.K. Silverman, W.G. Zhong, J. Thorson, J.N. Abelson, N. Davidson, P.G. Schultz, D.A. Dougherty and H.A. Lester, *Science*, 268:439 (1995) и D.A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000). Xenopus ооцит конъюгируют с двумя видами РНК, полученными *in vitro*: мРНК, кодирующей белок-мишень с UAG стоп-кодоном в представляющем интерес положении аминокислоты, и амбер супрессорную тРНК, аминоацилированную нужной не природной аминокислотой. Затем механизм трансляции ооцита встраивают в не природную аминокислоту в положение, специфицированное UAG. Указанный способ позволил осуществить *in vivo* структурно-функциональные исследования интегральных мембранных белков, которые обычно не поддаются *in vitro* экспрессионным системам. Примеры включают встраивание флуоресцентной аминокислоты в тахикининовый рецептор нейрокина-2 для измерения расстояний с помощью резонансного переноса флуоресцентной энергии; см., например, G. Turcatti, K. Nemeth, M.D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271: 19991 (1996); the incorporation of biotinylated amino acids to identify surface-exposed residues in ion channels, see, e.g., J.P. Gullivan, H.A. Lester and D.A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4: 739 (1997); the use of caged tyrosine analogs to monitor conformational changes in an ion channel in real time, see, e.g., J.C. Miller, S.K. Silverman, P.M. England, D.A. Dougherty and H.A. Lester, *Neuron*, 20: 619 (1998); and the use of alpha hydroxy amino acids to change ion channel backbones for probing their gating mechanisms. See, e.g., P.M. England, Y. Zhang, D.A. Dougherty and H.A. Lester, *Cell*, 96: 89 (1999) and T. Lu, A.Y. Ting, J. Mainland, L.Y. Jan, P.G. Schultz and J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4: 239 (2001).

Способность встраивать не природные аминокислоты непосредственно в белки *in vivo* предлагает широкий круг преимуществ, включая, без ограничения, высокие выходы мутантных белков, техническую простоту, возможность исследования мутантных белков в клетках или, возможно, в живых организмах, и использование указанных мутантных белков в терапевтических и диагностических целях. Способность включать не природные аминокислоты с различными размерами, кислотностями, нуклеофильностями, гидрофобностями и другими свойствами в белки может значительно расширить наши возможности рационально и систематически изменять структуры белков как для исследования функций белков, так и для создания новых белков или организмов с новыми свойствами.

В одной из попыток сайт-специфического встраивания para-F-Phe пару дрожжевая амбер супрессорная тРНК-heCUA/фенилаланил-тРНК синтетаза используют в p-F-Phe устойчивом, Phe ауксотрофическом штамме *Escherichia coli*; см., например, R. Furter, *Protein Sci.*, 7:419 (1998).

Может также оказаться возможным добиться экспрессии полинуклеотида bG-CSF настоящего изобретения, используя не содержащую клеток (*in-vitro*) трансляционную систему. Трансляционные системы могут быть клеточными или могут не содержать клеток и могут быть прокариотными или эукариот-

ными. Клеточные трансляционные системы включают, без ограничения, препараты целых клеток, такие как пермеабиллизированные клетки или клеточные культуры, где нужную последовательность нуклеиновой кислоты можно транскрибировать в мРНК и транслировать полученную мРНК. Не содержащие клеток трансляционные системы коммерчески доступны и хорошо известны различные типы и системы. Примеры не содержащих клеток систем включают, без ограничения, прокариотные лизаты, такие как лизаты *Escherichia coli*, и эукариотные лизаты, такие как экстракты зародышей пшеницы, клеточные лизаты насекомых, лизаты кроличьих ретикулоцитов, лизаты кроличьих ооцитов и человеческие клеточные лизаты. Эукариотные экстракты или лизаты могут оказаться предпочтительными, если получающийся белок является гликозилированным, фосфорилированным или модифицированным каким-либо другим способом, так как многие такие модификации возможны только в эукариотных системах. Некоторые из указанных экстрактов и лизатов доступны коммерчески (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). Мембранные экстракты, такие как экстракты поджелудочной железы собаки, содержащие микросомальные мембраны, также доступны и их можно использовать для трансляции секреторных белков. В указанных системах, которые могут включать или мРНК в качестве матрицы (in-vitro трансляция) или ДНК в качестве матрицы (объединенная in-vitro транскрипция и трансляция), in vitro синтез управляется рибосомами. Было предпринято множество попыток создания белковых экспрессионных систем, не содержащих клеток; см., например, Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74:309-316 (2001); Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999) и Patnaik, R. and J.R. Swartz, *Biotechniques*, 24, 862-868, (1998); патент США № 6337191; патентную публикацию США № 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785, которые включены в описание посредством ссылки. Другие подходы, которые можно использовать для экспрессии полипептидов bG-CSF, включающих не кодируемую в природе аминокислоту, включают методику слияния мРНК-пептид; см., например, R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology*, 10: 1043-1050 (2003). При таком подходе матрицу мРНК, связанную с пиромидином, транслируют в пептид на рибосоме. Если одна или более из тРНК молекул была модифицирована, неприродные аминокислоты также можно включить в пептид. После того как считан последний мРНК кодон, пуромидин захватывает С-конец пептида. Если обнаруживают, что полученный конъюгат мРНК-пептид обладает интересными свойствами в in vitro анализе, его идентичность можно легко определить из мРНК последовательности. Таким образом, можно скринировать библиотеки полипептидов bG-CSF, включающие одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, для идентификации полипептидов, обладающих нужными свойствами. Сообщается, что позднее проведенные in vitro трансляции рибосомов с очищенными компонентами позволили синтезировать пептиды, замещенные не кодируемыми в природе аминокислотами; см., например, A. Forster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6353 (2003).

Можно также использовать восстановительные трансляционные системы. Смеси очищенных факторов трансляции также с успехом были использованы для трансляции мРНК в белок, также как и комбинации лизатов или лизатов, дополненных очищенными факторами трансляции, такими как фактор-1 инициирования (IF-1), IF-2, IF-3 ( $\alpha$  или  $\beta$ ), фактор удлинения Т (EF-Tu) или факторы терминации. Системы без клеток можно также соединить с системами транскрипции/трансляции, где ДНК вводят в систему, транскрибируют в мРНК и полученную мРНК транслируют, как раскрыто в *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., editors, Wiley Interscience, 1993), что специально включено в описание посредством ссылки. РНК, транскрибированная в эукариотной транскрипционной системе, может быть в форме гетероядерной РНК (hnRNA) или экзона 5'-конца (7-метилгуанозин) и 3'-конца поли А с наращенным хвостовым олигонуклеотидом зрелой мРНК, которые могут оказаться выгодными в некоторых трансляционных системах. Например, экзипированные мРНК транслируют с высокой эффективностью в систему лизата ретикулоцитов.

#### IX. Макромолекулярные полимеры, присоединенные к полипептидам bG-CSF.

Раскрытые здесь различные модификации полипептидов с неприродными аминокислотами могут быть осуществлены с использованием раскрытых здесь композиций, методов, методик и стратегий. Такие модификации включают встраивание дополнительной функциональности в компонент полипептида с неприродной аминокислотой, включая, без ограничения, гидроксилалкилкрахмал (HAS), гидроксипропилкрахмал (HES); метку; краситель; полимер; водорастворимый полимер; производное полиэтиленгликоля; фотосшивающий линкер; радионуклид; цитотоксическое соединение; лекарственное средство; метку аффинности; метку фотоаффинности; реакционноспособное соединение; смола; второй белок или полипептид или аналог полипептида; антитело или фрагмент антитела; металлохелатор; кофактор; жирную кислоту; углеводород; полинуклеотид; ДНК; РНК; антисмысловый полинуклеотид; сахарид; водорастворимый дендример; циклодекстрин; ингибиторную рибонуклеиновую кислоту; биоматериал; наночастицы; спиновую метку; флуорофор, металлсодержащую молекулу; радиоактивную молекулу; новую функциональную группу; группу, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другими молекулами; фотозахватывающую молекулу; молекулу, возбуждаемую актиничным излучением; фотоизомерируемую молекулу; биотин; производное биотина; аналог биотина; молекулу, включающую тяжелый

атом; химически отщепляемую группу; фотоотщепляемую группу; удлиненную боковую цепь; связанный с углеродом сахар; окислительно-восстановительный агент; аминокислоту; токсическую молекулу; изотопномеченную молекулу; биофизический зонд; фосфоресцентную группу; хемилюминесцентную группу; электроноплотную группу; магнитную группу; интеркалирующую группу; хромофор; агент переноса энергии; биологически активный агент; детектируемую метку; малые молекулы; наночастицы; нанотрансмиттер; радионуклеотид; радиотрансмиттер; агент захвата нейтронов; или любую комбинацию вышеперечисленных или других необходимых соединений или веществ. В качестве иллюстрации нелimitedирующие примеры раскрытых здесь композиций, методов, методик и стратегий, следующие описания сфокусированы на добавлении макромолекулярных полимеров к полипептидам неприродных аминокислот при понимании того, что раскрытые здесь композиции, методы, методики стратегии также применимы (с соответствующими модификациями, при необходимости, и для того, чтобы специалист в данной области мог воспользоваться приведенными здесь раскрытиями) для добавления других функциональностей, включая, без ограничения, те, что перечислены выше.

Широкий круг макромолекулярных полимеров и других молекул может быть связан с полипептидами bG-CSF настоящего изобретения для модулирования биологических свойств полипептидов bG-CSF и/или для придания новых биологических свойств молекулам bG-CSF. Такие макромолекулярные полимеры могут быть связаны с полипептидом bG-CSF через кодируемую в природе аминокислоту, через не кодируемую в природе аминокислоту, или через любой функциональный заместитель природной или неприродной аминокислоты, или любой заместитель или функциональную группу, добавленную к природной или неприродной аминокислоте. Молекулярная масса полимера может меняться в широком интервале значений, включая, без ограничения, значения от около 100 до около 100000 Да или более. Молекулярная масса полимера может быть от около 100 до около 100000, включая, без ограничения, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса полимера составляет величину от около 100 до около 50000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса полимера составляет величину от около 100 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса полимера составляет величину от около 1000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса полимера составляет величину от около 5000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса полимера составляет величину от около 10000 до около 40000 Да.

В настоящем изобретении предложены практически гомогенные препараты конъюгатов полимер:белок. Выражение "практически гомогенный" означает, что молекулы конъюгата полимер:белок наблюдаются больше чем в половине всего белка. Конъюгат полимер:белок обладает биологической активностью и представленные здесь "практически гомогенные" препараты ПЭГилированного полипептида bG-CSF являются такими, которые в достаточной степени гомогенны, чтобы проявлять преимущества гомогенного препарата, например простоту клинического применения в предсказуемости сходимости фармакокинетических результатов.

Можно также выбрать приготовление смеси молекул конъюгата полимер:белок, и преимущество при таком выборе будет состоять в том, что можно выбрать соотношение монополимер:белок в конъюгате для включения в смесь. Так, при желании можно приготовить смесь различных белков с различным числом присоединенных к ним молекул полимера (т.е. ди-, три-, тетра- и т.д.) и, комбинируя указанные конъюгаты с конъюгатом монополимер:белок, полученным в соответствии с указанными способами настоящего изобретения, и получить смесь с заранее определенным соотношением монополимер:белковые конъюгаты.

Выбранный полимер может быть водорастворимым, так что белок, к которому он присоединен, не осаждается в водной среде, такой как физиологическая среда. Полимер может быть разветвленным или неразветвленным. Для терапевтического применения полученного в конечном виде препарата полимер должен быть фармацевтически приемлемым.

Примеры полимеров включают, без ограничения, полиалкиловые эфиры и их алкоксиэпированные аналоги (например, полиоксиэтиленгликоль, полиоксиэтилен/пропиленгликоль и их метокси- или этоксиэпированные аналоги, особенно полиоксиэтиленгликоль, причем последний известен также как полиэтиленгликоль или ПЭГ); поливинилпирролидоны; поливинилалкиловые простые эфиры; полиоксазолины, полиалкилоксасолины и полигидроксиалкилоксасолины; полиакриламиды, полиалкилакриламиды и полигидроксиалкилакриламиды (например, полигидроксипропилметакриламид и их производные); полигидроксиалкилакрилаты; полисиаловые кислоты и их аналоги; гидрофильные пептидные последовательности; полисахариды и их производные, включая декстран и производные декстрана, например карбоксиметилдекстран, сульфаты декстрана, аминодекстран; целлюлозу и ее производные, например карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиалкилцеллюлозы; хитин и его производные, например хитозан, сукцинилхитозан, карбоксиметилхитин, карбоксиметилхитозан; гиалуроновую кислоту и ее производные; крахмалы; альгинаты; хондроитинсульфат; альбумин; пуллулан и карбоксиметилпуллулан; полиаминокислоты и их производные, например полиглутаминовые кислоты, полилизины, полиаспарагиновые кислоты, полиаспартамиды; сополимеры малеинового ангидрида, такие как сополимер стирола и

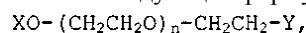
малеинового ангидрида, сополимер дивинилэтилового эфира и малеинового ангидрида; поливиниловые спирты; их сополимеры; их терполимеры; их смеси; гидроксилалкилкрахмал (HAS), включая, без ограничения, гидроксизтилкрахмал (HES); и производные вышеперечисленных.

Отношение количества молекул полиэтиленгликоля к молекулам белка будет меняться, также как и их концентрации в реакционной смеси. Обычно оптимальное отношение (с точки зрения эффективности реакции в том, чтобы был минимальный избыток непрореагировавшего белка или полимера) можно определить по молекулярным массам выбранного полиэтиленгликоля и по количеству доступных реакционноспособных групп. Что касается молекулярного веса, то обычно чем больше молекулярная масса самого полимера, тем меньшее число полимерных молекул может быть присоединено к белку. Аналогично, при оптимизации параметров следует принимать во внимание разветвленность полимера. Обычно чем выше молекулярная масса (или чем больше разветвленность) тем выше отношение полимер:белок.

Когда речь идет о конъюгатах ПЭГ:полипептид bG-CSF, выражение "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству, которое приносит животному необходимую пользу. Такое количество может меняться для различных индивидуумов и будет зависеть от ряда факторов, включая общее физическое состояние пациента и причины, которые вызвали подлежащее лечению заболевание. Количество полипептида bG-CSF, которое используют для лечения, обеспечивает приемлемую степень изменения и сохранения необходимой реакции на благоприятном уровне. Терапевтически эффективное количество композиции настоящего изобретения может легко определить специалист в данной области, используя общедоступные материалы и процедуры.

Водорастворимый полимер может иметь любую структурную форму, включая, без ограничения, линейную, вилкообразную или разветвленную. Обычно водорастворимый полимер представляет собой поли(алкиленгликоль), такой как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), но можно использовать другие водорастворимые полимеры. Так, например, ПЭГ использован для описания некоторых вариантов настоящего изобретения.

ПЭГ представляет собой хорошо известный водорастворимый полимер, который коммерчески доступен или его можно получить с помощью полимеризации этиленгликоля с раскрытием кольца в соответствии со способами, известными специалистам в данной области (Sandier and Kara, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, p. 138-161). Термин "ПЭГ" широко используют для охвата всех молекул полиэтиленгликоля, независимо от размера или модификации на концах ПЭГ, и он может быть представлен как связанный с полипептидом bG-CSF следующей формулой:



где n принимает значения от 2 до 10000 и X представляет собой H или терминальную модификацию, включая, без ограничения, C<sub>1-4</sub> алкил, защитную группу или терминальную функциональную группу.

В некоторых случаях ПЭГ, используемый в настоящем изобретении, заканчивается на одном конце гидроксидом или метоксидом, то есть X представляет собой H или CH<sub>3</sub> ("метокси ПЭГ"). Альтернативно, ПЭГ может заканчиваться реакционноспособной группой, тем самым формируя бифункциональный полимер. Типичные реакционноспособные группы могут включать такие реакционноспособные группы, которые обычно используют для осуществления реакций с функциональными группами, находящимися в обычных аминокислотах (включая, без ограничения, малеимидные группы, активированные карбонаты (включая, без ограничения, п-нитрофениловый эфир), активированные сложные эфиры (включая, без ограничения, N-гидроксисукцинимид, п-нитрофениловый эфир) и альдегиды), также как функциональные группы, которые инертны в отношении 20 обычных аминокислот, но которые реагируют специфически с комплементарными функциональными группами, присутствующими в не кодируемых в природе аминокислотах (включая, без ограничения, азидные группы, группы алкина). Следует заметить, что другой конец ПЭГ, который представлен в вышеприведенной формуле как Y, будет присоединяться прямо или косвенно к полипептиду bG-CSF через природную или не кодируемую в природе аминокислоту. Например, Y может быть амидной, карбаматной или мочевиной связью с аминогруппой (включая, без ограничения, эpsilon аминлизина или N-конец) полипептида. Альтернативно, Y может быть малеимидной связью с группой тиола (включая, без ограничения, тиольную группу цистеина). Альтернативно, Y может быть связью с остатком, который обычно не доступен через 20 обычных аминокислот. Например, азидную группу на ПЭГ можно подвергнуть взаимодействию с группой алкина полипептида bG-CSF с образованием [3+2] продукта циклоприсоединения Хьюсгена. Альтернативно, группу алкина ПЭГ можно подвергнуть взаимодействию с азидной группой, присутствующей в не кодируемой в природе аминокислоте с образованием аналогичного продукта. В некоторых вариантах сильный нуклеофил (включая, без ограничения, гидразин, гидразид, гидроксилламин, семикарбазид) можно подвергнуть взаимодействию с альдегидной или кетонной группой, присутствующей в не кодируемой в природе аминокислоте, с образованием гидразона, оксима или семикарбазона, как применимо, которые в некоторых случаях можно дальше восстановить путем обработки соответствующим восстанавливающим агентом. Альтернативно, сильный нуклеофил можно включить в полипептид bG-CSF через не кодируемую в природе аминокислоту и использовать в реакции предпочтительно с кетонной или альдегидной группой, присутствующей в водорастворимом полимере.

При желании можно использовать ПЭГ практически с любой подходящей молекулярной массой, включая, без ограничения, массы от около 100 до 100000 Да или больше при желании (включая, без ограничения, иногда 0,1-50 или 10-40 кДа). Молекулярная масса ПЭГ может меняться в широком интервале значений, включая, без ограничения, значения от около 100 до около 100000 Да или больше. Молекулярная масса ПЭГ может быть от 100 до около 100000, включая, без ограничения, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах масса ПЭГ находится от около 100 до около 50000 Да. В некоторых вариантах масса ПЭГ находится от около 100 до около 40000 Да. В некоторых вариантах масса ПЭГ находится от около 1000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах масса ПЭГ находится от около 5000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах масса ПЭГ находится от около 10000 до около 40000 Да. Можно также использовать ПЭГс с разветвленными цепями, включая, без ограничения, ПЭГ молекулы, каждая из цепей которых имеет ММ в интервале 1-100 кДа (включая, без ограничения, 1-50 или 5-20 кДа). Молекулярная масса каждой из цепей ПЭГ с разветвленной цепью может быть, включая, без ограничения, величиной от около 1000 до около 100000 Да или больше. Молекулярная масса каждой из цепей ПЭГ с разветвленной цепью может находиться от около 1000 до около 100000 Да, включая, без ограничения, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000 и 1000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью находится от около 1000 до около 50000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью находится от около 1000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью находится от около 5000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью находится от около 5000 до около 20000 Да. Широкий круг молекул ПЭГ раскрыт, включая, без ограничения, в the Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog, который включен в описание посредством ссылки.

Обычно по меньшей мере один конец молекулы ПЭГ доступен для реакции с не кодируемой в природе аминокислотой. Например, ПЭГ производные, содержащие алкинную и азидную молекулы для взаимодействия с боковыми цепями аминокислоты, можно использовать для присоединения ПЭГ к не кодируемым в природе аминокислотам, как здесь раскрыто. Если не кодируемая в природе аминокислота включает азид, тогда ПЭГ обычно содержит или алкиновую молекулу для осуществления образования [3+2] продукта циклоприсоединения, или активированные виды ПЭГ (т.е. сложный эфир, карбонат), содержащие фосфиновую группу для осуществления образования амидной связи. Альтернативно, если не кодируемая в природе аминокислота включает алкин, тогда ПЭГ обычно содержит азидную молекулу для осуществления образования [3+2] продукта циклоприсоединения Хьюсгена. Если не кодируемая в природе аминокислота включает карбонильную группу, ПЭГ обычно включает эффективный нуклеофил (включая, без ограничения, гидразидную, гидразиновую, гидроксилламинную или семикарбазидную функциональность) для осуществления образования соответствующих гидразоновой, оксимной и семикарбазоновой связей соответственно. В других вариантах можно использовать обратную ориентацию реакционноспособных групп по сравнению с вышеописанной, то есть азидную молекулу в не кодируемой в природе аминокислоте можно подвергнуть взаимодействию с производным ПЭГ, содержащим алкин.

В некоторых вариантах вариант полипептида bG-CSF с производным ПЭГ содержит химическую функциональность, которая является реакционноспособной в отношении химической функциональности, присутствующей на боковой цепи не кодируемой в природе аминокислоты.

В настоящем изобретении предложены в некоторых вариантах производные азид- и ацетиленсодержащего полимера, включающие основную цепь водорастворимого полимера, со средней молекулярной массой от около 800 до около 100000 Да. Основной полимерной цепью водорастворимого полимера может быть поли(этиленгликоль). Однако следует понимать, что большое разнообразие водорастворимых полимеров, включая, без ограничения, поли(этилен)гликоль и другие родственные полимеры, включая поли(декстран) и поли(пропиленгликоль), также являются подходящими для использования в практике настоящего изобретения, и предполагается, что использование термина ПЭГ или поли(этиленгликоль) охватывает и включает все такие молекулы. Термин ПЭГ включает, без ограничения, поли(этиленгликоль) в любой из его форм, включая бифункциональные ПЭГ, многоплечие ПЭГ, производные ПЭГ, вилкообразные ПЭГ, разветвленные ПЭГ, ПЭГ с подвесками (т.е. ПЭГ или родственные полимеры, содержащие одну или более из функциональных групп, подвешенную к основной цепи полимера) или ПЭГ, содержащие разлагаемые связи внутри цепи.

ПЭГ обычно является прозрачным, бесцветным, без запаха, растворимым в воде, термостабильным, инертным в отношении многих химических агентов, негидролизующим или неразлагающимся и обычно нетоксичным. Поли(этиленгликоль) считается биосовместимым, то есть говорят, что ПЭГ способен сосуществовать с живыми тканями или организмами не нанося им вреда. Более конкретно, ПЭГ является практически неиммуногенным, то есть говорят, что у ПЭГ отсутствует тенденция вызывать иммунную реакцию в организме. Будучи присоединен к молекуле, обладающей некоторыми желательными функ-

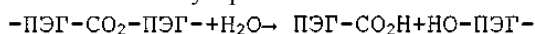
циями в организме, такими как свойства биологически активного агента, ПЭГ имеет тенденцию маскировать указанный агент и уменьшать или исключать любую иммунную реакцию, так что организм становится толерантным к присутствию указанного агента. Конъюгаты ПЭГ практически, по существу, не вызывают иммунной реакции, не вызывают коагуляции или других нежелательных эффектов. ПЭГ, имеющий формулу  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , где  $n$  принимает значения от около 3 до около 4000, обычно от около 20 до около 2000, является подходящим для использования в настоящем изобретении. ПЭГ с молекулярной массой от около 800 до около 100000 Да в некоторых вариантах настоящего изобретения особенно пригодны в качестве основной полимерной цепи. Молекулярная масса ПЭГ может меняться в широких пределах, включая, без ограничения, от около 100 до около 100000 Да или больше. Молекулярная масса ПЭГ может быть от около 100 до около 100000, включая, без ограничения, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 2000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса ПЭГ находится от около 100 до около 50000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса ПЭГ находится от около 100 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса ПЭГ находится от около 5000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса ПЭГ находится от около 10000 до около 40000 Да.

Основная полимерная цепь может быть линейной или разветвленной. Разветвленные основные полимерные цепи хорошо известны специалистам в данной области. Обычно разветвленный полимер имеет центральную разветвленную коровую молекулу и множество полимерных цепей, связанных с центральной основной цепью. ПЭГ обычно используют в разветвленных формах, которые можно получить путем добавления этиленоксида к различным полиолам, таким как глицерин, олигомеры глицерина, пентаэритритол и сорбит. Центральную разветвленную молекулу можно также получить из нескольких аминокислот, таких как лизин. Разветвленный поли(этиленгликоль) можно в общем виде представить как  $\text{R}-(\text{ПЭГ}-\text{ОН})_m$ , в котором  $\text{R}$  получен из коровой молекулы, такой как глицерин, олигомеры глицерина или пентаэритритол, и  $m$  представляет собой число ветвей. ПЭГ молекулы, состоящие из многих ветвей, такие как те, что раскрыты в патентах США №№ 5932462; 5643575; 5229490; 428872; опубликованном патенте США 2003/0143596; WO 96/21469 и WO 93/21259, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте, также можно использовать в качестве основной полимерной цепи.

Разветвленный ПЭГ может также быть в форме вилкообразного ПЭГ, представленного  $\text{ПЭГ}-(\text{YCHZ})_n$ , где  $\text{Y}$  представляет собой связывающую группу и  $\text{Z}$  представляет собой активированную концевую группу, связанную с СН цепочкой атомов определенной длины.

Еще одна разветвленная форма, ПЭГ с подвесками, имеет реакционноспособные группы, такие как карбоксил, скорее вдоль основной цепи ПЭГ, нежели у конца цепи ПЭГ.

Кроме указанных форм, ПЭГ можно также получить полимер со слабыми или разлагаемыми связями в основной цепи. Например, можно получить ПЭГ со сложноэфирными связями в основной цепи полимера, которые подвергаются гидролизу. Как показано далее, такой гидролиз приводит к расщеплению полимера на фрагменты с более низкой молекулярной массой



Специалистам в данной области должно быть понятно, что термин поли(этиленгликоль)или ПЭГ представляет или включает все известные специалистам формы, включая, без ограничения, те, что здесь раскрыты.

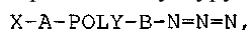
Многие другие полимеры также являются подходящими для использования в настоящем изобретении. В некоторых вариантах основная полимерная цепь, которая является водорастворимой, содержащая от 2 до около 300 концов, особенно пригодна для использования в настоящем изобретении. Примеры подходящих полимеров включают, без ограничения, другие поли(алкиленгликоли), такие как поли(пропиленгликоль) ("PPG"), их сополимеры (включая, без ограничения, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля), их терполимеры, их смеси и т.п. Хотя молекулярная масса каждой основной цепи полимера может меняться, обычно она составляет величину в интервале от около 800 до около 100000, часто от около 6000 до около 80000 Да. Молекулярная масса каждой основной цепи полимера может быть от около 100 до около 100000 Да, включая, без ограничения, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой основной цепи полимера составляет величину от около 100 до около 50000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой основной цепи полимера составляет величину от около 100 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой основной цепи полимера составляет величину от около 1000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой основной цепи полимера составляет величину от около 5000 до около 40000 Да. В некоторых вариантах молекулярная масса каждой основной цепи полимера составляет величину от около 10000 до около 40000 Да.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что приведенный выше список для практически водорастворимых основных цепей никоим образом не является исчерпывающим, но лишь иллюст-

ративным, и что все полимерные материалы, обладающие раскрытыми выше качествами, рассматриваются как подходящие для использования в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах настоящего изобретения производные полимера являются "многофункциональными", что подразумевает, что основная цепь полимера имеет по меньшей мере два конца и возможно так много, как около 300 концов, функционализированных или активированных функциональными группами. Многофункциональные производные полимеров включают, без ограничения, линейные полимеры, содержащие два конца, причем каждый конец связан с функциональной группой, которые могут быть одинаковыми или различными.

В одном варианте производное полимера имеет структуру



где N=N=N представляет собой азидную молекулу;

B представляет собой связывающую молекулу, которая может присутствовать или отсутствовать;

POLY представляет собой водорастворимый неантигенный полимер;

A представляет собой связывающую молекулу, который может присутствовать или отсутствовать и которая может быть одинаковой с B или может отличаться от него; и

X представляет собой вторую функциональную группу.

Примеры связывающих молекул для A и B включают, без ограничения, многофункционализированную алкильную группу, содержащую вплоть до 18 атомов углерода, которая может содержать от 1 до 10 атомов углерода. Гетероатомы, такие как азот, кислород или сера, могут быть включены в алкильную цепь. Алкильная цепь может также быть разветвленной у гетероатома. Другие примеры связывающих молекул для A и B включают, без ограничения, многофункционализированную арильную группу, содержащую вплоть до 10 атомов углерода, и обычно содержащую 5-6 атомов углерода. Арильная группа может быть замещена одним или более из атомов углерода, азота, кислорода или серы. Другие примеры подходящих связывающих групп включают такие связывающие группы, которые раскрыты в патентах США №№ 5932462; 5643575 и опубликованном патенте США 2003/0143596, которые включены в описание посредством ссылки. Специалистам в данной области должно быть ясно, что приведенный выше список связывающих молекул никоим образом не является исчерпывающим, но только иллюстративным, и что все связывающие молекулы, обладающие свойствами, раскрытыми выше, рассматриваются как подходящие для использования в настоящем изобретении.

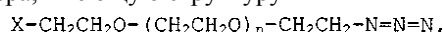
Примеры подходящих функциональных групп для использования в качестве X включают, без ограничения, гидроксил, защищенный гидроксил, алкоксил, активный сложный эфир, такой как сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила и сложные эфиры 1-бензотриазолила, активные карбонаты, такие как N-гидроксисукцинимидилкарбонаты и 1-бензотриазолилкарбонаты, ацеталь, альдегид, гидраты альдегидов, алкенил, акрилат, метакрилат, акриламид, активный сульфен, амин, аминоксид, защищенный амин, гидразид, защищенный гидразид, защищенный тиол, карбоновую кислоту, защищенную карбоновую кислоту, изотиоцианат, изотиоцианат, малеимид, винилсульфон, дитиопиридин, винилпиридин, иодоацетамид, эпоксид, глиоксали, дионы, мезилаты, тозилаты, трезилат, алкен, кетон и азид. Как должно быть понятно специалисту в данной области, выбранная X молекула должна быть совместима с азидной группой так, чтобы реакция с азидной группой не происходила. Азидсодержащие производные полимеров могут быть гомобифункциональными, что означает, что вторая функциональная группа (т.е. X) также является азидной молекулой, или гетеробифункциональными, что означает то, что вторая функциональная группа является отличающейся функциональной группой.

Термин "защищенный" относится к присутствию защитной группы или молекулы, которые предотвращают реакцию химически реакционноспособной функциональной группы в некоторых условиях реакции. Защитная группа будет меняться в зависимости от типа химически реакционноспособной группы, которую необходимо защитить. Например, если химически реакционноспособной группой является амин или гидразид, защитную группу можно выбрать из группы, состоящей из трет-бутилоксикарбонила (t-Boc) и 9-фторенилметоксикарбонила (Fmoc). Если химически реакционноспособной группой является тиол, защитной группой может быть ортопиридилдисульфид. Если химически реакционноспособной группой является карбоновая кислота, такая как бутановая или пропионовая кислота, или гидроксильная группа, защитной группой может быть бензильная или алкильная группа, такая как метил, этил или трет-бутил. Другие защитные группы, известные специалистам, также можно использовать в настоящем изобретении.

Специфические примеры терминальных функциональных групп, известные из литературы, включают, без ограничения, N-сукцинимидилкарбонат (см., например, патенты США №№ 5281698, 5468478), амин (см., например, Buckmann et al., Makromol. Chem., 182: 1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19: 1177 (1983)), гидразид (см., например, Andresz et al., Makromol. Chem., 179: 301 (1978)), сукцинимидилпропионат и сукцинимидилбутаноат (см., например, Olson et al. в Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, p. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; см. также патент США № 5672662), сукцинимидилсукцинат (см., например, Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175 (1984) и Joppich et al., Makromol. Chem., 180: 1381 (1979), сложный эфир сукцинимидила (см., на-

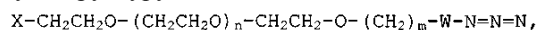
пример, патент США № 4670417), бензотриазолкарбонат (см., например, патент США № 5650234), глицидиловый простой эфир (см., например, Pitha et al., Eur. J. Biochem., 94: 11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem., 13: 354 (1991), оксикарбонилимидазол (см., например, Beauchamp, et al., Anal. Biochem., 131:25 (1983), Tondelli et al., J. Controlled Release, 1:251 (1985)), п-нитрофенилкарбонат (см., например, Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985) и Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27: 45 (1991)), альдегид (см., например, Harris et al. J. polim. Sci. Chem. Ed., 22: 341 (1984), патент США № 5824784, патент США № 5252714), малеимид (см., например, Goodson et al., Biotechnology (NY), 8: 343 (1990), Romani et al., in Chemistry of Peptides and Proteins, 2: 29 (1984)) и Kogan, Synthetic Comm., 22: 2417 (1992)), ортопиридилдисульфид (см., например, Woghiren, et al., Bioconj. Chem., 4: 314(1993)), акрилоил (см., например, Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), винилсульфон (см., например, патент США № 5900461). Все вышеперечисленные ссылки и патенты включены в описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах настоящего изобретения производные полимера настоящего изобретения включают основную цепь полимера, имеющую структуру



где X представляет собой функциональную группу, как раскрыто выше; и n принимает значения от около 20 до около 4000.

В других вариантах производные полимера настоящего изобретения включают основную полимерную цепь, имеющую следующую структуру:



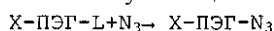
где W представляет собой алифатическую группу или ароматическую линкерную молекулу, включающую от 1 до 10 атомов углерода;

n принимает значения от около 20 до около 4000 и

X представляет собой функциональную группу, как раскрыто выше;

m принимает значения от 1 до 10.

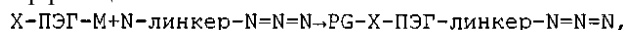
Азидосодержащие производные ПЭГ настоящего изобретения можно получить различными известными специалистам способами или здесь раскрытыми. В одном способе, раскрытом далее, водорастворимую основную полимерную цепь со средней молекулярной массой от около 800 до около 10000, причем основная полимерная цепь имеет первый конец, связанный с первой функциональной группой, и второй конец, связанный с подходящей отщепляемой группой, подвергают взаимодействию с азидным анионом (который может быть спарен с любым из числа подходящих противоионов, включая натрий, калий, трет-бутиламмоний и т.д.). Отщепляемая группа подвергается нуклеофильному замещению и заменяется азидной молекулой, в результате чего получают целевой азидосодержащий полимер ПЭГ.



Как показано, подходящая основная полимерная цепь, подходящая для использования в настоящем изобретении, имеет формулу X-ПЭГ-L, где ПЭГ представляет собой поли(этиленгликоль), и X представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с азидной группой, и L представляет собой подходящую отщепляемую группу. Примеры подходящих функциональных групп включают, без ограничения, гидроксил, защищенный гидроксил, ацеталь, алкенил, амин, аминокси, защищенный амин, защищенный гидразид, защищенный тиол, карбоновую кислоту, защищенную карбоновую кислоту, малеимид, дитиопиридин, винилпиридин и кетон. Примеры подходящих отщепляемых групп включают, без ограничения, хлорид, бромид, йодид, мезилат, трезилат и тозилат.

В другом способе получения производных азидосодержащего полимера по настоящему изобретению связывающий агент, содержащий азидную функциональность, подвергают взаимодействию с основной цепью водорастворимого полимера со средней молекулярной массой от около 800 до около 10000, где связывающий агент содержит химическую функциональность, которая селективно реагирует с химической функциональностью полимера ПЭГ, с образованием продукта производного азидосодержащего полимера, где азид отделен от основной полимерной цепи связывающей группой.

Далее приведен пример реакционной схемы:



где ПЭГ представляет собой поли(этиленгликоль);

X представляет собой кэппинг группу, такую как алкокси, или функциональную группу, как раскрыто выше;

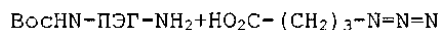
M представляет собой функциональную группу, которая не является реакционноспособной в отношении азидной функциональности, но которая эффективно и селективно реагирует с N функциональной группой.

Примеры подходящих функциональных групп включают, без ограничения, M, являющийся карбоновой кислотой, карбонатом или активным сложным эфиром, если N представляет собой амин; M, являющийся кетоном, если N представляет собой гидразид или аминокси молекулу; M, являющийся отщепляемой группой, если N представляет собой нуклеофил.

Очистку сырого продукта можно осуществить известными способами, включая, без ограничения, осаждение продукта с последующей хроматографической обработкой, при необходимости.



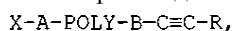
Далее представлен более специфический пример в случае ПЭГ диамина, в котором один из аминов защищен молекулой защитной группы, такой как трет-бутил-Вос, и полученный моно-защищенный ПЭГ диамин подвергают взаимодействию со связывающей молекулой, которая содержит азидную функциональность



В таком случае группа амина может быть присоединена к группе карбоновой кислоты, используя различные активирующие агенты, такие как тионилхлорид, или карбодиимидные реагенты и N-гидроксисукцинимид или N-гидроксibenзотриазол для создания амидной связи между моноаминсодержащим производным ПЭГ и азидосодержащей линкерной молекулой. После успешного создания амидной связи полученное N-трет-бутил-Вос-защищенное азидсодержащее производное можно использовать непосредственно для модификации биоактивной молекулы или его можно обработать далее, чтобы встроить другие полезные функциональные группы. Например, N-t-Вос группу можно гидролизовать, обрабатывая сильной кислотой до создания омега-амино-ПЭГ-азида. Полученный амин можно использовать как синтетический инструмент для встраивания других полезных функциональностей, таких как малеимидные группы, активированные дисульфиды, активированные сложные эфиры и т.д. для создания ценных гетеробифункциональных реагентов.

Гетеробифункциональные производные являются особенно полезными, если необходимо присоединить различные молекулы к каждому концу полимера. Например, омега-N-амино-N-азидо ПЭГ позволит осуществить присоединение молекулы, содержащей активированную электрофильную группу, такую как альдегид, кетон, активированный сложный эфир, активированный карбонат и т.д., к одному концу ПЭГ, и молекулу, содержащую ацетиленовую группу, к другому концу ПЭГ.

В другом варианте настоящего изобретения производное полимера имеет структуру



где R может быть или H или алкильной, алкенильной, алкокси либо арильной или замещенной арильной группой;

B представляет собой связывающую молекулу, которая может присутствовать или отсутствовать;

POLY представляет собой водорастворимый неантигенный полимер;

A представляет собой связывающую молекулу, которая может присутствовать или отсутствовать и которая может быть такой же как B или может отличаться от него; и

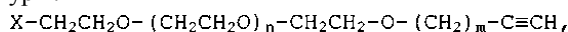
X представляет собой вторую функциональную группу.

Примеры связывающих молекул для A и B включают, без ограничения, многофункционализированную алкильную группу, содержащую вплоть до 18 атомов углерода и которая может содержать от 1 до 10 атомов углерода. Гетероатомы, такие как азот, кислород или сера, могут быть включены в алкильную цепь.

Алкильная цепь может также быть разветвленной у гетероатома. Другие примеры связывающих молекул для A и B включают, без ограничения, многофункционализированную арильную группу, содержащую вплоть до 10 атомов углерода, которая может содержать 5-6 атомов углерода. Арильная группа может быть замещена одним или более из атомов углерода, азота, кислорода или серы. Другие примеры подходящих связывающих групп включают связывающие группы, раскрытые в патентах США №№ 5932462 и 5643575 и опубликованной заявке на патент США 2003/0143596, которые включены в описание посредством ссылки. Специалистам в данной области должно быть понятно, что вышеприведенный список связывающих молекул никоим образом не является исчерпывающим и является только иллюстративным и что широкий круг связывающих молекул, обладающих раскрытыми выше свойствами, рассматривают как полезные для использования в настоящем изобретении.

Примеры подходящих функциональных групп для использования в качестве X включают гидроксил, защищенный гидроксил, алкоксил, активный сложный эфир, такой как N-гидроксисукцинимидильные сложные эфиры и 1-бензотриазолильные сложные эфиры, активный карбонат, такой как N-гидроксисукцинимидильные карбонаты и 1-бензотриазолильные карбонаты, ацеталь, альдегид, гидраты альдегидов, алкенил, акрилат, метакрилат, акриламид, активный сульфен, амин, аминокси, защищенный амин, гидразид, защищенный гидразид, защищенный тиол, карбоновую кислоту, защищенную карбоновую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, малеимид, винилсульфон, дитиопиридин, винилпиридин, иодоацетамид, эпоксид, глиоксали, дионы, мезилаты, тозилаты, и трезилат, алкен, кетон, и ацетилен. Следует понимать, что выбранная X молекула должна быть совместима с ацетиленовой группой таким образом, чтобы реакция с ацетиленовой группой не происходила. Производные ацетиленосодержащего полимера могут быть гомобифункциональными, что означает, что вторая функциональная группа (т.е. X) также представляет собой ацетиленовую молекулу, или могут быть гетеробифункциональными, что означает, что вторая функциональная группа является отличающейся функциональной группой.

В другом варианте настоящего изобретения производные полимера включают основную полимерную цепь следующей структуры:



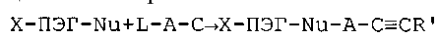
где X представляет собой функциональную группу, как раскрыто выше;

n принимает значения от около 20 до около 4000 и

m принимает значения от 1 до 10.

Специфические примеры каждого из гетеробифункциональных полимеров ПЭГ представлены далее.

Ацетиленсодержащие производные ПЭГ настоящего изобретения можно получить, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области и/или здесь раскрытые. В одном способе основную цепь водорастворимого полимера со средней молекулярной массой от около 800 до около 100000, где у основной полимерной цепи имеется первый конец, связанный с первой функциональной группой, и второй конец, связанный с подходящей нуклеофильной группой, подвергают взаимодействию с соединением, которое содержит как ацетиленовую функциональность, так и отщепляемую группу, которая является подходящей для реакции с нуклеофильной группой на ПЭГ. Если полимер ПЭГ, содержащий нуклеофильную молекулу и молекулу, содержащую отщепляемую группу, объединяют, отщепляемая группа претерпевает нуклеофильное замещение и заменяется нуклеофильной молекулой, что приводит к получению целевого ацетиленсодержащего полимера.



Как показано, предпочтительная основная полимерная цепь для использования в реакции имеет формулу X-ПЭГ-Nu,

где ПЭГ представляет собой поли(этиленгликоль);

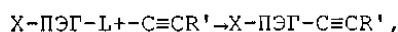
Nu представляет собой нуклеофильную молекулу и

X представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с Nu, L или ацетиленовой функциональностью.

Примеры Nu включают, без ограничения, амин, алкокси, арилокси, сульфгидрил, имино, карбоксилат, гидразид, аминокси группы, которые будут реагировать преимущественно по механизму SN2-типа. Дополнительные примеры Nu групп включают такие функциональные группы, которые будут реагировать преимущественно по типу реакции нуклеофильного присоединения. Примеры L групп включают хлорид, бромид, йодид, мезилат, трезилат и тозилат и другие группы, которые, как ожидают, будут претерпевать реакцию нуклеофильного замещения, также как кетоны, альдегиды, тиоэфиры, олефины, альфа-бета-ненасыщенные карбонильные группы, карбонаты и другие электрофильные группы, которые, как ожидают, будут претерпевать замещение нуклеофилами.

В других вариантах настоящего изобретения A представляет собой алифатический линкер, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, или замещенное арильное кольцо, содержащее от 6 до 14 атомов углерода. X представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с азидными группами, и L представляет собой подходящую отщепляемую группу.

В другом способе получения ацетиленсодержащих производных полимеров настоящего изобретения полимер ПЭГ со средней молекулярной массой от около 800 до около 100000, содержащий или защищенную функциональную группу либо кэппинг-агент на одном конце и подходящую отщепляемую группу на другом конце, подвергают взаимодействию с ацетиленовым анионом. Примерная схема реакции представлена далее



где ПЭГ представляет собой поли(этиленгликоль) и

X представляет собой кэппинг-группу, такую как алкокси или функциональную группу, как раскрыто выше; и

R' представляет собой или H, алкильную, алкоксильную, арильную или арилоксигруппу или замещенную алкильную, алкоксильную, арильную или арилоксигруппу.

В приведенном выше примере отщепляемая группа L должна быть достаточно реакционноспособной, чтобы претерпеть замещение SN2-типа при контактировании с достаточной концентрацией ацетиленового аниона. Условия реакции, необходимые для осуществления SN2 замещения отщепляемой группы ацетиленовыми анионами, хорошо известны специалистам в данной области.

Очистку сырого продукта обычно осуществляют способами, известными специалистам, включая, без ограничения, осаждение продукта с последующей хроматографической обработкой, при необходимости.

Водорастворимые полимеры можно связать с полипептидами bG-CSF настоящего изобретения. Водорастворимые полимеры можно связать через не кодируемую в природе аминокислоту, встроенную в полипептид bG-CSF, или любую функциональную группу, или заместитель не кодируемой в природе или кодируемой в природе аминокислоты, или любую функциональную группу или заместитель, добавленные к не кодируемой в природе или кодируемой в природе аминокислоте. Альтернативно, водорастворимые полимеры связывают с полипептидом bG-CSF со встроенной не кодируемой в природе аминокислотой через природную аминокислоту (включая, без ограничения, цистеин, лизин или группу амина N-терминального остатка). В некоторых случаях полипептиды bG-CSF настоящего изобретения включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 природных аминокислот, где одна или более из не кодируемых в природе аминокислот связаны с водорастворимым полимером (полимерами), (включая, без ограничения, ПЭГ и/или олигосахариды). В некоторых случаях полипептиды bG-CSF настоящего изобретения включают далее 1,

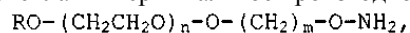
2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше кодируемых в природе аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. В некоторых случаях полипептиды bG-CSF настоящего изобретения включают одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами, и одну или более из природных аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. В некоторых вариантах водорастворимые полимеры, используемые в настоящем изобретении, увеличивают время полужизни полипептидов bG-CSF по сравнению с неконъюгированной формой.

Количество водорастворимых полимеров, связанных с полипептидом bG-CSF (т.е. степень ПЭГилирования или гликозилирования) настоящего изобретения, можно установить таким образом, чтобы они не изменяли (включая, без ограничения, улучшение или ухудшение) фармакологических, фармакокинетических или фармакодинамических характеристик, таких как *in vivo* время полужизни. В некоторых вариантах время полужизни bG-CSF увеличивается по меньшей мере на около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, 2-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 11-кратно, 12-кратно, 13-кратно, 14-кратно, 15-кратно, 16-кратно, 17-кратно, 18-кратно, 19-кратно, 20-кратно, 25-кратно, 30-кратно, 35-кратно, 40-кратно, 50-кратно или по меньшей мере около 100-кратно по сравнению с немодифицированным полипептидом.

Производные ПЭГ, содержащие сильную нуклеофильную группу (т.е. гидразид, гидразин, гидроксилламин или семикарбазид).

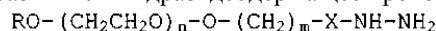
В одном варианте настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, модифицирован производным ПЭГ, которое содержит терминальную гидразиновую, гидроксилламиновою, гидразидную или семикарбазидную молекулу, которая связана непосредственно с основной цепью ПЭГ.

В некоторых вариантах гидроксилламинтерминальное производное ПЭГ имеет структуру



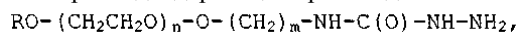
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10 и n принимает значения 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса находится между 5-40 кДа).

В некоторых вариантах гидразин- или гидразидсодержащее производное ПЭГ имеет структуру



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10, n принимает значения 100-1000 и X представляет собой необязательно карбонильную группу (C=O), которая может присутствовать или отсутствовать.

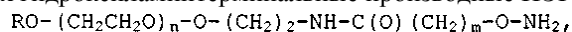
В некоторых вариантах семикарбазидсодержащее производное ПЭГ имеет структуру



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10 и n принимает значения 100-1000.

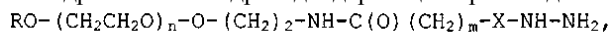
В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, модифицирован производным ПЭГ, которое содержит терминальную гидроксилламиновою, гидразидную, гидразиновую или семикарбазидную молекулу, которая связана с основной цепью ПЭГ амидной связью.

В некоторых вариантах гидроксилламинтерминальные производные ПЭГ имеют структуру



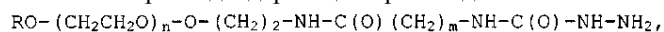
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10 и n принимает значения 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса находится между 5-40 кДа).

В некоторых вариантах гидразин- или гидразидсодержащие производные ПЭГ имеют структуру



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10, n принимает значения 100-1000 и X представляет собой необязательно карбонильную группу (C=O), которая может присутствовать или отсутствовать.

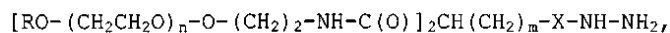
В некоторых вариантах семикарбазидсодержащие производные ПЭГ имеют структуру



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10 и n принимает значения 100-1000.

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, модифицирован разветвленным производным ПЭГ, которое содержит терминальную гидразиновую, гидроксилламиновою, гидразидную или семикарбазидную молекулу, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ имеет ММ в интервале 10-40 кДа и возможно 5-20 кДа.

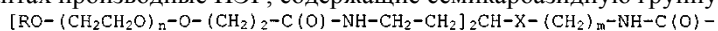
В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий не кодируемую в природе аминокислоту, модифицирован производным ПЭГ с разветвленной структурой. Например, в некоторых вариантах гидразин- или гидразидтерминальное производное ПЭГ имеет следующую структуру:



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); m принимает значения 2-10 и n принимает значения 100-1000; X представляет собой необязательно карбонильную группу (C=O), кото-

рая может присутствовать или отсутствовать.

В некоторых вариантах производные ПЭГ, содержащие семикарбазидную группу, имеют структуру



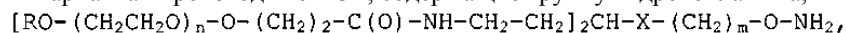
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

X представляет собой необязательно NH, O, S, C(O) или отсутствует;

m принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000.

В некоторых вариантах производные ПЭГ, содержащие группу гидроксилamina, имеют структуру



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.); X представляет собой необязательно NH, O, S, C(O) или отсутствует; m принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000.

Порядок и сайты, в которых водорастворимый полимер (полимеры) связаны с полипептидом bG-CSF, могут модулировать связывание полипептида bG-CSF с рецептором. В некоторых вариантах связи организованы таким образом, что полипептид bG-CSF связывает рецептор с  $K_d$  около 400 нМ или меньше, с  $K_d$  150 нМ или меньше и в некоторых случаях с  $K_d$  100 нМ или меньше по данным анализа равновесного связывания, как раскрыто у Spencer et al., J. Biol. Chem., 263: 7862-7867 (1988).

Методы и реакции для активации полимеров, также как для конъюгирования полипептидов, раскрыты в литературе и известны специалистам. Обычно используемые методы активации полимеров включают, без ограничения, активацию функциональных групп цианогенбромидом, периодатом, глутаральдегидом, биэпоксидами, эпихлоргидрином, дивинилсульфоном, карбодиимидом, сульфонил галогенидами, трихлортриазином и т.д. (см. R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL and APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION and CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G.T. Hermanson et al. (1993), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., et al., Eds. POLYMERIC DRUGS and DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series, Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C., 1991).

Доступны некоторые обзоры и монографии, относящиеся к функционализации и конъюгированию ПЭГ; см., например, Harris, Macromol. Chem. Phys., C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong et al., Enzyme Microb. Technol., 14: 866-874 (1992); Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem., 6: 150-165 (1995).

Методы активации полимеров можно также найти в WO 94/17039, патенте США № 5324844, WO 94/18247, WO 94/04193, патенте США № 5219564, патенте США № 5122614, WO 90/13540, патенте США № 5281698 и WO 93/15189 и для конъюгирования между активированными полимерами и ферментами, включая, без ограничения, фактор коагуляции VIII (WO 94/15625), гемоглобин (WO 94/09027), молекулы, содержащие кислород (патент США № 4412989), рибонуклеазу и супероксиддисмутазу (Veronese et al., App. Biochem. Biotech., 11: 141-52 (1985)). Все ссылки и цитированные патенты включены в описание посредством ссылки.

ПЭГилирование (т.е. присоединение любого водорастворимого полимера) полипептидов bG-CSF, содержащих не кодируемую в природе аминокислоту, таких как п-азидо-L-фенилаланин, осуществляют обычным способом. Например, полипептид bG-CSF ПЭГилируют алкил-терминированным производным m-ПЭГ. Короче, при перемешивании добавляют избыток твердого m-ПЭГ(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C=CH к водному раствору п-азидо-L-Phe-содержащему полипептиду bG-CSF при комнатной температуре. Обычно водный раствор буферируют буфером с  $pK_a$  около pH и при этом значении ведут реакцию (обычно около pH 4-10). Примеры подходящих буферов для ПЭГилирования при pH 7,5, например, включают, без ограничения, HEPES, фосфат, борат, TRIS-HCl, EPPS и TES. Величину pH непрерывно контролируют и, при необходимости, корректируют. Реакцию обычно ведут в течение 1-48 ч.

Затем продукт реакции обрабатывают, используя хроматографию гидрофобных взаимодействий для отделения вариантов ПЭГилированного полипептида bG-CSF от свободного m-ПЭГ(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C=CH и любых высокомолекулярных комплексов ПЭГилированного полипептида bG-CSF, которые могут образовываться, если неблокированный ПЭГ активируют с обоих концов молекулы, тем самым вызывая сшивку молекул вариантов полипептида bG-CSF. Условия во время хроматографии гидрофобных взаимодействий таковы, чтобы свободные m-ПЭГ(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C=CH проходили бы через колонку, тогда как все комплексы сшитых вариантов ПЭГилированных полипептидов bG-CSF элюировались бы после искомым форм, которые содержат одну молекулу варианта полипептида bG-CSF, конъюгированную с одной или более из ПЭГ групп. Подходящие условия варьируются в зависимости от относительных размеров сшитых комплексов и нужных конъюгатов, и их легко могут определить специалисты в данной области. Элюент, содержащий искомые конъюгаты, концентрируют, используя ультрафильтрацию и обессоливают с помощью диализации.

При необходимости, ПЭГилированный полипептид bG-CSF, полученный после обработки с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий, можно далее очистить, используя одну или более из процедур, известных специалистам в данной области, включая, без ограничения, аффинную хроматогра-

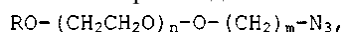
фию; анионо- или катионообменную хроматографию (используя, включая, без ограничения, DEAE SEPHAROSE); хроматографию на двуокиси кремния; ВЭЖХ с обращенной фазой; гель-фильтрацию (используя, включая, без ограничения, SEPHADEX G-75); хроматографию гидрофобных взаимодействий; хроматографию с исключением по размерам, металл-хелатную хроматографию; ультрафильтрацию/диафильтрацию; осаждение этанолом; осаждение сульфатом аммония; хроматофокусирование; вытеснительную хроматографию; электрофоретические процедуры (включая, без ограничения, препаративное изоэлектрическое фокусирование); дифференциальную растворимость (включая, без ограничения, осаждение сульфатом аммония) или экстракцию. Кажущуюся молекулярную массу можно оценить с помощью GPC, сравнивая глобулярные белковые стандарты (Preneta, A.Z. in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press, 1989, 293-306). Степень чистоты bG-CSF-ПЭГ конъюгатов можно оценить с помощью протеолитического разложения (включая, без ограничения, расщепление трипсином) с последующим масс-спектрометрическим анализом; Pepinsky R.B., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 297(3); 1059-66 (2001).

Водорастворимый полимер, связанный с аминокислотой полипептида bG-CSF настоящего изобретения, можно далее дериватизировать или осуществить замещения без ограничений.

Азидосодержащие производные ПЭГ.

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF модифицируют, используя производное ПЭГ, которое содержит азидную молекулу, которая будет реагировать с алкинской молекулой, расположенной на боковой цепи не кодируемой в природе аминокислоты. Обычно производные ПЭГ имеют среднюю молекулярную массу в интервале 1-100 кДа и в некоторых вариантах от 10 до 40 кДа.

В некоторых вариантах азидтерминальное производное ПЭГ имеет структуру

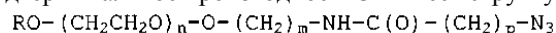


где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса находится в интервале 5-40 кДа).

В других вариантах азидтерминальное производное ПЭГ имеет структуру



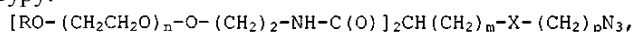
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10;

p принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса находится в интервале 5-40 кДа).

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий алкинсодержащую аминокислоту, модифицируют разветвленным производным ПЭГ, которое содержит терминальную азидную молекулу, причем каждая из цепей разветвленного ПЭГ имеет ММ в интервале 10-40 кДа и может быть в интервале 5-20 кДа. Например, в некоторых вариантах азидтерминальное производное ПЭГ имеет следующую структуру:



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10;

p принимает значения 2-10;

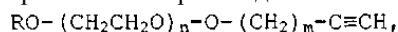
n принимает значения 100-1000 и

X представляет собой необязательно O, N, S или карбонильную группу (C=O), которые в каждом случае могут присутствовать или отсутствовать.

Алкинсодержащие производные ПЭГ.

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF модифицируют производным ПЭГ, которое содержит алкинную молекулу, которая будет реагировать с азидной молекулой, присутствующей на боковой цепи не кодируемой в природе аминокислоты.

В некоторых вариантах алкилтерминальное производное ПЭГ имеет следующую структуру:



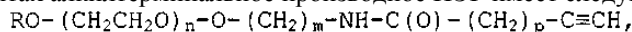
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса находится в интервале 5-40 кДа).

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий алкинсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, модифицируют производным ПЭГ, которое содержит терминальную азидную или терминальную алкинную молекулу, которые связаны с основной цепью ПЭГ амидной связью.

В некоторых вариантах алкилтерминальное производное ПЭГ имеет следующую структуру:



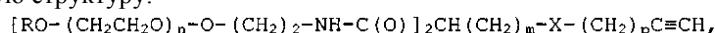
где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10;

p принимает значения 2-10 и

n принимает значения 100-1000.

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий азидосодержащую аминокислоту, модифицируют разветвленным производным ПЭГ, которое содержит терминальную алкильную молекулу, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ имеет ММ в интервале значений 10-40 кДа и может быть в интервале 5-20 кДа. Например, в некоторых вариантах алкилтерминальное производное ПЭГ имеет следующую структуру:



где R представляет собой низший алкил (метил, этил, пропил и т.д.);

m принимает значения 2-10;

p принимает значения 2-10;

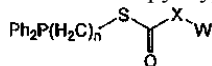
n принимает значения 100-1000 и

X представляет собой необязательно O, N, S или карбонильную группу (C=O) или отсутствует.

Фосфинсодержащие производные ПЭГ.

В других вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF модифицируют производным ПЭГ, которое содержит активированную функциональную группу (включая, без ограничения, сложноэфирную, карбонатную) и включает далее арилфосфиновую группу, которая будет реагировать с азидной молекулой, присутствующей на боковой цепи не кодируемой в природе аминокислоты. Обычно производные ПЭГ имеют среднюю молекулярную массу в интервале 1-100 кДа и в некоторых вариантах в интервале 10-40 кДа.

В некоторых вариантах производное ПЭГ имеет структуру



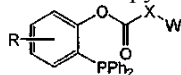
если n принимает значения 1-10;

X может быть O, N, S или может отсутствовать;

Ph представляет собой фенил и

W представляет собой водорастворимый полимер.

В некоторых вариантах производное ПЭГ имеет структуру



где X может быть O, N, S или может отсутствовать; Ph представляет собой фенил; W представляет собой водорастворимый полимер и R представлять собой H, алкильную, арильную, замещенную алкильную и замещенную арильную группы. Примеры R групп включают, без ограничения, -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -галоген, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN и -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' и R''', каждый независимо, обозначает водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, без ограничения, арил замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиоалкоксигруппы или арилалкильные группы. Если соединение настоящего изобретения включает более чем одну R группу, например, каждую из R групп независимо выбирают как каждую R', R'', R''' и R'''' группу, если присутствует более чем одна из этих групп. Если R' и R'' присоединены к одному и тому же атому азота, взятые вместе с атомом азота они могут образовывать 5-, 6- или 7-членное кольцо. Например, подразумевается, что -NR'R'' включает, без ограничения, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей специалисту в данной области должно быть понятно, что термин "алкил" включает группы, включающие атомы углерода, связанные с группами, которые отличаются от водородных групп, такие как галогеноалкил (включая, без ограничения, -CF<sub>3</sub> и -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) и ацил (включая, без ограничения, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> и т.п.).

Другие производные ПЭГ и общие способы ПЭГилирования.

Другие примеры ПЭГ молекул, которые могут быть связаны с полипептидами bG-CSF, также как методики ПЭГилирования, включают, без ограничения, те, что раскрыты, например, в патентных публикациях США и в патентах США №№ 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/008 6939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0021763; 6646110; 5824778; 5476653; 5219564; 5629384; 5736625; 4902502; 5281698; 5122614; 5473034; 5516673; 5382657; 6552167; 6610281; 6515100; 6461603; 6436386; 6214966; 5990237; 5900461; 5739208; 5672662; 5446090; 5808096; 5612460; 5324844; 5252714; 6420339; 6201072; 6451346; 6306821; 5559213; 5747646; 5834594; 5849860; 5980948; 6004573; 6129912; WO 97/32607, EP 229108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605963, EP 510356, EP 400472, EP 183503 и EP 154316, которые включены в описание посредством ссылки. Любые из раскрытых здесь молекул ПЭГ можно использовать в любой форме, включая, без ограничения, простую цепь,

разветвленную цепь, многоплечую цепь, однофункциональную цепь, бифункциональную цепь, многофункциональные цепи или любые их комбинации.

Дополнительный полимер и производные ПЭГ, включая, без ограничения, гидроксилмин(аминоксид) производные ПЭГ, раскрыты в следующих патентных публикациях, которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте: патентная публикация США № 2006/0194256, патентная публикация США № 2006/0217532, патентная публикация США № 2006/0217289, предварительная заявка на патент США № 60/755338; предварительная заявка на патент США № 60/755711; предварительная заявка на патент США № 60/755018; международная заявка на патент PCT/US06/49397; WO 2006/069246; предварительная заявка на патент США № 60/743041; предварительная заявка на патент США № 60/743040; международная заявка на патент № PCT/US06/47822; предварительная заявка на патент США № 60/882819; предварительная заявка на патент США № 60/882500 и предварительная заявка на патент США № 60/870594.

Гетерологичные слитые белки Fc.

Раскрытые выше bG-CSF соединения можно слить непосредственно или через пептидный линкер с Fc-участком иммуноглобулина. Иммуноглобулины представляют собой молекулы, содержащие полипептидные цепи, удерживаемые вместе дисульфидными связями, обычно содержащие две легкие цепи и две тяжелые цепи. В каждой цепи один домен (V) содержит вариабельную аминокислотную последовательность, зависящую от специфичности антитела в отношении указанной молекулы. Другие домены (C) имеют скорее постоянные последовательности, общие для молекул того же класса.

Fc-участок иммуноглобулина имеет значение, обычно присущее указанному термину в области иммунологии. Более конкретно указанный термин относится к фрагменту антитела, который получают, удаляя два антиген-связывающих участка (Fab фрагменты) из антитела. Одним способом удаления указанных Fab фрагментов является переваривание иммуноглобулина протеазой папаина. Так, Fc-участок образован из фрагментов примерно равного размера постоянного участка из обеих тяжелых цепей, которые ассоциированы в результате нековалентных взаимодействий и дисульфидных связей. Fc-участок может включать шарнирные участки и простирается через CH2 и CH3 домены к C-концу антитела. Представительные шарнирные участки человеческого и мышечного иммуноглобулинов можно найти в *Antibody Engineering, A Practical Guide*, Vorebaeck, C.A.K., ed., W.H. Freeman и Co., 1992, содержание которых включено в описание посредством ссылки. Fc-участок может включать далее один или более из сайтов гликозилирования. Аминокислотные последовательности множества репрезентативных Fc-белков, содержащих шарнирный участок, CH2 и CH3 домены и один сайт N-гликозилирования, хорошо известны специалистам.

Существует пять типов Fc-участков человеческого иммуноглобулина с различными эффекторными функциями и фармакокинетическими свойствами: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. IgG представляет собой наиболее распространенный иммуноглобулин в сыворотке. IgG отличается также самым длительным временем полужизни в сыворотке из всех иммуноглобулинов (23 дня). В отличие от других иммуноглобулинов IgG эффективно циркулирует после связывания с Fc-рецептором. Существует четыре IgG подкласса G1, G2, G3 и G4, каждый из которых имеет отличающиеся эффекторные функции. G1, G2 и G3 могут связывать C1q и фиксировать комплемент, тогда как G4 не может. Даже хотя G3 способен связывать C1q более эффективно, чем G1, G1 более эффективен в опосредовании комплемент-направленного клеточного лизиса. G2 фиксирует комплемент весьма неэффективно. Сайт связывания C1q в IgG расположен у карбокситерминального участка CH2 домена.

Все подклассы IgG способны связываться с Fc-рецепторами (CD16, CD32, CD64), причем G1 и G3 более эффективны, чем G2 и G4. Участок связывания Fc-рецептора в IgG образован остатками, расположенными как в шарнирном, так и в карбокситерминальном участках CH2 домена.

IgA может существовать как в мономерной, так и в димерной формах, удерживаемых вместе J-цепью. IgA является вторым из наиболее распространенных Ig в сыворотке, но его время полужизни составляет всего 6 дней. IgA имеет три эффекторные функции. Он связывается со специфическим рецептором IgA на макрофагах и эозинофилах, которые управляют фагоцитозом и дегрануляцией соответственно. Он также может фиксировать комплемент через неизвестную альтернативную схему.

IgM экспрессируется или как пентамер, или как гексамер, причем оба они удерживаются вместе J-цепью. Время полужизни IgM в сыворотке составляет 5 дней. Он слабо связывается с C1q через сайт связывания, расположенный в его CH3 домене. Время полужизни IgD в сыворотке составляет 3 дня. Остается неясным, какие эффекторные функции приписаны указанному Ig. IgE является мономерным Ig и его время полужизни в сыворотке составляет 2,5 дня. IgE связывается с двумя Fc-рецепторами, которые управляют дегрануляцией, и приводит к выделению провоспалительных агентов.

В зависимости от желательных *in vivo* эффектов гетерологичные слитые белки по настоящему изобретению могут содержать любой из раскрытых выше изотипов или могут содержать мутировавшие Fc-участки, где были изменены функции связывания комплемента и/или Fc-рецептора. Так, гетерологичные слитые белки по настоящему изобретению могут содержать полный Fc-участок иммуноглобулина, фрагменты Fc-участка иммуноглобулина или их аналоги, слитые с соединением bG-CSF.

Слитые белки по настоящему изобретению могут состоять из одноцепочечных белков или быть

мультицепными полипептидами. Два или более из Fc слитых белков можно получить так, что они будут взаимодействовать через дисульфидные связи, которые естественно образуются между Fc-участками. Такие мультимеры могут быть гомогенными в отношении соединения bG-CSF или они могут содержать различные соединения bG-CSF, слитые по N-концу Fc-участка слитого белка.

Независимо от окончательной структуры слитого белка Fc или Fc-подобный участок может служить пролонгированию *in vivo* в плазме времени полужизни bG-CSF соединения слитого по N-концу. Также компонент bG-CSF соединения слитого белка сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность bG-CSF. Увеличение времени терапевтической или циркуляционной полужизни можно продемонстрировать, используя раскрытый здесь способ или способ, известный специалистам, где время полужизни слитого белка сравнивают с периодом полужизни одного только соединения bG-CSF. Биологическую активность можно определить *in vitro* и *in vivo* методами, известными специалистам.

Так как Fc-участок IgG, полученный в результате протеолиза, имеет тот же самый *in vivo* время полужизни, что и интактная IgG молекула, и Fab фрагменты быстро деградируют, считают, что соответствующая последовательность для пролонгирования времени полужизни находится в CH2 и/или CH3 доменах. Кроме того, в литературе было показано, что скорости катаболизма вариантов IgG, которые не связывают высокоаффинный Fc-рецептор или C1q, неразличимы со скоростью клиренса родительского дикого типа антитела, указывая на то, что катаболический сайт отличается от сайтов, включенных в Fc-рецептор или C1q связывания [Wawtzynczak et al. (1992), *Molecular Immunology*, 29: 221]. Исследования сайт-направленного мутагенеза с использованием Fc-участка мышинового IgG1 позволили предположить, что сайт Fc-участка, который контролирует скорость катаболизма, расположен у интерфейса CH2-CH3 домена. Fc-участки можно модифицировать по катаболическому сайту, чтобы оптимизировать время полужизни слитых белков. Fc-участок, используемый для слитых белков по настоящему изобретению, можно получить из IgG1 или Fc-участка IgG4 и он может содержать как CH2, так и CH3 участки, включая шарнирный участок.

Гетерологичные слитые белки альбумина.

Описанные здесь bG-CSF можно слить непосредственно или через пептидный линкер, водорастворимый полимер или пролекарственный линкер с альбумином или его аналогом, фрагментом или его производным. Вообще белки альбумина, которые являются частью слитых белков по настоящему изобретению, можно получить из альбумина, клонированного из любых видов, включая человека. Человеческий сывороточный альбумин (HSA) состоит из одной негликозилированной полипептидной цепи из 585 аминокислот с формульной молекулярной массой 66500. Аминокислотная последовательность человеческого HSA известна [см. Meloun, et al. (1975), *FEBS Letters*, 58:136; Behrens, et al. (1975), *Fed. Proc.*, 34: 591; Lawn, et al. (1981), *Nucleic Acids Research*, 9: 6102-6114; Minghetti, et al. (1986), *J. Biol. Chem.*, 261: 6747, причем все они включены в описание посредством ссылки]. Были раскрыты различные полиморфные варианты, также как аналоги и фрагменты альбумина [см. Weitkamp, et al. (1973), *Ann. Hum. Genet.*, 37: 219]. Например, в EP 322094 различны более короткие формы HSA. Раскрыты некоторые из указанных фрагментов HSA, включая HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) и HSA(1-419) и фрагменты между 1-369 и 1-419. В EP 399666 раскрыты фрагменты альбумина, которые включают HSA(1-177) и HSA(1-200) и фрагменты между HSA(1-177) и HSA(1-200).

Следует понимать, что гетерологичные слитые белки по настоящему изобретению включают bG-CSF соединения, которые соединены с любым белком альбумина, включая фрагменты, аналоги и производные, где такой слитой белок биологически активен и имеет более длительное время полужизни в плазме, чем одно только соединение bG-CSF. Так, альбуминная часть слитого белка необязательно должна иметь время полужизни в плазме, равное периоду нативного человеческого альбумина. Фрагменты, аналоги и производные известны или их можно создать таким образом, чтобы их время полужизни было больше или находилось между соответствующими временами полужизни нативного человеческого альбумина и представляющего интерес bG-CSF соединения.

Гетерологичные слитые белки по настоящему изобретению охватывают белки, содержащие замещения консервативных аминокислот в соединении bG-CSF и/или Fc или часть альбумина слитого белка. "Консервативное замещение" представляет собой замещение аминокислоты другой аминокислотой, которая имеет тот же суммарный электронный заряд и приблизительно такой же размер и форму. Аминокислоты с боковыми цепями с алифатическими или замещенными алифатическими аминокислотами имеют приблизительно одинаковый размер, если полное число атомов углерода и гетероатомов в их боковых цепях отличается не более чем примерно на четыре. Они имеют приблизительно одинаковую форму, если число ветвей в их боковых цепях отличается не более чем на единицу. Считают, что аминокислоты с фенильными или замещенными фенильными группами в их боковых цепях имеют примерно одинаковый размер и форму. За исключением тех случаев, специально предусмотренных в настоящем документе, консервативные замещения предпочтительно осуществляют природными аминокислотами.

Белки альбумина и иммуноглобулина дикого типа можно получить из различных источников. Например, такие белки можно получить из кДНК библиотеки, полученной из ткани или из клеток, которые экспрессируют представляющие интерес мРНК на детектируемом уровне. Библиотеки можно скринировать с помощью зондов, сконструированных с использованием опубликованных последовательностей



ДНК или белков для конкретного, представляющего интерес, белка. Например, константные участки легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина раскрыты у Adams, et al. (1980), *Biochemistry*, 19: 2711-2719; Goughet, et al. (1980), *Biochemistry*, 19: 2702-2710; Dolby, et al. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6027-6031; Rice et al. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7862-7862; Falkner, et al. (1982), *Nature*, 298: 286-288 и Morrison, et al. (1984), *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 239-256. Некоторые ссылки, раскрывающие белки и ДНК последовательности альбумина, включают Meloun, et al. (1975), *FEBS Letters*, 58: 136; Behrens, et al. (1975), *Fed. Proc.*, 34: 591; Lawn, et al. (1981), *Nucleic Acids Research*, 9: 6102-6114 и Minghetti, et al. (1986), *J. Biol. Chem.*, 261: 6747.

Характеризация гетерологичных слитых белков по настоящему изобретению.

Существуют многочисленные методы характеристики слитых белков по настоящему изобретению. Некоторые из указанных методов включают, без ограничения, SDS-PAGE, объединенный с методами окрашивания белков, или иммуноблоттинг с использованием анти-IgG или анти-HSA антител. Другие методы включают, например, масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием матрицы (MALDI-MS), жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию, изоэлектрическое фокусирование, аналитический анионообмен, хроматофокусировку и круговой дихроизм.

Повышение аффинности сывороточного альбумина.

Различные молекулы можно также слить с полипептидами bG-CSF по настоящему изобретению, чтобы модулировать время полужизни полипептидов bG-CSF в сыворотке. В некоторых вариантах молекулы связывают или сливают с полипептидами bG-CSF по настоящему изобретению для повышения аффинности эндогенного сывороточного альбумина у животного.

Например, в некоторых случаях осуществляют рекомбинантное слияние полипептида bG-CSF и связывающей последовательности альбумина. Примеры связывающей последовательности альбумина включают, без ограничения, связывающий домен альбумина из стрептококкового белка G (см., например, Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277: 534-542 (1996) и Sjolander et al., *J. Immunol. Methods*, 201: 115-123 (1997)) или связывающие альбумин пептиды, такие как те, что раскрыты, например, у Dennis, et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 35035-35043 (2002).

В других вариантах полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению ацилируют жирными кислотами. В некоторых случаях жирные кислоты промотируют связывание с сывороточным альбумином; см., например, Kurtzhals, et al., *Biochem. J.*, 312: 725-731 (1995).

В других вариантах полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению сливают непосредственно с сывороточным альбумином (включая, без ограничения, человеческий сывороточный альбумин). Специалистам в данной области должно быть понятно, что широкий круг других молекул также можно связать с bG-CSF в настоящем изобретении, чтобы модулировать связывание с сывороточным альбумином или другими сывороточными компонентами.

Х. Гликозилирование полипептидов bG-CSF.

Настоящее изобретение включает полипептиды bG-CSF, включающие одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, содержащих сахаридные остатки. Сахаридные остатки могут быть или природными (включая, без ограничения, N-ацетилглюкозамин) или неприродными (включая, без ограничения, 3-фторгалактозу). Указанные сахариды могут быть связаны с не кодируемыми в природе аминокислотами или N- или O-связанной гликозидной связью (включая, без ограничения, N-ацетилгалактоза-L-серин) или неприродной связью (включая, без ограничения, оксим или соответствующие C- или S-связанные гликозиды).

Сахаридные (включая, без ограничения, гликозил) молекулы можно добавлять к полипептидам bG-CSF или *in vivo*, или *in vitro*. В некоторых вариантах по настоящему изобретению полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, модифицируют производным сахара с аминооксигруппой, чтобы создать соответствующий гликозилированный полипептид, связанный через оксимную связь. После присоединения к не кодируемой в природе аминокислоте указанный сахарид можно далее освободить путем обработки гликозилтрансферазой и другими ферментами для создания олигосахаридной связи с bG-CSF; см., например, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 1702-1703 (2003).

В некоторых вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, модифицируют непосредственно гликаном определенной структуры, полученным как аминоксипроизводное. Специалистам в данной области должно быть понятно, что другие функциональности, включая азид, алкин, гидразид, гидразин и семикарбазид, можно использовать для связывания сахара с не кодируемой в природе аминокислотой.

В некоторых вариантах настоящего изобретения полипептид bG-CSF, включающий азид- или алкилсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, можно затем модифицировать, включая, без ограничения, [3+2] реакцию циклоприсоединения Хьюсена с, включая, без ограничения, алкинил- или азидопроизводные соответственно. Указанный способ позволяет модифицировать белки с чрезвычайно высокой селективностью.

### XI. Димеры и мультимеры bG-CSF.

В настоящем изобретении также предложены комбинации bG-CSF и bG-CSF аналогов, такие как гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры или гетеромультимеры (т.е. тримеры, тетрамеры и т.д.), где bG-CSF, содержащий одну или более из не кодируемых в природе аминокислот, связывают с другим bG-CSF или вариантом bG-CSF либо с любым другим полипептидом, который не является bG-CSF или вариантом bG-CSF, или непосредственно с основной цепью полипептида либо через линкер. Благодаря увеличенной молекулярной массе по сравнению с мономерами димерные или мультимерные конъюгаты bG-CSF могут демонстрировать новые или искомые свойства, включая, без ограничения, различные фармакологические, фармакокинетические, фармакодинамические свойства, модулированное терапевтическое время полужизни или модулированное время полужизни в плазме по сравнению с характеристиками для мономерного bG-CSF. В некоторых вариантах bG-CSF димеры по настоящему изобретению модулируют сигнал трансдукции рецептора G-CSF. В других вариантах димеры или мультимеры bG-CSF по настоящему изобретению действуют как рецепторные антагонисты, агонисты или модуляторы.

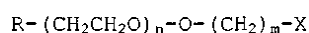
В некоторых вариантах одна или более из молекул bG-CSF, присутствующих в bG-CSF, содержащем димер или мультимер, включает не кодируемую в природе аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером.

В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF связывают непосредственно, включая, без ограничения, через Asn-Lys амидную связь или Cys-Cys дисульфидную связь. В некоторых вариантах полипептиды bG-CSF и/или связанные не bG-CSF молекулы включают различные не кодируемые в природе аминокислоты для облегчения димеризации, включая, без ограничения, алкин в одной не кодируемой в природе аминокислоте первого полипептида bG-CSF и азид во второй не кодируемой в природе аминокислоте второй молекулы, конъюгируют с помощью [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена. Альтернативно, bG-CSF и/или связанную не bG-CSF молекулу, включающую кетонсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, можно конъюгировать со вторым полипептидом, включающим гидроксилламинсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, и полипептиды реагируют через образование соответствующего оксима.

Альтернативно, два полипептида bG-CSF и/или связанную не bG-CSF молекулу связывают через линкер. Можно использовать любые гетеро- или гомобифункциональные линкеры для связывания двух молекул и/или связанных не bG-CSF молекул, которые могут содержать одинаковые или различные первичные последовательности. В некоторых случаях линкер, использованный для связывания bG-CSF и/или связанной не bG-CSF молекулы вместе, может быть бифункциональным реагентом ПЭГ. Молекулярная масса или длина линкера может меняться в широком интервале значений. Линкеры с большей или меньшей молекулярными массами линкеров можно использовать для обеспечения необходимого пространственного положения или конформации между bG-CSF и связанным объектом или между bG-CSF и его рецептором либо между связанным объектом и его связывающим партнером, если он присутствует. Более длинные или более короткие линкеры можно также использовать для обеспечения необходимого пространственного положения или гибкости между bG-CSF и связанным объектом или между связанным объектом и его связывающим партнером, если он присутствует.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предложены водорастворимые бифункциональные линкеры, которые имеют строение гантели, которые включают а) азид, алкин, гидразин, гидразид, гидроксилламин или карбонилсодержащую молекулу, по меньшей мере, на первом конце основной полимерной цепи, и б) по меньшей мере, вторую функциональную группу на втором конце основной полимерной цепи. Вторая функциональная группа может быть такой же, как первая функциональная группа, или может отличаться от нее. Вторая функциональная группа в некоторых вариантах является нереакционноспособной в отношении первой функциональной группы. В настоящем изобретении предложены в некоторых вариантах водорастворимые соединения, которые включают по меньшей мере одну ветвь разветвленной молекулярной структуры. Например, разветвленной молекулярной структурой может быть дендритная структура.

В некоторых вариантах настоящего изобретения предложены мультимеры, включающие один или более из полипептидов bG-CSF, образованных в реакции с водорастворимыми активированными полимерами, которые имеют структуру



где n принимает значения от около 5 до 3000; m принимает значения 2-10; X может представлять собой азид, алкин, гидразин, гидразид, аминоксигруппу, гидроксилламин, ацетил или карбонилсодержащую молекулу и R представляет собой кэспирующую группу, функциональную группу или отщепляемую группу, которые могут быть одинаковыми с X или могут отличаться. R может быть, например, функциональной группой, выбранной из группы, состоящей из гидроксила, защищенного гидроксила, алкоксила, сложного эфира N-гидроксисукцинимидила, сложного эфира 1-бензотриазолила, N-гидроксисукцинимидилкарбоната, 1-бензотриазолилкарбоната, ацетала, альдегида, гидратов альдегидов, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, активного сульфена, амина, аминокси, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, защищенного тиола, карбоновой кислоты, защищенной карбоновой кислоты, изоцианата, изотиоцианата, малеимида, винилсульфона, дитиопиридина, винилпири-

дина, иодоацетамида, эпоксида, глиоксалией, дионов, мезилатов, тозилатов и трезилата, алкена и кетона.

XII. Измерение активности полипептида bG-CSF и аффинности bG-CSF в отношении рецептора.

Активность полипептида bG-CSF можно определить, используя стандартные или известные *in vitro* или *in vivo* анализы. Полипептиды bG-CSF можно анализировать в отношении биологической активности подходящими методами, известными специалистам. Такие анализы включают, без ограничения, те, что раскрыты у Hedari et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001), 81: 45-57, и анализы, в которых оценивают биологические активности hG-CSF.

Полипептиды bG-CSF можно анализировать в отношении их способности повышающе регулировать CD11a, CD11b, CD11c и/или CD18 в нейтрофилах. Измерения указанной активности можно осуществить, используя FACS, как раскрыто Hedari et al. (см. выше). В дополнительных анализах, хорошо известных специалистам в данной области, измеряют активацию нейтрофилов, включая, без ограничения, анализы, в которых измеряют L-селектин. В других анализах, которые можно осуществить, оценивают пролиферацию и/или дифференциацию клеток, используя полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению.

Полипептиды bG-CSF можно анализировать в отношении их способности связываться с рецептором. Рецептор G-CSF можно получить, используя методики и способы, хорошо известные специалистам в данной области. Рецептор hG-CSF можно получить по способу патента США № 5574136, который включен в описание посредством ссылки. Например, клетки или клеточные линии, которые действуют в ответ на G-CSF или связывают G-CSF (включая, без ограничения, клетки, содержащие активные рецепторы G-CSF, такие как клетки, продуцирующие рекомбинантный рецептор G-CSF), можно использовать для контроля за рецепторным связыванием bG-CSF. Для не ПЭГилированного или ПЭГилированного полипептида bG-CSF, включающего неприродную аминокислоту, аффинность bG-CSF в отношении его рецептора или в отношении другого рецептора G-CSF можно измерить, используя биосенсор BIAcore™ (Pharmacia). Подходящие анализы связывания включают, без ограничения, BIAcore анализы (Pearce et al., *Biochemistry*, 38: 81-89 (1999)) и AlphaScreen™ анализы (PerkinElmer). AlphaScreen™ представляет собой нерадиоактивный люминесцентный анализ близости, основанный на шариках, в котором донорные шарики возбуждают лазером на длине волны 680 нм, для выделения синглетного кислорода. Синглетный кислород диффундирует и реагирует с производным тиоксена на поверхности акцепторных шариков, что приводит к эмиссии флуоресценции на длине волны 600 нм. Эмиссия флуоресценции происходит только, если донорные и акцепторные шарики оказываются в тесной близости за счет возникновения молекулярных взаимодействий, происходящих тогда, когда каждый связан с лигандом и рецептором соответственно. Такое взаимодействие лиганд-рецептор можно устранить за счет конкуренции, используя связывающие рецептор варианты, тогда как несвязывающие варианты не принимают участия в конкуренции.

Полипептидную bG-CSF активность можно определить, используя стандартные или известные *in vitro* или *in vivo* анализы. Например, клетки или клеточные линии, которые пролиферируют в присутствии hG-CSF или связывают hG-CSF (включая, без ограничения, клетки, содержащие активные G-CSF рецепторы, такие как мышинные клетки костного мозга, WEHI-3B (D+), AML-193 (ATCC) или клетки, продуцирующие рекомбинантные G-CSF рецепторы), можно использовать для контроля за bG-CSF рецепторным связыванием; см., например, King et al., *Exp. Nematol.*, 20: 223 (1992); патент США № 6385505, которые включены в описание посредством ссылки. *In vivo* модели на животных так же, как человеческие клинические испытания в тестировании активности hG-CSF, включают те, что раскрыты, например, в патентах США № 6166183; 6565841; 6162426; 5718893, которые включены в описание посредством ссылки. Такие модели можно использовать для оценки bG-CSF активности.

Независимо от того, какой метод используют для создания существующих аналогов bG-CSF, указанные аналоги подвергают анализам на биологическую активность. Анализы с использованием меченого тритием тимидина можно осуществить для оценки степени деления клеток. Другие биологические анализы можно использовать для определения интересующей активности. Биологические анализы, такие как оценка способности индуцировать терминальную дифференциацию в мышинной лейкемической клеточной линии WEHI-3B (D+), также являются индикатором активности G-CSF; см. Nicola, et al. *Blood*, 54: 614-27 (1979). Другие *in vitro* анализы можно использовать для оценки биологической активности; см. Nicola, *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 45-77 (1989). Вообще тест на биологическую активность должен обеспечить анализ для необходимого результата, такого как возрастание или уменьшение биологической активности (по сравнению с неизменными G-CSF), отличающаяся биологическая активность (по сравнению с неизменным G-CSF), анализы рецепторной аффинности или аффинности связывания партнера, конформационные или структурные изменения самого bG-CSF или его рецептора (по сравнению с модифицированным bG-CSF) или анализ времени полужизни в сыворотке.

Ранее сообщалось, что WEHI-3BD<sup>+</sup> клетки и человеческие лейкемичные клетки из вновь диагностированных лейкемий связывают <sup>125</sup>I-меченые мышинные G-CSF и что такому связыванию можно составить конкуренцию, добавляя немеченые G-CSF или человеческий CSF-β. Тестируют способность природных G-CSF и bG-CSF конкурировать за связывание <sup>125</sup>I-G-CSF с человеческими или мышинными лейкемичными клетками. Высокой степени очистки природные G-CSF (>95% чистоты; 1 мкг) йодируют [Те-

jedor, et al., Anal.Biochem., 127, 143 (1982)] и выделяют из реагентов, используя гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию. Специфическая активность природного  $^{125}\text{I}$ -G-CSF составляет приблизительно 100 мкКюри/мкг белка.

Приведенная выше компиляция ссылок на методики анализов вовсе не является исчерпывающей, и специалистам в данной области должны быть известны другие анализы, которые можно использовать для тестирования желательного конечного результата. Изменения, которые можно вносить в такие анализы, хорошо известны специалистам в данной области.

XIII. Измерения эффективности, функционального времени *in vivo* полужизни и фармакокинетических параметров.

Важный аспект настоящего изобретения состоит в пролонгировании биологического времени полужизни, что достигается путем конструирования полипептида b-GCSF с конъюгированием полипептида или без конъюгирования полипептида с водорастворимой полимерной молекулой. Быстрое после введения снижение концентраций полипептида bG-CSF в сыворотке делает его важным для оценки биологических реакций на обработку конъюгированным и неконъюгированным полипептидом bG-CSF и его вариантами. Конъюгированные и неконъюгированные полипептиды bG-CSF и их варианты по настоящему изобретению могут иметь пролонгированное время полужизни также после введения, например подкожного или внутривенного, делая возможным измерение, например, методом ELISA или в анализе первичного скрининга. Можно использовать ELISA или RIA наборы из коммерческих источников. Другим примером анализа для измерения *in vivo* времени полужизни hG-CSF или его вариантов раскрыт в патенте США № 5824778, который включен в описание посредством ссылки. Измерение *in vivo* биологического времени полужизни осуществляют, как здесь раскрыто.

Эффективность и функциональное время полужизни полипептида hG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту, можно определить в соответствии с протоколом, раскрытым в патентах США № 6646110; 6555660; 6166183; 5985265; 5824778; 5773581, которые включены в описание посредством ссылки. Указанные протоколы можно использовать также для bG-CSF.

Фармакокинетические параметры полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту, можно оценить в модели на Sprague-Dawley самцах крыс (N=5 животных в группе испытуемых). Животным вводят или одну дозу в 25 мкг/крысу внутривенно или 50 мкг/крысу подкожно и отбирают приблизительно 5-7 образцов крови в соответствии с заранее определенным расписанием, обычно на протяжении 6 ч для полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту, не конъюгированную с водорастворимым полимером, и около 4 дней для полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту и конъюгированного с водорастворимым полимером. Фармакокинетические данные для bG-CSF без не кодируемой в природе аминокислоты можно непосредственно сравнить с данными для полипептидов bG-CSF, включающих не кодируемую в природе аминокислоту.

Фармакокинетические исследования полипептидов bG-CSF можно осуществить в опытах на мышах, крысах или на приматах, например *suonomolus* обезьянах. Обычно вводят одну инъекцию или подкожно или внутривенно и регистрируют изменения во времени сывороточных уровней bG-CSF.

В патенте США № 5849883 и WO 89/10932, которые включены в описание посредством ссылки, раскрыт ряд моделей на животных, которые можно использовать для оценки полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению. Исследования на животных, которые можно осуществить, включают контрольное заражение крупного рогатого скота *Pasteurella hemolytica*, скота с бактериальным заражением молочной железы/маститом (*Klebsiella pneumoniae*). Другие исследования, которые можно осуществить, оценивают контроль, инцидентность и длительность бычьего респираторного заболевания или предотвращение колиформного мастита. Методы оценки здоровья животных, производства молока, количества нейтрофилов и других параметров хорошо известны специалистам в данной области. Другие модели, которые можно использовать для оценки полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению, включают без ограничения, модели на животных инфицирования или экспонирования инфекции, такие как модель *Pseudomonas aeruginosa* пневмонии на хомяках, модель *Candida albicans* пиелонефрита на крысах, модели, включающие новорожденных жеребят, и модели, включающие растущих свиней. Некоторые из указанных моделей раскрыты в патенте США № 5849883 и WO 89/10932. Модели, такие как те, что известны специалистам в данной области.

Дальнейшие примеры анализов для измерения *in vivo* биологической активности hG-CSF или его вариантов раскрыты в патентах США №№ 5681720; 5795968; 5824778; 5985265 и Bowen et al., *Experimental Nematology*, 27: 425-432 (1999), каждый из которых включен в описание посредством ссылки.

XIV. Введение и фармацевтические композиции.

Полипептиды или белки по настоящему изобретению (включая, без ограничения, bG-CSF, синтетазы, белки, включающие одну или более из не природных аминокислот и т.д.) необязательно используют для терапевтического применения, включая, без ограничения, в комбинации с подходящим фармацевтическим носителем. Такие композиции, например, включают терапевтически эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Такой носитель или эксципиент включает, без ограничения, солевой раствор, буферированный солевой раствор, декстрозу, воду, глице-

рин, этанол и/или их комбинации. Лекарственную форму приготавливают таким образом, чтобы она соответствовала способу введения. Обычно способы введения белков хорошо известны специалистам в данной области и могут быть применены для введения полипептидов по настоящему изобретению. Композиции могут быть в водорастворимой форме, такой как фармацевтически приемлемые соли, что означает, что включены и соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Патент США № 6497869, который включен в описание посредством ссылки, раскрывает лекарственные формы и введение полипептидов G-CSF, включая, без ограничения, hG-CSF и bG-CSF. Обсуждаются соли, включающие сульфатные ионы, такие как сульфат аммония, сульфат натрия, сульфат магния и их смеси, также как буферизирующие агенты, такие как ацетат, цитрат, фосфат, HEPES, BES, TAPS, EPPS, TES и их смеси.

Терапевтические композиции, включающие один или более из полипептидов по настоящему изобретению, необязательно тестируют в одной или более из подходящих *in vitro* и/или *in vivo* моделей заболеваний на животных для подтверждения эффективности, тканевого метаболизма и для оценки размеров доз в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. В частности, дозы можно вначале определить по активности, стабильности или другим подходящим характеристикам от раскрытых здесь неприродных до природных гомологов аминокислот (включая, без ограничения, сравнение полипептида bG-CSF, модифицированного так, что он включает одну или более из неприродных аминокислот, с полипептидом bG-CSF с природными аминокислотами, и сравнение полипептида bG-CSF, модифицированного так, что он включает одну или более из неприродных аминокислот, с доступной в настоящее время обработкой bG-CSF), то есть в соответствующем анализе.

Введение осуществляют любым из способов, который используют для введения молекулы в тесный контакт с кровью или клетками ткани. Полипептиды с неприродной аминокислотой по настоящему изобретению вводят любым подходящим способом, необязательно с одним или более из фармацевтически приемлемых носителей. Подходящие способы введения таких полипептидов пациенту в контексте настоящего изобретения доступны, и, хотя можно использовать более одного способа для введения конкретной композиции, конкретный способ часто может обеспечить более быстрое или более эффективное действие или реакцию, чем другие способы.

Фармацевтически приемлемые носители определяются частично конкретной композицией, которую вводят так же, как конкретным способом, который используют для введения композиции. Соответственно существует широкий круг подходящих лекарственных форм фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно вводить любым обычным способом, подходящим для белков или пептидов, включая, без ограничения, парентеральный, например, с помощью инъекций, включая, без ограничения, подкожную или внутривенную или любую другую форму инъекций или вливаний. Полипептидные композиции можно вводить рядом способов, включая, без ограничения, перорально, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, чрескожно, подкожно, наружно, сублингвально, интраваскулярно, интрааммально или ректально. Композиции, включающие полипептиды с неприродными аминокислотами, модифицированные или немодифицированные, можно также вводить, используя липосомы. Такие способы введения и соответствующие лекарственные формы обычно хорошо известны специалистам в данной области. Полипептид bG-CSF можно использовать отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, такими как фармацевтический носитель. Полипептид bG-CSF можно использовать в комбинации с другими агентами или терапевтическими средствами.

Полипептиды bG-CSF, включающие неприродную аминокислоту, отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, можно также приготовить в аэрозольной лекарственной форме (т.е. их можно "распылять") для введения путем ингаляции. Аэрозольные лекарственные формы могут быть распределены под давлением в приемлемых пропеллантах, таких как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, такие как, например, интраартикулярное (в суставы), внутривенное, внутримышечное, интрадермальное, внутривенное и подкожное, включают водные и неводные, изотоничные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты буферы, бактериостаты и солюты, которые придают лекарственной форме изотоничность в отношении крови предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Лекарственные формы bG-CSF могут быть представлены в виде единичной дозы или в многодозовых герметичных контейнерах, таких как ампулы и пробирки.

Парентеральное введение и внутривенное введение являются предпочтительными методами введения. В частности, способы введения, которые существуют в настоящее время, для терапевтических гомологов природных аминокислот (включая, без ограничения, те, которые обычно используют для EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, интерлейкинов, антител, FGF и/или любых других фармацевтически доставляемых белков), наряду с лекарственными формами, используемыми в настоящее время, представляют собой предпочтительные способы введения и лекарственные формы для полипептидов по настоящему изобретению.

Доза, вводимая животному, в контексте настоящего изобретения достаточна, чтобы обеспечить благоприятную терапевтическую реакцию у животного в течение времени или другую соответствующую активность в зависимости от применения. Дозу определяют по эффективности конкретного вектора или лекарственной формы и активности, стабильности или времени полужизни в сыворотке используемого полипептида с неприродной аминокислотой и состояния животного, также как от веса тела или площади тела подлежащего лечению животного. Размер дозы также определяется сущностью, природой и степенью любых вредных воздействий, которые сопровождают введение конкретного вектора, лекарственной формы или т.п. у конкретного животного.

При определении эффективного количества указанного вектора или лекарственной формы, которое следует ввести при лечении или для профилактики заболевания, ветеринар оценивает циркулирующие уровни в плазме, токсичности лекарственных форм, степень развития заболевания и/или, при необходимости, продуцирование анти(полипептид с неприродной аминокислотой) антител.

Вводимая доза обычно бывает в интервале, эквивалентном дозам, в которых в настоящее время используют терапевтические белки, с поправкой на измененную активность или время полужизни в сыворотке соответствующей композиции. Указанные векторы или фармацевтические лекарственные формы по настоящему изобретению могут дополнять условия лечения любым известным обычным способом, включая введение антител, введение вакцины, введение цитотоксических агентов, полипептидов с натуральными аминокислотами, нуклеиновых кислот, аналогов нуклеотидов, модификаторов биологических реакций и т.п.

Для введения лекарственные формы по настоящему изобретению вводят в количестве, определяемом по LD-50 или EC-50 соответствующей лекарственной формы, и/или по наблюдениям за присутствующими побочными эффектами полипептидов с неприродными аминокислотами при различных концентрациях, включая, без ограничения, как это применимо с точки зрения массы и общего состояния здоровья животного. Введение можно осуществить в виде единичной дозы или отдельных доз.

Если у животного, подвергнутого введению лекарственной формы, развивается лихорадка, озноб или ломота в мышцах, ему можно ввести подходящую дозу аспирина, ибупрофена, ацетаминофена или других лекарственных средств, контролирующих боль/лихорадку у животных. Животным, которые испытывают реакции на введение, такие как лихорадка, мышечная боль и озноб, за 30 мин до следующего введения проводят премедикацию, используя или аспирин, или ацетаминофен или, включая, без ограничения, дифенгидрамин, или другое лекарственное средство, подходящее для животных. В более тяжелых случаях ознобов и мышечных болей, которые быстро не реагируют на антипиретики и антигистамины, можно использовать меперидин. Введение клеток осуществляют медленно или с перерывами в зависимости от тяжести реакции.

Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно вводить непосредственно животному. Для введения полипептида bG-CSF субъекту используют любой из обычно используемых способов. Полипептидные bG-CSF композиции в соответствии с вариантами по настоящему изобретению включают композиции, подходящие для перорального, ректального введения, местного, для ингаляций (включая, без ограничения, аэрозоли), для буккального (включая, без ограничения, сублингвального), вагинального, парентерального (включая, без ограничения, подкожное, внутримышечное, внутрисуставное, интраплевральное, внутрибрюшинное, интрацервикальное, внутриартериальное или внутривенное), местного (т.е. как на поверхность кожи, так и на слизистую, включая слизистую дыхательных путей), через легкие, интраокулярного, интраназального и трансдермального введения, хотя наиболее подходящий способ в каждом конкретном случае будет зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Введение может быть или локальным или системным. Лекарственные формы соединений могут быть представлены в герметичных контейнерах, содержащих единичную дозу или множество доз, таких как ампулы и пробирки. Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно приготовить в единичной дозовой форме для инъекций (включая, без ограничения, растворы, суспензии или эмульсии) в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно также вводить с помощью непрерывных вливаний (используя, включая, без ограничения, мини-насосы, такие как осмотические насосы), единичные болюсы или лекарственные формы депо с замедленным выделением.

Подходящие для введения лекарственные формы включают водные и неводные растворы, изотонические стерильные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворы, которые придают лекарственным формам изотоничность, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, агенты, способствующие растворению, загустители, стабилизаторы и консерванты. Растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток описанных ранее типов.

Для представления белков обычно используют технику сушки вымораживанием, которая служит для удаления воды из представляющих интерес белковых препаратов. Сушка вымораживанием или лиофилизация представляет собой процесс, с помощью которого подлежащий сушке материал вначале замораживают, а затем лед или замораживающий растворитель удаляют путем сублимации в вакууме. Эксципиенты могут быть включены в прелиофилизованные лекарственные формы для повышения

стабильности во время процесса сушки вымораживанием и/или для повышения стабильности лиофилизированного продукта при хранении; см. Pikal, M. *Biopharm.*, 3(9)26-30 (1990) и Arakawa et al. *Pharm. Res.*, 8(3): 285-291 (1991).

Сушка распылением фармацевтических препаратов также хорошо известна специалистам в данной области. Например, см. Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals" in *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Кроме малых молекул фармацевтических препаратов, сушкой распылением сушат различные биологические препараты, которые включают ферменты, сыворотку, плазму, микроорганизмы и дрожжи. Сушка распылением представляет собой весьма подходящий способ, так как с ее помощью можно превратить жидкий фармацевтический препарат в тонкий, без пыли или агломератов порошок в одностадийном процессе. Основным способом включает следующие четыре стадии: а) распыление подаваемого раствора до состояния тумана; б) контактирование тумана с воздухом; в) сушка тумана и д) удаление воздуха из высушенного продукта. В патентах США №№ 6235710 и 6001800, которые включены в описание посредством ссылки, описывается приготовление рекомбинантного эритропоэтина сушкой распылением.

Фармацевтические композиции лекарственных форм по настоящему изобретению могут включать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или стабилизатор. Фармацевтически приемлемые носители определяются частично в зависимости от предполагаемой для введения композиции, также как от конкретного способа введения композиции. Соответственно существует широкий круг подходящих лекарственных форм фармацевтических композиций (включающих необязательные фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы) по настоящему изобретению (см., например, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>th</sup> ed. 1985)).

Подходящие носители включают, без ограничения, буферы, содержащие сукцинат, фосфат, борат, НЕРЕС, цитрат, гистидин, имидазол, ацетат, бикарбонат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая, без ограничения, аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды, включая, без ограничения, те, которые имеют менее чем около 10 остатков; белки, включая, без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, включая, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, включая, без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, гистидин или производные гистидина, метионин, глутамат или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, без ограничения, трегалозу, сахарозу, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, включая, без ограничения, EDTA и динатрий эдентат; ионы двухвалентных металлов, включая, без ограничения, цинк, кобальт или медь; спирты; сахара, включая, без ограничения, маннит или сорбит; образующие соли противоионы, включая, без ограничения, натрий и натрийхлорид; наполнители, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, кукурузный и другие крахмалы; связывающие агенты; подсластители и другие вкусовые агенты; красящие агенты; и/или неионные поверхностно-активные агенты, включая, без ограничения, Tween<sup>TM</sup> (включая, без ограничения, Tween 80 (полисорбат 80) и Tween 20 (полисорбат 20)), Плуроникс (Pluronic<sup>TM</sup>) и другие плуроновые кислоты, включая, без ограничения, плуоновую кислоту F68 (полоксамер 188) или ПЭГ. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, например, без ограничения, полиэфиры на основе поли(этиленоксид)-поли(пропиленоксид)-поли(этиленоксид), то есть (PEO-PPO-PEO), или поли(пропиленоксид)-поли(этиленоксид)-поли(пропиленоксида), то есть (PPO-PEO-PPO), или их комбинации. PEO-PPO-PEO и PPO-PEO-PPO коммерчески доступны под торговыми марками Pluronic<sup>TM</sup>, R-Pluronic<sup>TM</sup>, Tetronics<sup>TM</sup> и R-Tetronics<sup>TM</sup> (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) и подробно раскрыты в патенте США № 4820352, который включен в описание посредством ссылки во всей своей полноте. Другие этилен/полипропилен блок-сополимеры могут быть подходящими поверхностно-активными веществами. Поверхностно-активное вещество или комбинацию поверхностно-активных веществ можно использовать для стабилизации ПЭГилированного bG-CSF против одного или более из стрессов, включая, без ограничения, стрессы, которые возникают при перемешивании. Некоторые из вышеперечисленных агентов можно именовать как "увеличивающие объем агенты". Некоторые агенты можно именовать как "модификаторы тоничности". Противомикробные консерванты также можно использовать для придания стабильности и противомикробной эффективности; подходящие консерванты включают, без ограничения, бензиловый спирт, бензалконийхлорид, метакрезол, метил/пропилпарабен, крезол и фенол или их комбинации. В патенте США № 7144574, который включен в описание посредством ссылки, раскрыты дополнительные материалы, которые могут быть полезны в фармацевтических композициях и лекарственных формах по настоящему изобретению и в других препаратах для доставки.

Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению, включая те, которые связаны с водорастворимыми полимерами, такими как ПЭГ, также можно вводить в виде частей систем с замедленным выделением. Композиции с замедленным выделением, которые включают, без ограничения, полупроницаемые полимерные матрицы в форме формованных изделий, включая, без ограничения, пленки или микрокапсулы. Матрицы с замедленным выделением включают матрицы из биосовместимых материалов, таких как поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982), этиленвинилацетат (Langer et al., см. выше) или поли-D-(-)-3-

гидроксимасляная кислота (EP 133,988), полилактиды (полимолочные кислоты) (патент США № 3773919; EP 58481), полигликолиды (полимеры гликолевой кислоты), полилактиды со-гликолиды (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты), полиангидриды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983), поли(орто)эфир, полипептиды, гиалуроновую кислоту, коллаген, хондроитинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Композиции с замедленным выделением также включают заключенные в липосомы соединения. Липосомы, содержащие указанные соединения, получают способами, хорошо известными специалистам в данной области: DE 3218121; Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; патент США № 4619794; EP 143949; патент США № 5021234; японский опубликованный патент 83-118008; патенты США №№ 4485045 и 4544545 и EP 102324. Все цитированные ссылки и патенты включены в описание посредством ссылки.

Включенные в липосомы полипептиды bG-CSF можно получить способами, раскрытыми, например, в DE 3218121; Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; патент США № 4619794; EP 143949; патент США № 5021234; японский опубликованный патент 83-118008; патенты США №№ 4485045 и 4544545 и EP 102324. Композиции и размеры липосом хорошо известны или их легко может определить эмпирически специалист в данной области. Некоторые примеры липосом раскрыты, например, в Park J.W., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1327-1331 (1995); Lasic D. и Papahadjopoulos D. (eds): *MEDICAL APPLICATIONS OF LYPOSOMES* (1998); Drummond D.C., et al., *Liposomal drug delivery systems for cancer therapy*, in Teicher B (ed): *CANCER DRUG DISCOVERY and DEVELOPMENT* (2002); Park J.W., et al., *Clin. Cancer Res.*, 8:1172-1181 (2002); Nielsen U.B., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1591(1-3): 109-118 (2002); Mamot C., et al., *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003). Все цитированные ссылки и патенты включены в описание посредством ссылки. Множество лекарственных форм hG-CSF было раскрыто, и они хорошо известны специалистам в данной области.

Доза, вводимая животному в контексте настоящего изобретения, должна быть достаточной для того, чтобы вызвать благоприятную реакцию у субъекта через некоторое время. Обычно полное фармацевтически эффективное количество полипептида bG-CSF по настоящему изобретению, вводимого парентерально, составляет дозу в интервале от около 0,01 мг/кг/день до около 100 мг/кг или от около 0,05 до около 1 мг/кг веса тела животного, хотя это является предметом терапевтического рассмотрения. Частота введения доз также является предметом терапевтического рассмотрения, и вводить дозы можно чаще или реже, чем коммерчески доступные полипептидные bG-CSF продукты, рекомендованные для использования для животных. Обычно ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению можно вводить любым из указанных выше способов.

#### XV. Терапевтические применения полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению.

Полипептиды b-GCSF по настоящему изобретению можно использовать для лечения широкого круга нарушений. Введение hG-CSF продуктов приводит к образованию белых кровяных телец у людей. Так, введение полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению может быть полезным для предотвращения инфицирования животных, которые подвержены риску такого инфицирования. Полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно вводить животным, которые инфицированы. Инфекции, которые можно лечить полипептидами bG-CSF по настоящему изобретению, включают, без ограничения, мастит и транспортную лихорадку. В одном варианте по настоящему изобретению ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от двух недель до одного дня перед отелом. В одном варианте по настоящему изобретению ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от двух недель до одного дня перед отелом и дополнительно вводят в день отела или вплоть до одной недели после отела. В одном варианте по настоящему изобретению полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от двух недель до одного дня перед отелом и дополнительно вводят в день отела или вплоть до одной недели после отела. В одном варианте по настоящему изобретению ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от одной недели до одного дня перед отелом. В одном варианте по настоящему изобретению ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от одной недели до одного дня перед отелом и дополнительно вводят в день отела или вплоть до одной недели после отела. В одном варианте по настоящему изобретению полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от одной недели до одного дня перед отелом. В одном варианте по настоящему изобретению полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят животному в интервале от одной недели до одного дня перед отелом и дополнительно вводят в день отела или вплоть до одной недели после отела.

В одном варианте по настоящему изобретению полипептид bG-CSF по настоящему изобретению





дозе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 мкг/кг. В одном варианте полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 10 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 10 мкг/кг. В одном варианте полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 20 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 20 мкг/кг. В одном варианте полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 30 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 30 мкг/кг. В одном варианте полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 40 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 40 мкг/кг. В одном варианте полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе 50 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе больше чем 0,5 мкг/кг. В одном варианте ПЭГилированный полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят в дозе больше чем 0,5 мкг/кг.

Фармацевтические композиции, содержащие bG-CSF, можно приготовить такой степени эффективности для введения различными способами животному, испытывающему нарушение, характеризующееся низким или ненормальным продуцированием лейкоцитов, или отдельно либо как часть состояния или заболевания. Средние количества bG-CSF могут варьироваться и, в частности, должны основываться на рекомендациях и предписаниях квалифицированного ветеринара. Точное количество bG-CSF составляет вопрос предпочтений субъекта относительно таких факторов, как точный тип состояния, подлежащего лечению, состояния животного, подлежащего лечению, так же, как и других ингредиентов композиции. Настоящее изобретение также предусматривает введение терапевтически эффективного количества другого активного агента. Вводимое количество может легко определить специалист в данной области на основании сведений о лечении bG-CSF. bG-CSF по настоящему изобретению, таким образом, можно использовать для стимулирования продуцирования лейкоцитов и корректировки пониженных уровней эритроцитов. Чаще всего, количество лейкоцитов снижается из-за раковых заболеваний, инфекций или химиотерапии. Также можно лечить состояния, которые могут привести к нейтропении у других, в остальном здоровых животных. Обычно любые состояния, которые лечат, используя hG-CSF, можно также лечить, используя bG-CSF и/или конъюгаты ПЭГ:bG-CSF по настоящему изобретению. В настоящем изобретении предложено также введение терапевтически эффективного количества другого активного агента, такого как противораковый химиотерапевтический агент. Необходимое для введения количество может легко определить специалист в данной области с учетом информации о лечении с помощью bG-CSF.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно получить обычными способами.

### Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации и никоим образом не ограничивают изобретение.

Пример 1. Выбор сайта для встраивания не кодируемых в природе аминокислот в bG-CSF.

Этот пример раскрывает некоторые из многих потенциальных наборов критериев для выбора сайтов для встраивания не кодируемых в природе аминокислот в bG-CSF.

Была создана теоретическая модель бычьего GCSF с использованием кристаллической структуры человеческого GCSF, связанного с рецепторами (PDB ID NO: 2D9Q). Координаты для этой структуры человеческого GCSF доступны из банка данных для белков (PDB) (Bernstein et al. *J. Mol. Biol.*, 1997, 112, p. 535). Потенциальные остатки для замещения включают, без ограничения, сайты консервативного замещения и остатки с самой большой доступностью для растворителя, используя Sx программу (Pintar et al. (2002) *Bioinformatics*, 18(7): 980-4). Сайты консервативных замещений, идентифицированные для замещения пара-ацетилфенилаланином, включают, без ограничения, тирозиновые, фенилаланиновые и аргининовые остатки, которые содержат гидрофобное ядро с зарядом или без него. Остатки, которые могут быть структурно релевантными, не были выбраны для замещений, включая, без ограничения, глицины, пролины и остатки, включенные в кэппинг конца спирали. Остатки в известных участках рецепторного связывания также не выбирают для замещения. Положения 123 (Asp) и 141 (Thr) в SEQ ID NO: 1 могут быть критическими для взаимодействия с рецептором. Положение 7 (Arg) может быть критическим для способа укладки полипептида. Положение 133 (Thr) представляет собой сайт O-связанного гликозилирования в человеческом G-CSF.

В некоторых вариантах одна или более не кодируемых в природе аминокислот встроены в одном или более из следующих положений в bG-CSF: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,

99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любой их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF).

В некоторых вариантах одна или более не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любые их комбинации SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и в любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из следующих положений bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166 и любые их комбинации SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в одно или более из следующих положений bG-CSF 62, 133 и их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в положение 62 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах одна или более из не кодируемых в природе аминокислот встроены в положение 133 bG-CSF (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах полипептид по настоящему изобретению включает одно или более из замещений, добавлений или делеций природных аминокислот. В некоторых вариантах одна или более из неприродных аминокислот встроены в лидерную или сигнальную последовательность, которые представляют собой N- или C-конец SEQ ID NO: 1, 2, или других bG-CSF последовательностей.

В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF).

В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, положения: 3, 7, 62, 133, 166 и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в одном или более из указанных положений связана с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, 62, 133 и их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 62 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах не кодируемая в природе аминокислота в положении 133 связана с водорастворимым полимером (SEQ ID NO: 1 или соответствующая аминокислота в SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах неприродная аминокислота в сигнальной или лидерной последовательности N- или C-конца SEQ ID NO: 1, 2, или другой последовательности bG-CSF связана с водорастворимым полимером.

Пример 2. Клонирование и экспрессия полипептида bG-CSF, содержащего не кодируемую в природе аминокислоту, и продуцирование в *E. coli*.

Этот пример детализирует клонирование и экспрессию полипептида bG-CSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту в *E. coli*, и способы оценки биологической активности модифицированных полипептидов bG-CSF.

Методы клонирования bG-CSF хорошо известны специалистам в данной области. Полипептидная и полинуклеотидная последовательности bG-CSF и клонирование bG-CSF в клетки-хозяева, также как способы очистки bG-CSF, подробно раскрыты в патенте США № 5849883, который включен в описание по-

средством ссылки во всей своей полноте, и у Heidari et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81: 45-57.

кДНК, кодирующие зрелый bG-CSF, представлены как SEQ ID NO: 3. Полипептид, кодируемый указанной последовательностью, представлен как SEQ ID NO: 1.

кДНК, кодирующая зрелый bG-CSF с метионином на N-конце, представлена как SEQ ID NO: 4. Полипептид, кодируемый указанной последовательностью, представлен как SEQ ID NO: 2.

Введенную трансляционную систему, которая включает ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоксил-тРНК синтетазу (O-RS), используют для экспрессии bG-CSF, содержащего не кодируемую в природе аминокислоту. O-RS преимущественно аминокислирует О-тРНК с не кодируемой в природе аминокислотой. В свою очередь, трансляционная система встраивает не кодируемую в природе аминокислоту в bG-CSF, в ответ на кодируемый селекторный кодон. Подходящие O-RS и О-тРНК последовательности раскрыты в WO 2006/068802, озаглавленном "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9--SEQ ID NO: 22 & D286R мутант E9--SEQ ID NO: 24 в указанной заявке), и WO 2007/021297, озаглавленном "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEQ ID NO: 23 в указанной заявке), которые включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Таблица 2

## O-RS и О-тРНК последовательности

|              |  |      |
|--------------|--|------|
| SEQ ID NO:5  | M. jannaschii тРНК <sup>TYE</sup> <sub>CUA</sub>                               | тРНК |
| SEQ ID NO:6  | HLAD03; оптимизированная amber супрессорная тРНК                               | тРНК |
| SEQ ID NO:7  | HL325A; оптимизированная AGGA со сдвигом рамки супрессорная тРНК               | тРНК |
| SEQ ID NO:8  | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидо-L-фенилаланина p-Az-PheRS (6) | RS   |
| SEQ ID NO:9  | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-бензоил-L-фенилаланина p-BpaRS (6)  | RS   |
| SEQ ID NO:10 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания пропаргилфенилаланина Propargil-PheRS | RS   |
| SEQ ID NO:11 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания пропаргилфенилаланина Propargil-PheRS | RS   |
| SEQ ID NO:12 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания пропаргилфенилаланина Propargil-PheRS | RS   |
| SEQ ID NO:13 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина p-Az-PheRS (1)    | RS   |
| SEQ ID NO:14 | Аминоксил тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина p-Az-PheRS (3)    | RS   |
| SEQ ID NO:15 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина p-Az-PheRS (4)    | RS   |
| SEQ ID NO:16 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина p-Az-PheRS (2)    | RS   |
| SEQ ID NO:17 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-ацетилфенилаланина (LW1)            | RS   |
| SEQ ID NO:18 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-ацетилфенилаланина (LW5)            | RS   |
| SEQ ID NO:19 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-ацетилфенилаланина (LW6)            | RS   |
| SEQ ID NO:20 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина (AzPheRS-5)       | RS   |
| SEQ ID NO:21 | Аминоксил-тРНК синтетазы для встраивания п-азидофенилаланина (AzPheRS-6)       | RS   |

Трансформация *E. coli* плазмидами, содержащими модифицированную bG-CSF полинуклеотидную последовательность и пару ортогональных аминоксил-тРНК синтетаз/тРНК (специфических для нужной не кодируемой в природе аминокислоты), позволяет осуществить сайт-специфическое встраивание не кодируемой в природе аминокислоты в полипептид bG-CSF. Плазмида, использованная для экспрессии bG-CSF, представлена на фиг. 1. Представляющий интерес ген, представленный как пример, представляет собой bG-CSF с селекторным кодоном (amber), заменяющим кодон, кодирующий T133. Полипептид с пара-ацетилфенилаланином в положении 133 обозначают как bG-CSF T133pAF. Plpp - конститутивный *E. coli* промотор; Pro кластер - тандемные копии *E. coli* пролин-тРНК; F13 кластер - тандемные копии модифицированных *Methanococcus jannaschii* тирозин-тРНК из WO 2007/021297; E9 RS (D286R) Methano-

*coccus jannaschi* тирозил-тРНК-синтетаза из WO 2006/068802; T7 про - T7 промотор; T7 терминатор; *ori* - источник репликации; *bla* (*ap*) последовательность - ген устойчивости к ампициллину.

Полинуклеотиды, кодирующие bG-CSF дикого типа или один из 15 мутантных полипептидов, клонируют и затем субклонировать рVK6 вектор, используя Codon Devices, Inc. Каждая созданная конструкция имеет селекторный кодон, амбер-кодон в различных положениях. Полученные полипептиды bG-CSF содержат не кодируемую в природе аминокислоту, пара-ацетилфенилаланин (pAF; pAcF), замещающую кодируемые в природе аминокислоты в одном из следующих положений: L3, R7, E33, H43, Q58, S62, Q67, L69, L99, D123, L124, T133, Q134, T141 и R166 (нумерация положений относится к SEQ ID NO: 1). Так как каждый из созданных мутантных полипептидов b-GCSF имеет метионин на N-конце (см. SEQ ID NO: 2 для дикого типа последовательности бычьего G-CSF с метионином на N-конце), экспрессируемые полипептиды b-GCSF имеют замещения неприродной аминокислоты в положениях номер +1 (например, один мутант содержит лейцин в положении 4 SEQ ID NO: 2, замещенной pAF). После проверки последовательности плазмиды трансформируют в W3110 B2 клетки и колонии выращивают на ампициллиновых планшетах. Информация о клеточной линии *E. coli* представлена на фиг. 2. Указанные колонии используют для инокулирования 5 мл LB разбавленным 1:1000 ампициллиновыми культурами, которые выращивают при 37°C до O.D.600=0,8. Затем добавляют pAF (пара-ацетилфенилаланин) к 15 различным культурам до конечной концентрации 4 мМ. Спустя приблизительно 30 мин культуры иницируют L-арабинозой до конечной концентрации 0,2% и культуры инкубируют при 37°C еще 5 ч. В это время отбирают образцы по 500 мкл из каждой культуры и осаждают центрифугированием при скорости 13000 об/мин в течение 4 мин. Надосадочную жидкость сливают и осадок снова суспендируют в 150 мкл B-PER, используя 1 мкл ДНКзы, и инкубируют при комнатной температуре в течение ночи. На следующее утро добавляют 4X LDS образцовый буфер (Invitrogen, Carlsbad, CA), образцы нагревают до 95°C в течение 5 мин и добавляют 10X образцовый восстанавливающий агент (Invitrogen, Carlsbad, CA). Затем образцы разделяют, используя SDS-PAGE на гелях с градиентом 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) в MES буфере, и визуализируют, используя краситель Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). На фиг. 3 представлены образцы, полученные из дикого типа и bG-CSF мутантных культур после анализа на гелях с градиентом 4-12% и окрашивания Кумасси.

Солюбилизация препаратов телец включения.

Клеточную пасту снова суспендируют, смешивая до конечной концентрации 10% твердой части в 4°C буфере I для телец включения (IB) (50 мМ Tris pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% Triton X-100; 4°C). Клетки лизируют, пропуская вновь суспендированный материал через микрофлюидайзер два раза. Образцы центрифугируют при 10000 g в течение 15 мин при 4°C и надосадочную жидкость декантируют. Осадок телец включения (IB) промывают, снова суспендируя в дополнительном объеме IB буфера I (50 мМ Tris pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% Triton X-100; 4°C), и вновь суспендированный материал пропускают через микрофлюидайзер два раза. Образцы затем центрифугируют при 10000 g в течение 15 мин при 4°C и надосадочную жидкость декантируют. IB осадок снова суспендируют в одном объеме буфера II (50 мМ Tris pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C). После повторного суспендирования образцы центрифугируют при 10000 g в течение 15 мин при 4°C и надосадочную жидкость декантируют. Осадок IB снова суспендируют в 1/2 об. буфера II (50 мМ Tris pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C). Затем отбирают аликвоты IB в подходящие контейнеры. Образцы центрифугируют при 10000 g в течение 15 мин при 4°C и надосадочную жидкость декантируют. Затем тельца включения солюбилизируют или хранят при -80°C до использования.

Солюбилизация телец включения.

Тельца включения солюбилизируют до конечной концентрации 10-15 мг/мл в солюбилизационном буфере (20 мМ Tris, pH 8,0; 8М гуанидин; 10 мМ β-ME). Солюбилизированные IB инкубируют при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 1 ч или до тех пор, пока они полностью не солюбилизируются. Концентрацию белка регулируют, разбавляя дополнительным количеством солюбилизационного буфера, если концентрация белка велика.

Рефолдинг.

Рефолдинг осуществляют, разбавляя образцы до конечной концентрации белка 0,5 мг/мл в 0,5 М аргинине, pH 8,0; 4°C. Образцы оставляют для рефолдинга на 48-72 ч при 4°C.

Очистка.

Твердый (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> добавляют к образцам до конечной концентрации 20% при осторожном перемешивании. Образцы осторожно перемешивают при 4°C в течение 30 мин. Осажденный белок (содержащий bG-CSF) центрифугируют при 12000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют и осадок снова суспендируют в 1/2-кратном объеме 20 мМ NaAc, pH 4,5. Весь осадок не возвращается в раствор. Один только bG-CSF возвращается в раствор. Нерастворимый материал осаждают центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин. Образцы декантируют и надосадочную жидкость сохраняют. bG-CSF материал фильтруют через 0,45-мкм фильтр. Затем полученный материал вводят в CM FF колонку (GE Healthcare), уравновешенную буфером A (20 мМ NaAc, pH 4,5). Материал был <10 м/с перед загрузкой в колонку. bG-CSF элюируют из колонки, используя линейный градиент более 10 об. колонки до 100% буфера B (20 мМ NaAc, pH 4,5; 500 мМ NaCl). На фиг. 4 представлен окрашенный Кумасси SDS-

PAGE анализ пиковой фракции из CM FF цикла колонки с bG-CSF-T133pAF.

ПЭГи́лирование и очистка.

Величину pH пула CM доводят до pH 4,0, используя 50% ледяную уксусную кислоту. Затем пул концентрируют до примерно 4,0 мг/мл белка. К пулу добавляют 12:1 или 8:1 молярный избыток гидроксиламин ПЭГ:bG-CSF. Полученную смесь инкубируют при температуре 28°C в течение 48-72 ч. Затем смесь разбавляют 8-10-кратно водой (<8 м/с) и затем вводят в SP HP колонку (GE Healthcare), уравновешенную буфером А (20 mM NaAc, pH 4,5). ПЭГи́лированный bG-CSF элюируют, используя линейный градиент более 40 об. колонки до 100% буфера В (20 mM NaAc, pH 4,5; 500 mM NaCl). На фиг. 5 представлен SDS-PAGE анализ пиковой фракции из SP HP колонки для ПЭГи́лированного bG-CSF-T133pAF. В качестве буфера для элюирования можно также, например, использовать 5% этиленгликоль.

Фракции ПЭГи́лированного bG-CSF собирают и подвергают диализу против bG-CSF буфера, используемого для приготовления лекарственной формы (4,26 mM NaAc, pH 4,0; 0,565 mM NaCl; 0,0033% Tween 20; 5% сорбит). Полученный ПЭГ материал концентрируют до 6-8 мг/мл белка, стерильно фильтруют, используя 0,22 мкм PES фильтр. Белок хранят при 4°C или мгновенно замораживают и хранят при -80°C для длительного хранения. На фиг. 6 представлен SDS-PAGE анализ b-GCSF до и после ПЭГи́лирования. Полоса 1: bG-CSF-T133pAF; полоса 2: bG-CSF-T133pAF-20КПЭГ; полоса 3: см. Blue Plus 2 маркер молекулярной массы.

Картирование пептида (трипсин/эндопротеиназа Glu-C) bG-CSF.

Картирование пептида осуществляют для подтверждения встраивания пара-ацетилфенилаланина (pAF) в полипептид bG-CSF. Очищенный bG-CSF T133pAF до ПЭГи́лирования и дикого типа bG-CSF разбавляют до конечных значений 6 M гуанидин-HCl, 50 mM Tris pH 7,8 и восстанавливают 10 mM DTT при 37°C в течение 1 ч. Образец алкилируют, используя 20 mM IAA, в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре и реакцию гасят, добавляя 20 mM DTT. Полученный материал диализуют в 100 mM бикарбоната аммония pH 7,7 и обрабатывают трипсином 1:50 (белок:фермент) в течение 4 ч при 37°C. После указанной реакции добавляют Glu-C 1:20 в течение ночи при 25°C. Расщепление останавливают, добавляя TFA до конечной концентрации 0,1%. Образец вводят в Grace Vydac C8 колонку с обращенной фазой в тандеме с масс-спектрометром ThermoFinnigan LCQ Deca с захватом ионов течение 90 мин при детектировании на 214 и 250 нм. Градиент начинается при 98% подвижной фазы А (0,05% TFA в воде) с изократическим элюированием в течение 8 мин и затем уменьшается до 60% подвижной фазы В (0,05% TFA в ацетонитриле) в течение 90 мин с детектированием на 214 и 250 нм. Скорость потока составляет 0,2 мл/мин и температура в колонке 40°C. Капиллярный вольтаж устанавливают 15 В и полный интервал сканирования 100-2000 m/z. Напряжение столкновения для MS/MS составляет 42% от нормализованного.

На фиг. 7a представлен трипсин/Glu-C перевар дикого типа bG-CSF (детектирование на 214 нм). На фиг. 7b представлен трипсин/Glu-C перевар bG-CSF T133pAF (детектирование на 214 нм). Показана повышенная гидрофобность от треонина до pAF (пара-ацетилфенилаланин) замещения. Для дикого типа bG-CS, время удерживания пептида, содержащего T133, составляет 42,79 мин; для bG-CSF T133pAF, пептида, содержащего T133pAF, и время удерживания сдвигается и составляет 46,89 мин.

Фиг. 8a демонстрирует трипсин/Glu-C перевар дикого типа bG-CSF (детектирование на 250 нм). Фиг. 8b демонстрирует трипсин/Glu-C перевар bG-CSF T133pAF (детектирование на 250 нм). При анализе на 250 нм сигналы белок/пептид слабы, но сигнал, связанный с pAF, является сильным. Пептид, содержащий T133 pAF, указан на фиг. 8b со временем удерживания 46,89 мин.

Картирование пептида (эндопротеиназа Glu-C) bG-CSF.

Очищенную bG-CSF T133pAF до ПЭГи́лирования разбавляют до значений 6 M гуанидин-HCl, 50 mM Tris pH 7,8 и восстанавливают, используя 10 mM DTT при 37°C в течение 1 ч. Образец алкилируют, используя 20 mM IAA в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре, и реакцию гасят, добавляя 20 mM DTT. Полученный материал диализуют в 100 mM бикарбоната аммония pH 7,7 и обрабатывают Glu-C 1:20 (белок:фермент) в течение ночи при 25°C. Расщепление прекращают, добавляя TFA до конечной концентрации 0,1%. Полученный образец вводят в Grace Vydac C8 колонку с обращенной фазой в тандеме с масс-спектрометром ThermoFinnigan LCQ Deca с захватом ионов. Градиент начинают при 98% подвижной фазы А (0,05% TFA в воде) с изократическим элюированием в течение 8 мин и затем уменьшают до 60% подвижной фазы В (0,05% TFA в ацетонитриле) в течение 90 мин с детектированием на 214 и 250 нм. Скорость потока составляет 0,2 мл/мин и температура в колонке 40°C. Капиллярный вольтаж устанавливают 15 В и полный интервал сканирования 100-2000 m/z. Напряжение столкновения для MS/MS составляет 42% от нормализованного.

На фиг. 9a представлен Glu-C перевар дикого типа bG-CSF (детектирование на 214 нм). На фиг. 9b представлен Glu-C перевар bG-CSF T133pAF (детектирование на 214 нм). Для дикого типа bG-CSF пептид, содержащий T133, имеет время удерживания 52,04 мин; для T133pAF bG-CSF, пептида, содержащего T133pAF, время удерживания составляет 53,95 мин.

На фиг. 10a представлен Glu-C перевар дикого типа bG-CSF (детектирование на 250 нм). На фиг. 10b представлен Glu-C перевар bG-CSF T133pAF (детектирование на 250 нм). При анализе на длине волны 250 нм сигналы белок/пептид слабые, но сигнал pAF является сильным. Пептид, содержащий T133

pAF, представлен на фиг. 10b с временем удерживания 53,95 мин.

Анализ полипептидов bG-CSF с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой и эксклюзионной ВЭЖХ.

RP-HPLC и SEC-HPLC используют для анализа степени чистоты и для определения идентичности образцов после очистки. Очищенный 20К ПЭГ-bG-CSF T133pAF разбавляют до 1 мг/мл в буфере для приготовления лекарственного состава (4,26 мМ натрий ацетат pH 4,0, 0,565 мМ хлорид натрия, 0,0033% Tween-20 и 5% сорбит) и 10 мл вводят в колонку с обращенной фазой (J.T. Baker wide pore Octyl (C8)) (4,6×100 мм, 5 мкм). Градиент начинают с 50% подвижной фазы А (0,1% TFA в воде) и снижают до 70% подвижной фазы В (0,1% TFA в ацетонитриле) за 26 мин. Колонку восстанавливают, используя 90% подвижной фазы В в течение 4 мин и заново уравнивая 50% подвижной фазой А в течение 5 мин. Используют скорость потока 1,5 мл/мин и температуру в 60°C с детектированием на 214 нм. Анализ осуществляют, используя программное обеспечение Agilent Chemstation. В табл. 3 представлен основной пик (20К ПЭГ-bG-CSF T133pAF) с временем удерживания 8,50 мин. Расчет процента площади показал, 91,2% образца составляет ПЭГилированный-b-GCSF.

Таблица 3

| Время (минуты) | Площадь       | Площадь %   |
|----------------|---------------|-------------|
| 4.2            | 50.6          | 0.6         |
| 5.0            | 20.0          | 0.3         |
| 6.8            | 155.2         | 2.0         |
| 7.3            | 99.7          | 1.3         |
| 8.0            | 121.2         | 1.5         |
| <b>8.5</b>     | <b>7245.0</b> | <b>91.2</b> |
| 9.3            | 87.9          | 1.1         |
| 9.7            | 31.9          | 0.4         |
| 10.1           | 135.5         | 1.7         |

bG-CSF, который не был ПЭГилирован, также анализируют с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. В табл. 4 представлен основной пик (bG-CSF T133pAF) с временем удерживания 8,893 мин. При расчете процента площадей оказывается, что 64,3% образца составляют bG-CSF T133pAF.

Таблица 4

| Время (минуты) | Площадь       | Площадь %   |
|----------------|---------------|-------------|
| 5.6            | 114.3         | 1.6         |
| 7.4            | 17.4          | 0.2         |
| 8.1            | 12.2          | 0.2         |
| 8.2            | 13.6          | 0.2         |
| 8.3            | 13.7          | 0.2         |
| <b>8.9</b>     | <b>4622.1</b> | <b>64.3</b> |
| 9.3            | 930.8         | 13.0        |
| 10.2           | 13.9          | 0.2         |
| 10.3           | 12.9          | 0.2         |
| 10.8           | 1151.5        | 16.0        |
| 11.1           | 273.9         | 3.8         |
| 11.8           | 10.0          | 0.1         |

Очищенный 20К ПЭГ-bG-CSF T133pAF также анализируют, используя эксклюзионную ВЭЖХ. Чистый образец (2 мкл) вводят в колонку Tosohaas TSK Super SW3000 размером (4,6×300 мм, 4 мкм 250 Å), используя 25 мин изократический градиент. Подвижная фаза содержит 97% 63 мМ фосфата натрия pH 7,0 и 3% 2-пропанола. Скорость потока 0,3 мл/мин и температура внутри колонки 25°C с детектированием на 214 нм. Анализ осуществляют, используя программное обеспечение Agilent Chemstation. В табл. 5 представлен основной пик с временем удерживания 9,157 мин. При расчете площадей оказалось, что 98,3% образца составляет мономерный ПЭГ-bG-CSF; см. фиг. 11 для эксклюзионного ВЭЖХ анализа ПЭГилированного полипептида.

Таблица 5

| Время (минуты) | Площадь        | Площадь %   |
|----------------|----------------|-------------|
| 7.0            | 50.3           | 0.1         |
| 8.2            | 228.0          | 0.6         |
| <b>9.2</b>     | <b>36454.5</b> | <b>98.3</b> |
| 10.1           | 361.4          | 1.0         |

bG-CSF, который не был ПЭГилирован, также анализируют, используя эксклюзионную ВЭЖХ. В табл. 6 представлен основной пик с временем удерживания 13,125 мин. При расчете процента площадей оказалось, что 99,0% образца составляет мономерный bG-CSF T133pAF; см. фиг. 12 для эксклюзионного ВЭЖХ анализа полипептида.

Таблица 6

| Время (минуты) | Площадь | Площадь % |
|----------------|---------|-----------|
| 10.4           | 10.0    | 0.0       |
| 11.1           | 6.8     | 0.0       |
| 11.7           | 178.2   | 0.5       |
| 12.6           | 129.5   | 0.4       |
| 13.1           | 33514.3 | 99.0      |

ESI-TOF высокоточный анализ (Agilent Technology) полипептида bG-CSF также осуществляют для подтверждения идентичности полипептида bG-CSF. Очищенный bG-CSF T133pAF диализуют в 0,1% муравьиной кислоте. Образец вводят в C-18 картридж в течение 1 мин с водой, а затем элюируют 50%

ацетонитрилом в воде. Полное время цикла составляет 3 мин, скорость потока - 0,3 мл/мин. ESI капиллярный вольтаж устанавливают 4 кВ и вольтаж MSTOF фрагментера устанавливают 300 В. Сканированную кривую зарядов развертывают для получения значения MH+. Ожидаемое значение MH+MM составляет 19145. В результате получают MH+MM 19146.

Анализ пролиферации M-NFS60.

Для оценки эффективности bG-CSF молекул осуществляют анализ пролиферации для клеточной линии M-NFS60. Клеточную линию получают из ATCC (№ в каталоге CRL-1838). Клетки оттаивают и сохраняют в среде RPMI1640 + 10%FBS + пенициллин/стрептомицин + 50 мкМ 2-меркаптоэтанола + 20 нг/мл mIL-3 (Invitrogen, Carlsbad, CA; mIL3 от BD Pharmingen cat#554579). Клетки разводят каждые два дня и высевают при плотности  $0,02 \times 10^6$  клеток/мл.

В день накануне анализа клетки разводят до  $0,1 \times 10^6$  клеток/мл. Через 16-24 ч клетки высевают в аналитическую среду в черные плоскодонные 96-луночные планшеты в концентрации 10000 клеток/луночку и добавляют серийные разбавления bG-CSF соединения (в двух экземплярах). Полный объем в лунке составляет 100 мкл, и используют аналитическую среду RPMI 1640 + 10% FBS + P/S. Добавляют стандарты, такие как Neupogen® и WT bG-CSF, в двух экземплярах для каждого планшета. Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 42 ч. После 42-часового инкубирования добавляют 10 мкл/луночку Alamar Blue (Biosource cat #: DAL1100) и планшеты инкубируют еще 6 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Планшеты вращают со скоростью 4000 об/мин в течение 2 мин при комнатной температуре, чтобы полностью избавиться от воздушных пузырьков. Результаты считывают, используя флуориметр Tecan с параметрами длины волны возбуждения 535 нм и эмиссии на 590 нм. Планшеты заворачивают в фольгу, чтобы избежать экспонирования свету светочувствительного красителя Alamar Blue.

Для анализа результатов дублированные серийные разбавления для каждого соединения усредняют и величины EC50 рассчитывают, используя Sigma Plot. Необработанные значения EC50 перечислены для всех соединений, и рассчитывают кратность различий (ПЭГилированные бычьи GCSF сравнивают с WT bG-CSF). Эксперименты проводят несколько раз для оценки среднестатистической погрешности CV<20% и вариативности результатов CV<30%. Фиг. 13/табл. 7=M-NFS60 анализ пролиферации - необработанные данные анализа пролиферации EC50 значения для 20К ПЭГилированных бычьих G-CSF T133pAF и для дикого типа. Фиг. 14/табл. 8=M-NFS60 анализ пролиферации - кратность EC50 разностей 20К ПЭГилированных бычьих G-CSF T133pAF относительно дикого типа.

Были проанализированы другие G-CSF молекулы, включающие замещение не кодируемой в природе аминокислотой. В табл. 9 представлены полученные средние значения EC50.

Таблица 7

|          |                  | Neupogen | Neulasta | WT bG-CSF | 20K PEG-bT133 [партия NK2] |
|----------|------------------|----------|----------|-----------|----------------------------|
| Описание | Avg EC50 [нг/мл] | 0.025    | 0.077    | 0.053     | 0.270                      |
|          | SD               | 0.005    | 0.004    | 0.005     | 0.042                      |
|          | CV               | 18%      | 5%       | 9%        | 16%                        |
|          | N                | 14       | 5        | 16        | 2                          |

Таблица 8

|          |                             | Neupogen | Neulasta | WT bG-CSF | 20K PEG-bT133 [партия NK2] |
|----------|-----------------------------|----------|----------|-----------|----------------------------|
| Описание | Кратность различий EC50 [X] | 1.0      | 3.2      | 1         | 5.1                        |
|          | SD                          | 0.0      | 0.7      | 0         | 0.5                        |
|          | CV                          | 0%       | 23%      | 0%        | 9%                         |
|          | N                           | 14       | 5        | 12        | 2                          |

Таблица 9

|                    | Avg EC50 значения | SD    | CV  |
|--------------------|-------------------|-------|-----|
| Neupogen           | 0.025             | 0.005 | 18% |
| WT bG-CSF          | 0.053             | 0.005 | 9%  |
| Neulasta           | 0.077             | 0.004 | 5%  |
| 20kPEG-bS62        | 0.150             | 0.008 | 5%  |
| 20kPEG-bT133 [NK1] | 0.258             | 0.045 | 17% |
| 20kPEG-bT133 [NK2] | 0.270             | 0.042 | 16% |
| 20kPEG-bR7         | 0.348             | 0.073 | 21% |
| 20kPEG-bR166       | 0.363             | 0.033 | 9%  |
| 20kPEG-bL3         | 0.477             | 0.081 | 17% |

Окрашивание бычьих нейтрофилов CD11b.

50 мкл бычьей крови помещают в необработанный полистирольный планшет (Cal Poly Pomona). Клетки стимулируют, добавляя 50 мкл Neupogen®, Neulasta® или bG-CSF-T133pAcF-20K ПЭГ, разбавленных в PBS (200 нг/мл до конечной концентрации 0,001 нг/мл). Полученный раствор осторожно пере-

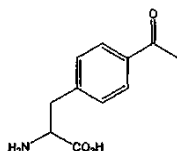


мешивают и инкубируют в течение 30 мин при 39°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. К клеткам добавляют 20 мкг/мл первичного антитела (мышинный антибычий CD11b: MM12A, VMRD). Клетки инкубируют при 4°C в течение 30 мин. Аналитический планшет центрифугируют при 800 g в течение 2 мин и надосадочную жидкость сливают. Эритроциты лизируют в течение 1 мин, добавляя 150 мкл холодного лизисного раствора (0,15 М фосфат, pH 7,2) и восстанавливают изотоничность, добавляя 50 мкл восстанавливающего раствора (0,15 М фосфат, 0,5 М NaCl, pH 7,4). Планшет снова центрифугируют и надосадочную жидкость сливают. Процедуру лизиса повторяют до удаления всех видимых эритроцитов. Клетки дважды промывают 200 мкл FACS буфера (1×PBS, 2,5 мМ HEPES, 0,1% азида натрия, 2,0% FBS) и снова суспендируют в 100 мкл FACS буфера. Добавляют 20 мкг/мл вторичного антитела (козий антмышинный IgG1, человеческий ads-PE) и инкубируют при 4°C в течение 30 мин в темноте. Клетки осаждают и промывают дважды, затем снова суспендируют в 200 мкл FACS буфера. Используют прибор BD FACS Аrtaу для накопления 50000 результатов и подсчитывают позитивные CD11b клетки.

На фиг. 15 представлены результаты эксперимента, в котором бычьи нейтрофилы окрашивают CD11b антителом для оценки их реакционных способностей в отношении различных молекул. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для гранулоцитов используют для определения уровня CD11b презентации на поверхности клеток. Процент MFI представляет собой нормализованное значение относительно нестимулированной контрольной группы. Дозо-зависимые кривые и значения EC50 получены для Neupogen, Neulasta и bG-CSF T133pAF-20K ПЭГ с использованием 4-параметрической подгонки. Значение EC50 для Neupogen® составило 3,18 нг/мл. Для Neulasta® значение EC50 составило 2,84 нг/мл и для bG-CSF T133pAF-20K ПЭГ значение EC50 составило 6,23 нг/мл.

Пример 3. Введение карбонилсодержащей аминокислоты и последующая реакция с аминоксисодержащим ПЭГ.

Этот пример демонстрирует способ создания полипептида bG-CSF, в котором встраивают кетонсодержащую не кодируемую в природе аминокислоту, которая затем реагирует с аминоксисодержащим ПЭГ с MM приблизительно 5000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF) отдельно замещены не кодируемой в природе аминокислотой следующей структуры:

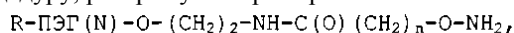


Последовательности, использованные для сайт-специфического встраивания п-ацетилфенилаланина в bG-CSF, представляют собой SEQ ID NO: 3 или 4 (bG-CSF), и SEQ ID NO: 23 или 5 (mutfRNA, M. janaschii mtRNA<sup>Tyr<sub>CUA</sub></sup>), и SEQ ID NO: 22, 24, 17, 18, 19 (TyrRS LW11, 5 или 6), раскрытые в примере 2 (см. выше).

После модификации вариант полипептида bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, подвергают взаимодействию с производным аминоксисодержащего ПЭГ формы: R-ПЭГ(N)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-NH<sub>2</sub>, где R представляет собой метил, n равно 3 и MM для N составляет приблизительно 5000. Очищенный b-GCSF, содержащий п-ацетилфенилаланин, растворенный до 10 мг/мл в 25 мМ MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 мМ Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, или в 10 мМ ацетата натрия (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, подвергают взаимодействию с 10-100-кратным избытком аминоксисодержащего ПЭГ и затем перемешивают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, p. 475). Затем ПЭГ-b-GCSF разбавляют в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 4. Конъюгирование с ПЭГ, состоящим из группы гидроксилamina, связанного с ПЭГ амидной связью.

Реагент ПЭГ следующей структуры присоединяют к кетонсодержащей не кодируемой в природе аминокислоте, используя процедуру, раскрытую в примере 3:



где R=метил;

n=4 и

MM для N составляет приблизительно 20000.

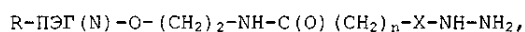
Условия реакции, очистки и анализа такие же, как в примере 3.

Пример 5. Введение двух различных не кодируемых в природе аминокислот в полипептиды bG-CSF.

Этот пример демонстрирует способ создания полипептида bG-CSF, который встраивает не кодируемые в природе аминокислоты, включающие кетонную функциональность, в два положения среди следующих остатков: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF). Полипептид bG-CSF получают по способу примеров 1 и 2, за исключением того, что селективный кодон встроено в два различных сайта в нуклеиновой кислоте.

Пример 6. Конъюгирование полипептида bG-CSF гидразидсодержащим ПЭГ и последующее *in situ* восстановление.

Полипептид bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, получают по способу примеров 2 и 3. Будучи модифицирован, гидразидсодержащий ПЭГ следующей структуры конъюгируют с полипептидом bG-CSF:



где R=метил;

n=2;

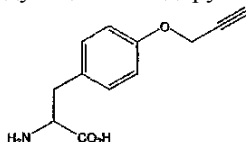
MM для N=10000 и

X представляет собой карбонильную (C=O) группу.

Очищенный b-GCSF, содержащий *p*-ацетилфенилаланин, растворяют до концентрации 0,1-10 мг/мл в 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, или в 10 mM ацетата натрия (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, подвергают взаимодействию с 1-100-кратным избытком гидразидсодержащего ПЭГ и соответствующий гидразон восстанавливают *in situ*, добавляя исходный 1 M NaCNBH<sub>3</sub> (Sigma Chemical, St. Louis, MO), растворенный в H<sub>2</sub>O до конечной концентрации 10-50 mM. Реакции ведут в темноте при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение 18-24 ч. Реакции останавливают, добавляя 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) при около pH 7,6 до конечной Tris концентрации 50 mM, или разбавляют в соответствующем буфере для немедленной очистки.

Пример 7. Введение алкилсодержащей аминокислоты в полипептид bG-CSF и получение производных с использованием *m*-ПЭГ-азида.

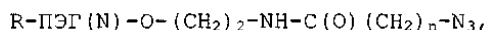
Следующие остатки, перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF), каждый замещают следующей не кодируемой в природе аминокислотой:



Последовательности, использованные для сайт-специфического встраивания *p*-пропаргил-тирозина в bG-CSF, представляют собой SEQ ID NO: 3 или 4, SEQ ID NO: 5 (muttRNA, *M. jannaschii* mtRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub>) и 10, 11, 12, раскрытые выше в примере 2. Полипептид bG-CSF, содержащий пропаргил-тирозин, экспрессируют в *E. coli* и очищают, используя условия, раскрытые в примере 3.

Очищенный bG-CSF, содержащий пропаргил-тирозин, растворяют до концентрации 0,1-10 мг/мл в PB буфере (100 mM натрийфосфата, 0,15 M NaCl, pH 8) и к реакционной смеси добавляют 10-1000-кратный избыток азидсодержащего ПЭГ. Затем к реакционной смеси добавляют каталитическое количество CuSO<sub>4</sub> и стружку Cu. После инкубирования смеси (включая, без ограничения, около 4 ч при комнатной температуре или при 37°C либо в течение ночи при 4°C) добавляют H<sub>2</sub>O и полученную смесь фильтруют через диализную мембрану. Полученные образцы можно анализировать в отношении присоединения, включая, без ограничения, процедуры, раскрытые в примере 3. В этом примере ПЭГ имеет

следующую структуру:



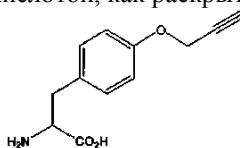
где R представляет собой метил;

n= 4 и

ММ для N составляет 10000.

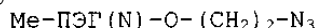
Пример 8. Замещение крупной, гидрофобной аминокислоты в полипептиде bG-CSF пропаргил-тирозином.

Phe, Tpr или Tug остаток, присутствующий в одном из следующих участков bG-CSF: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любой их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF), замещают следующей не кодируемой в природе аминокислотой, как раскрыто в примере 7:



После модификации ПЭГ присоединяют к варианту полипептида bG-CSF, включающему алкинсодержащую аминокислоту.

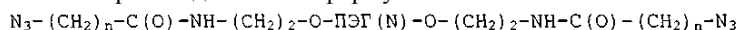
ПЭГ имеет следующую структуру:



и осуществляют присоединение по способу примера 7. В результате получают вариант полипептида bG-CSF, включающий не кодируемую в природе аминокислоту, которая является приблизительно изоэлектрической в отношении одной из природных, крупных гидрофобных аминокислот и которая модифицирована производным ПЭГ в различных сайтах внутри полипептида.

Пример 9. Создание полипептидных bG-CSF гомодимеров, гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров, разделенных одним или более из ПЭГ линкеров.

Алкинсодержащий вариант полипептида bG-CSF, полученный в примере 7, подвергают взаимодействию с бифункциональным производным ПЭГ формулы



где n=4 и

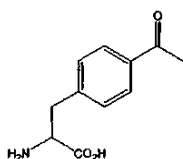
ПЭГ имеет среднюю ММ приблизительно 5000,

для создания соответствующего полипептидного bG-CSF гомодимера, в котором две bG-CSF молекулы физически разделены ПЭГ. Аналогичным образом полипептид bG-CSF можно присоединить к одному или более из других полипептидов с образованием гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров.

Присоединение, очистку и анализ осуществляют по способу примеров 7 и 3.

Пример 10. Присоединение сахаридной молекулы к полипептиду bG-CSF.

Один из следующих приведенных далее остатков замещен не кодируемой в природе аминокислотой: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2 либо соответствующие аминокислоты в других полипептидах bG-CSF), как раскрыто в примере 3.

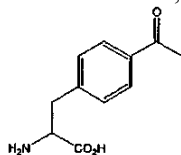


После модификации вариант полипептида bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, подвергают взаимодействию с β-связанным аминоксианалогом N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

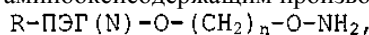
Вариант полипептида bG-CSF (10 мг/мл) и аминокиссахарид (21 мМ) смешивают в водном 100 мМ натрийацетатном буфере (рН 5,5) и инкубируют при 37°C в течение 7-26 ч. Второй сахарид присоединяют к первому ферментативно, инкубируя конъюгированный с сахаридом полипептид bG-CSF (5 мг/мл) с UDP-галактозой (16 мМ) и  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазой (0,4 ед./мл) в 150 мМ HEPES буфере (рН 7,4) в течение 48 ч при комнатной температуре (Schanbacher et al., J. Biol. Chem., 1970, 245, 5057-5061).

Пример 11. Создание антагониста ПЭГилированного полипептида bG-CSF.

Остатки, включая, без ограничения, те, которые участвуют в связывании рецептора bG-CSF, замещают следующей не кодируемой в природе аминокислотой, как раскрыто в примере 3.



После модификации вариант полипептида bG-CSF, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, подвергают взаимодействию с аминокислосодержащим производным ПЭГ формулы



где R представляет собой метил;

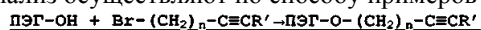
$n=4$  и

ММ для N составляет 20000,

для создания антагониста полипептида b-GCSF, включающего не кодируемую в природе аминокислоту, которая модифицирована производным ПЭГ по одному сайту внутри полипептида. Присоединение, очистку и анализ осуществляют по способу примера 3.

Пример 12. Создание гомодимера, гетеродимера, гомомультимера или гетеромультимера полипептида bG-CSF, в которых bG-CSF молекулы связаны непосредственно.

Вариант полипептида bG-CSF, включающий алкинсодержащую аминокислоту, можно непосредственно присоединить к другим вариантам полипептида bG-CSF, включающего азидосодержащую аминокислоту. Аналогичным образом полипептид bG-CSF можно присоединить к одному или более из других полипептидов с образованием гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров. Присоединение, очистку и анализ осуществляют по способу примеров 3, 6 и 7.



Пример 13.

Полиалкиленгликоль (Р-ОН) подвергают взаимодействию с алкилгалогенидом (А) с образованием простого эфира (В). В указанных соединениях n представляет собой целое число от одного до девяти и R' может быть неразветвленной или разветвленной цепью или насыщенной или ненасыщенной C1-C20 алкильной или гетероалкильной группой. R' может также быть C3-C7 насыщенной или ненасыщенной циклической алкильной или циклической гетероалкильной, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенной или незамещенной алкарильной (где алкил может быть C1-C20 насыщенным или ненасыщенным алкилом) или гетероалкарильной группой. Обычно ПЭГ-ОН представляет собой полиэтиленгликоль(ПЭГ) или монометоксиполиэтиленгликоль (тПЭГ) с молекулярной массой от 800 до 40000 Да.

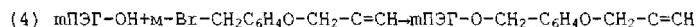
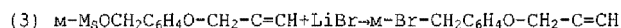
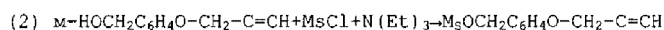
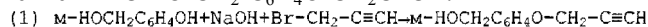
Пример 14.  $m\text{ПЭГ-ОН} + \text{Br-}(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{ПЭГ-O-}(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{CH}$

m-ПЭГ-ОН с молекулярной массой 20000 Да (тПЭГ-ОН 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывают NaH (12 мг, 0,5 ммоль) в THF (35 мл). Раствор пропаргилбромида приготавливают как 80 вес.% раствор в ксилоле (0,56 мл, 5 ммоль, 50 экв., Aldrich), к раствору добавляют каталитическое количество KI и полученную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 2 ч. Затем добавляют воду (1 мл) и растворитель удаляют в вакууме. К остатку добавляют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органический слой выделяют, сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и объем уменьшают приблизительно до 2 мл. Полученный  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  раствор добавляют к диэтиловому эфиру (150 мл) по каплям. Образовавшийся осадок собирают, промывают несколькими порциями холодного диэтилового эфира и сушат, получая пропаргил-О-ПЭГ.

Пример 15.  $m\text{ПЭГ-ОН} + \text{Br-}(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{ПЭГ-O-}(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{CH}$

m-ПЭГ-ОН с молекулярной массой 20000 Да (m-ПЭГ-ОН 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывают NaH (12 мг, 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл). К смеси добавляют 50 экв. 5-бром-1-пентина (0,53 мл, 5 ммоль, Aldrich) и каталитическое количество KI. Полученную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 16 ч. Затем добавляют воду (1 мл) и растворитель удаляют в вакууме. К остатку добавляют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органический слой выделяют, сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и объем уменьшают до приблизительно 2 мл. Полученный  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  раствор добавляют к диэтиловому эфиру (150 мл) по каплям. Образовавшийся осадок собирают, промывают несколькими порциями холодного диэтилового эфира и сушат, получая соответствующий алкин. В аналогичной реакции можно использовать 5-хлор-1-пентин.

Пример 16. Получение  $m$ -ПЭГ-О-СН<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>H<sub>4</sub>О-СН<sub>2</sub>С≡СН.



К раствору 3-гидроксibenзилового спирта (2,4 г, 20 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воде (2,5 мл) вначале добавляют порошок гидроксида натрия (1,5 г, 37,5 ммоль) и затем раствор пропаргилбромида, растворенного как 80 вес.% раствор в ксилоле (3,36 мл, 30 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 6 ч. К смеси добавляют 10% лимонную кислоту (2,5 мл) и растворитель удаляют в вакууме. Остаток экстрагируют этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором NaCl (10 мл), сушат над MgSO<sub>4</sub> и концентрируют до получения 3-пропаргилоксибензилового спирта.

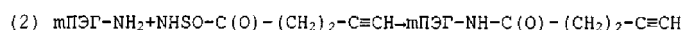
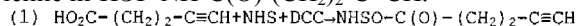
Метансульфонилхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) и триэтиламин (2,8 мл, 20 ммоль) добавляют к раствору соединения 3 (2,0 г, 11,0 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при 0°С и реакционную смесь помещают в холодильник на 16 ч. В результате обычной обработки получают мезилат в виде масла желтого цвета. Это масло (2,4 г, 9,2 ммоль) растворяют в ТГФ (20 мл) и добавляют LiBr (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 1 ч и затем охлаждают до комнатной температуры. К полученной смеси добавляют воду (2,5 мл) и растворитель удаляют в вакууме. Остаток экстрагируют этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором NaCl (10 мл), сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрируют до получения целевого бромида.

$m$ -ПЭГ-ОН 20 кДа (1,0 г, 0,05 ммоль, Sunbio) растворяют в ТГФ (20 мл) и полученный раствор охлаждают на бане со льдом. NaN (6 мг, 0,25 ммоль) добавляют при интенсивном перемешивании в течение нескольких минут с последующим добавлением полученного выше бромида (2,55 г, 11,4 ммоль) и каталитического количества KI. Охлаждающую баню удаляют и полученную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 12 ч. К смеси добавляют воду (1/0 мл) и растворитель удаляют в вакууме. К остатку добавляют CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органический слой выделяют, сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и объем уменьшают до примерно 2 мл. Добавление по каплям к эфирному раствору (150 мл) вызывает образование осадка белого цвета, который собирают, получая производное ПЭГ.

Пример 17.  $m\text{ПЭГ-NH}_2 + \text{X-C (O) - (CH}_2)_n\text{-C}\equiv\text{CR}' \rightarrow m\text{ПЭГ-NH-C (O) - (CH}_2)_n\text{-C}\equiv\text{CR}$

Терминал алкинсодержащих полимеров поли(этиленгликоля) можно также получить, присоединяя полимер поли(этиленгликоля), содержащий концевую функциональную группу, к реакционноспособной молекуле, содержащей алкиновую функциональность, как представлено выше,  $n$  принимает значения от 1 до 10, R' может быть H или небольшой алкильной группой от C1 до C4.

Пример 18. Получение  $m$ -ПЭГ-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C≡СН.

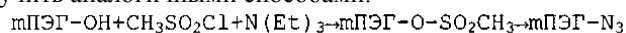


4-Пентиновую кислоту (2,943 г, 3,0 ммоль) растворяют в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл). Добавляют N-гидроксисукцинимид (3,80 г, 3,3 ммоль) и DCC (4,66 г, 3,0 ммоль) и полученный раствор перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Полученный сырой сложный эфир NHS 7 используют в следующей реакции без дополнительной очистки.

$m$ -ПЭГ-NH<sub>2</sub> с молекулярной массой 5000 Да ( $m$ -ПЭГ-NH<sub>2</sub>, 1 г, Sunbio) растворяют в ТГФ (50 мл) и полученную смесь охлаждают до 4°С. NHS эфир 7 (400 мг, 0,4 ммоль) добавляют порционно при интенсивном перемешивании. Смесь оставляют при перемешивании на 3 ч, при этом происходит нагревание до комнатной температуры. Затем добавляют воду (2 мл) и растворитель удаляют в вакууме. К остатку добавляют CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) и органический слой выделяют, сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и объем уменьшают до приблизительно 2 мл. Этот CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> раствор добавляют к простому эфиру (150 мл) по каплям. Полученный осадок собирают и сушат в вакууме.

Пример 19. Получение метансульфоната или мезилата поли(этиленгликоля).

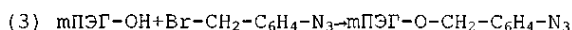
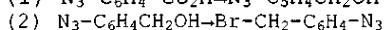
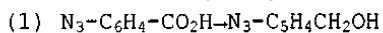
В этом примере раскрыто получение метансульфонилового эфира поли(этиленгликоля), который можно также называть как метансульфонат или мезилат поли(этиленгликоля). Соответствующие тозилат и галогениды можно получить аналогичными способами.



$m$ -ПЭГ-ОН (MM=3400, 25 г, 10 ммоль) в 150 мл толуола азеотропно перегоняют в течение 2 ч в атмосфере азота и полученный раствор охлаждают до комнатной температуры. 40 мл сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и 2,1 мл сухого триэтиламина (15 ммоль) добавляют к раствору. Раствор охлаждают на бане со льдом и 1,2 мл перегнанного метансульфонилхлорида (15 ммоль) добавляют по каплям. Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи и реакцию гасят, добавляя 2 мл абсолютного этанола. Смесь выпаривают в вакууме для удаления растворителей, преимущественно других, нежели толуол, фильтруют, снова концентрируют в вакууме и затем осаждают в 100 мл диэтилового эфира. Полученный фильтрат промывают несколькими порциями холодного диэтилового эфира и сушат в вакууме до получения мезилата.

Мезилат (20 г, 8 ммоль) растворяют в 75 мл ТГФ и полученный раствор охлаждают до 4°C. К охлажденному раствору добавляют азид натрия (1,56 г, 24 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 2 ч. Затем растворители выпаривают и остаток разбавляют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл). Органические фракции промывают раствором  $\text{NaCl}$  и сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ . Объем уменьшают до 20 мл и продукт осаждают, добавляя к 150 мл холодного сухого эфира.

Пример 20. Получение m-ПЭГ-О- $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}_3$ .



4-Азидобензиловый спирт можно получить, используя способ, раскрытый в патенте США 5998595, который включен в описание посредством ссылки. Метансульфонилхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) и триэтиламин (2,8 мл, 20 ммоль) добавляют к раствору 4-азидобензилового спирта (1,75 г, 11,0 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при 0°C и реакционную смесь помещают в холодильник на 16 ч. В результате обычной обработки получают мезилат в виде масла бледно желтого цвета. Это масло (9,2 ммоль) растворяют в ТГФ (20 мл) и добавляют  $\text{LiBr}$  (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 1 ч и затем охлаждают до комнатной температуры. К полученной смеси добавляют воду (2,5 мл) и растворитель удаляют в вакууме. Остаток экстрагируют этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  (10 мл), сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрируют до получения целевого бромида.

m-ПЭГ-ОН 20 кДа (2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывают  $\text{NaN}$  (12 мг, 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл) и к смеси добавляют бромид (3,32 г, 15 ммоль) вместе с каталитическим количеством  $\text{KI}$ . Полученную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 12 ч. К смеси добавляют воду (1,0 мл) и растворитель удаляют в вакууме. К остатку добавляют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органический слой выделяют, сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и объем уменьшают до приблизительно 2 мл. По каплям добавляют эфирный раствор (150 мл), что вызывает образование осадка, который собирают, получая m-ПЭГ-О- $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}_3$ .



Пример 21.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

$\text{NH}_2\text{-ПЭГ-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  (ММ 3400, 2,0 г) растворяют в насыщенном водном растворе  $\text{NaHCO}_3$  (10 мл) и полученный раствор охлаждают до 0°C. 3-Азидо-1-N-гидроксисукцинимидопропионат (5 экв.) добавляют при интенсивном перемешивании. Через 3 ч добавляют 20 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и смесь перемешивают еще дополнительные 45 мин при комнатной температуре. Величину pH доводят до 3, используя 0,5н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , и добавляют  $\text{NaCl}$  до концентрации приблизительно 15 вес.%. Реакционную смесь экстрагируют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл×3), сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрируют. После осаждения холодным диэтиловым эфиром продукт собирают фильтрованием и сушат в вакууме, получая омега-карбоксиязидное производное ПЭГ.

Пример 22.  $\text{mПЭГ-OMs+HC}\equiv\text{CLi-mПЭГ-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-H}$

К раствору ацетилида лития (4 экв.), полученному известным специалистам способом, охлажденному до -78°C в ТГФ, по каплям добавляют раствор m-ПЭГ-OMs, растворенного в ТГФ при интенсивном перемешивании. Через 3 ч реакционной смеси дают нагреться до комнатной температуры и гасят, добавляя 1 мл бутанола. Затем добавляют 20 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и полученную смесь перемешивают дополнительно 45 мин при комнатной температуре. Величину pH доводят до 3, используя 0,5н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , и  $\text{NaCl}$  добавляют до концентрации приблизительно 15 вес.%. Реакционную смесь экстрагируют  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл×3), сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрируют. После осаждение холодным диэтиловым эфиром продукт собирают фильтрованием и сушат в вакууме, получая 1-(бут-3-инилокси)метоксиполиэтиленгликоль (m-ПЭГ).

Пример 23. Встраивание азид- и ацетиленсодержащих аминокислот.

Азид- и ацетиленсодержащие аминокислоты можно сайт-селективно встроить в белки, используя способы, раскрытые L. Wang, et al. (2001), Science, 292: 498-500, J.W. Chin et al., Science, 301:9 64-7 (2003)), J.W. Chin et al. (2002), Journal of the American Chemical Society, 124: 9026-9027; J.W. Chin, & P.G. Schultz (2002), Chem Bio Chem., 3(11): 1135-1137; J.W. Chin, et al. (2002), PNAS United States of America, 99: 11020-11024 и L. Wang, & P.G. Schultz (2002), Chem. Comm., 1: 1-11. После того как аминокислоты встроены, реакцию циклоприсоединения осуществляют, используя 0,01 мМ белка в фосфатном буфере (PB), pH 8, в присутствии 2 мМ производного ПЭГ, 1 мМ  $\text{CuSO}_4$ , и ~1 мг стружек  $\text{Cu}$  в течение 4 ч при 37°C.

Пример 24. Синтез p-ацетил-D,L-фенилаланина (pAF) и m-ПЭГ-гидроксиламиновых производных.

Рацемические pAF синтезируют, используя процедуру, описанную ранее Zhang, Z., Smith, B.A.C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P.G., Biochemistry (2003) 42, 6735-6746.

Для синтеза m-ПЭГ-гидроксиламинового производного осуществляют следующую процедуру. К раствору (N-t-Вос-аминоокси)уксусной кислоты (0,382 г, 2,0 ммоль) и 1,3-диизопропилкарбодиимида (0,16 мл, 1,0 ммоль) в дихлорметане (DCM, 70 мл), который перемешивают при комнатной температуре (RT) в течение 1 ч, добавляют метокси-полиэтиленгликольамин (m-ПЭГ- $\text{NH}_2$ , 7,5 г, 0,25 ммоль, Mt. 30K

от BioVectra) и диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 48 ч и затем концентрируют до около 100 мл. Полученную смесь добавляют по каплям к холодному эфиру (800 мл). t-Вос-защищенный продукт выпадает в осадок и его собирают фильтрованием, промывают эфиром 3×100 мл. Очищают далее, снова растворяя в DCM (100 мл) и осаждая в эфире (800 мл) дважды. Полученный продукт сушат в вакууме, получая 7,2 г (96%), идентичность подтверждена по данным ЯМР и нингидринового теста.

Удаление защитных групп у полученного выше Вос-защищенного продукта (7,0 г) осуществляют в 50% TFA/DCM (40 мл) при 0°C в течение 1 ч и затем при комнатной температуре в течение 1,5 ч. После удаления большей части TFA в вакууме TFA соль производного гидроксилamina превращают в HCl соль, добавляя к остатку 4н. HCl в диоксане (1 мл). Осадок растворяют в DCM (50 мл) и снова осаждают в эфире (800 мл). Конечный продукт (6,8 г, 97%) собирают фильтрованием, промывают эфиром 3×100 мл, сушат в вакууме, хранят в атмосфере азота. Другие гидроксилaminовые производные ПЭГ (5К, 20К) синтезируют тем же способом.

Пример 25. *In vitro* и *in vivo* активность ПЭГилированных bG-CSF.

ПЭГ-bG-CSF, немодифицированные bG-CSF и буферный раствор вводят мышам или крысам. Результаты демонстрируют превосходную активность и пролонгированное время полужизни ПЭГилированных bG-CSF по настоящему изобретению по сравнению с немодифицированными bG-CSF, о чем свидетельствует значительное увеличение количества нейтрофилов и сдвиг количества лейкоцитов в сторону максимума при одинаковых вводимых мышам дозах.

Фармакокинетические анализы.

Полипептид bG-CSF по настоящему изобретению вводят мышам внутривенно или подкожно. У животных отбирают кровь до введения дозы и после в определенные моменты времени. Собирают плазму из каждого из образцов и анализируют, используя радиоиммуноанализ. Элиминирование времени полужизни можно рассчитать и сравнить между полипептидами bG-CSF, включающими не кодируемую в природе аминокислоту и дикого типа bG-CSF или различными формами полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению. Аналогично, полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению можно вводить *supra* обезьянам. У животных отбирают кровь до введения дозы и после в определенные моменты времени. Собирают плазму из каждого из образцов и анализируют, используя радиоиммуноанализ.

Полипептиды по настоящему изобретению можно вводить животным, используемым в моделях заболевания. Исследования на животных, которые можно осуществить, включают заражение скота *Pasteurella hemolytica*, бактериальное заражение скота маститом молочной железы (*Klebsiella пневмония*). Другие исследования, которые можно осуществить, оценивают контроль, заболеваемость и длительность бычьих респираторных заболеваний или профилактику *coliform mastitis*. Методы оценки здоровья животных, производительности молока, количества нейтрофилов и других параметров хорошо известны специалистам в данной области. Другие модели, которые можно использовать для оценки полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению, включают, без ограничения, животные модели инфицирования или экспонирования инфекции, такие как модель на хомячках пневмонии *Pseudomonas aeruginosa*, модель на крысах пиелонефрита *Candida albicans*, модель на новорожденных жеребятках и модели на растущих поросятах. Некоторые из указанных моделей раскрыты в патентах США № 5849883 и WO 89/10932. Такие модели, как указанные выше, хорошо известны специалистам в данной области.

<sup>3</sup>Н-тимидиновый анализ.

<sup>3</sup>Н-тимидиновый анализ осуществляют, используя стандартные методы. Костный мозг получают из умерщвленных самок мышей штамма Balb C или из других животных. Клетки костного мозга коротко суспендируют, центрифугируют и снова суспендируют в среде для роста. В каждую лунку 96-дуночного микротитровального планшета помещают аликвоту в 160 мкл, содержащую приблизительно 10000 клеток. Образцы очищенных аналогов G-CSF (как получено выше) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 68 ч. В лунки добавляют меченный тритием тимидин и оставляют в инкубаторе еще на пять дополнительных часов. После 5 ч инкубирования клетки собирают, фильтруют и тщательно промывают. Фильтры добавляют в ампулу, содержащую сцинтилляционную жидкость. Подсчитывают бета-эмиссию (сцинтилляционный счетчик LKB Beta plate). Стандарты и аналоги анализируют трижды и образцы, результаты для которых попадают выше или ниже стандартной кривой, снова анализируют с соответствующими разбавлениями. Результаты представляют как среднее из трех аналогичных результатов относительно стандартных результатов для неизмененных bG-CSF.

Индукция пролиферации клеток костного мозга человека анализируют, используя увеличение встраивания <sup>3</sup>Н-тимидина. Клетки человеческого костного мозга от здоровых доноров разделяют по плотности, используя Ficoll-Нугаке (1,077 г/мл, Pharmacia), и клетки низкой плотности суспендируют в среде Искова (GIBCO), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и глутамин пенициллин-стрептомицин. Затем 2×10<sup>4</sup> клеток человеческого костного мозга инкубируют или в контрольной среде или с рекомбинантным, полученным из *E. Coli*, bG-CSF материалом в 96-ячеечных плоскодонных планшетах при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> на воздухе в течение 2 дней. Образцы анализируют в двойном экземпляре и концентрации изменяют в 10000-кратном интервале. Культуры бомбардируют в течение 4 ч, используя

0,5 мкКюри/лунку  $^3\text{H}$ -тимидина (New England Nuclear, Boston, Mass.). Захват  $^3\text{H}$ -тимидин определяют по способу Venuta, et al., Blood, 61, 781 (1983).

Индукция дифференцирования WEHI-3В D<sup>+</sup>.

Способность полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению индуцировать дифференцирование мышинной клеточной линии миеломоноцитной лейкемии WEHI-3В D<sup>+</sup> оценивают в среде полутвердого агара, как раскрыто у Metcalf, Int. J. Cancer, 25, 225 (1980). Продукт рекомбинантных bG-CSF и контрольные среды инкубируют в количестве около 60 WEHI-3В D<sup>+</sup> клеток/лунку при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> на воздухе в течение 7 дней. Образцы инкубируют в 24-луночных плоских планшетах, причем концентрации меняют в 2000-кратном интервале. Колонии классифицируют как недифференцированные, частично недифференцированные или полностью дифференцированные и количество клеток в колониях подсчитывают, используя микроскоп.

CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM анализы.

Было обнаружено, что природные изоляты человеческих G-CSF и hG-CSF вызывают пролиферацию и дифференциацию человеческих клеток костного мозга. Указанные активности измеряют, используя CFU-GM [Broxmeyer, et al., Exp. Hematol., 5, 87, (1971)], BFU-E и CFU-GEMM анализы [Lu, et al., Blood, 61, 250 (1983)], используя низкой плотности, не прилипающие клетки костного мозга от здоровых добровольцев. Можно использовать клетки из других источников. Осуществляют сравнение CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM биологических активностей, используя или 500 единиц G-CSF или полипептидов bG-CSF по настоящему изобретению.

Анализ колоний осуществляют, используя низкой плотности, не прилипающие клетки костного мозга. Человеческие клетки костного мозга разделяют по плотности, используя Ficoll-Нураке (плотность, 1,077 г/см<sup>3</sup>; Pharmacia). Затем клетки низкой плотности снова суспендируют в среде Искова, модифицированной средой Дульбекко, содержащей фетальную телячью сыворотку, и помещают для прилипания на чашки Петри (Falcon) (№ 3003, Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) на 1,5 ч при 37°C.

Контрольная среда состоит из среды Искова, модифицированной средой Дульбекко плюс 10% FCS, 0,2 mM гемина и 1 ед. рекомбинантного эритропоэтина. Для CFU-GM анализа клетки-мишени высевают в количестве  $1 \times 10^5$  в 1 мл 0,3% агарную культуральную среду, которая дополнена средой McCoу 5A и 10% термоинактивированной фетальной телячьей сывороткой. Культуры подсчитывают по колониям (более чем 40 клеток в агрегате) и морфологию оценивают на 7 день культивирования. Количество колоний представлено как среднее  $\pm$  SEM по данным для четырех экземпляров планшетов.

Для BFU-E и CFU-GEMM анализов клетки ( $1 \times 10^5$ ) добавляют к 1 мл смеси среды Искова, модифицированной средой Дульбекко (Gibco), 0,8% метилцеллюлозы, 30% фетальной телячьей сыворотки, 0,05 нМ 2-меркаптоэтанола, 0,2 mM гемина и 1 ед. рекомбинантного эритропоэтина. Чашки инкубируют во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Низкое давление кислорода обеспечивают, используя кислородный редуктор от Reming Bioinstruments (Syracuse, N.Y.). Колонии подсчитывают после 14 дней инкубирования. Количество колоний определяют как среднее  $\pm$  SEM с учетом двух экземпляров планшетов.

Ожидается, что все колонии, образовавшиеся в CFU-GM анализе, должны быть хлорацетатэстераза-позитивными и в отношении неспецифической эстеразы (альфа-нафтилацетатэстеразы) негативными, что соответствует колониям гранулоцитарного типа. Ожидается, что природные G-CSF и полипептиды bG-CSF по настоящему изобретению должны иметь специфическую активность приблизительно  $1 \times 10$  ед/мг чистого белка при анализе серийных разбавлений в CFU-GM анализе. Важно отметить, что bG-CSF по настоящему изобретению могут быть очень чистыми и не содержать других потенциальных факторов роста млекопитающих за счет их продуцирования в E. coli. Так, bG-CSF способны поддерживать смешанное колониеобразование (CFU-GEMM) и BFU-E, будучи добавлены в присутствии рекомбинантного эритропоэтина.

Измерения *in vivo* времени полужизни конъюгированных и неконъюгированных bG-CSF и их вариантов. Используют самцов крыс штамма Male Sprague Dawley (возраст около 7 недель). В день введения измеряют вес каждого животного. 100 мкг/кг веса тела каждого неконъюгированных и конъюгированных образцов bG-CSF вводят внутривенно в хвостовые вены трех крыс. Через 1, 30 мин, 1, 2, 4, 6 и 24 ч после инъекции у каждой из крыс отбирают по 500 мкл крови под CO<sub>2</sub>-анестезией. Образцы крови хранят при комнатной температуре в течение 1,5 ч с последующим выделением сыворотки центрифугированием (4 С, 18000×g, 5 мин). Образцы сыворотки хранят при -80°C до дня анализа. Количество активного bG-CSF в образцах сыворотки квалифицируют по анализу bG-CSF *in vitro* активности после оттаивания образцов на льду.

Измерение *in vivo* биологической активности у здоровых крыс конъюгированного и неконъюгированного bG-CSF и их вариантов.

Измерение *in vivo* биологических эффектов bG-CSF у крыс штамма SPF Sprague Dawley используют для определения биологической эффективности конъюгированного и неконъюгированного bG-CSF и их вариантов. В день прибытия крыс произвольно разделяют на группы по 6 крыс в каждой. Животные отдыхают в течение 7 дней, после чего отбраковывают крыс в плохом состоянии или с экстремальным весом. Интервал весов крыс в начале периода отдыха составлял 250-270 г.



В день введения крысам не дают пищи в течение 16 ч, после чего подкожно вводят инъекцию 100 мкг на 1 кг веса тела bG-CSF или его варианта. Каждый bG-CSF образец вводят инъекцией группе из 6 произвольных крыс. Образцы крови 300 мкг EDTA стабилизированной крови отбирают из хвостовой вены крыс перед тем, как вводят дозу, и затем через 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 и 144 ч после введения дозы. Образцы крови анализируют по следующим гематологическим параметрам: гемоглобин, количество эритроцитов, гематокрит, средний объем клеток, средняя концентрация клеток гемоглобина, среднее количество гемоглобина, количество лейкоцитов, дифференциальное количество лейкоцитов (нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов). На основании указанных измерений оценивают биологическую эффективность конъюгированного и неконъюгированного bG-CSF и их вариантов.

Измерения *in vivo* биологической активности у крыс с индуцированной химиотерапией нейтропенией конъюгированных и неконъюгированных bG-CSF и их вариантов.

Для этого анализа используют крыс штамма SPF Sprague Dawley. В день прибытия крыс произвольно разделяют на группы по 6 крыс в каждой. Животные отдыхают в течение 7 дней, после чего отбраковывают крыс в плохом состоянии или экстремального веса. Интервал весов крыс в начале периода отдыха составлял 250-270 г.

За 24 ч перед введением образцов bG-CSF крысам вводят внутривенно 50 мг на 1 кг веса тела циклофосамида (CPA) для индуцирования нейтропении, которая имитирует нейтропению, вызываемую противораковой химиотерапией. В день 0 подкожно вводят инъекцию 100 мкг/кг веса bG-CSF или его варианта. Каждый bG-CSF образец инъектируют группе из 6 случайных крыс. Образцы крови по 300 мкл EDTA стабилизированной крови отбирают из хвостовой вены крыс перед введением дозы и через 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч после введения. Образцы крови анализируют по следующим гематологическим параметрам: гемоглобин, количество эритроцитов, гематокрит, средний объем клеток, средняя концентрация клеток гемоглобина, среднее количество гемоглобина, количество лейкоцитов, дифференциальное количество лейкоцитов (нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов). На основании указанных измерений оценивают биологическую эффективность конъюгированного и неконъюгированного bG-CSF и их вариантов.

Пример 26. *In vivo* исследования, оценивающие влияние bG-CSF-T133pAF 20K варианта ПЭГ на гематологические реакции скота.

Рекомбинантные bG-CSF, содержащие одно pAF замещение в положении T133 (bG-CSF T133pAF-20K ПЭГ), получают в *E. coli*. У этого белка есть N-концевой метионин (SEQ ID NO: 2) и треонин в положении 134 SEQ ID NO: 2 был замещен пара-ацетилфенилаланином. Белок был ПЭГилирован по сайту встраивания pAF, используя 20 кДа оксиамино ПЭГ, и очищен с помощью катионообменной жидкостной хроматографии до >98% чистоты.

Конечная лекарственная форма содержит 7,377 мг/мл.

ПЭГилированного bG-CSF в буфере для лекарственных форм, состоящем из 4,26 мМ NaAc; 5% сорбита; 0,0033% Tween 20; 0,565 мМ NaCl; pH 4,0.

Коммерческие мясных бычков-кастратов, результатов скрещивания английских и континентальных родителей весом приблизительно 150 кг покупают и транспортируют в исследовательский центр, где их индивидуально идентифицируют по ушным ярлыкам и акклиматизируют в течение 7 до включения в исследование. Животным не вводят ни антибиотики, ни вакцины во время прибытия или акклиматизации. На протяжении исследований животным не вводят никаких других медикаментов. Животных помещают в стойла с бетонным наклонным полом и содержат при комнатных температурах. Животных кормят один раз в день по желанию полным гранулированным кормом (Rumilab® 5508).

Исследования проводят, используя произвольный полный блок-дизайн, в котором бычки заключены в стойла. Двенадцать животных оценивают с точки зрения обработанных или негативного контроля (лекарственная форма буфера без белка) в группах (6 животных/обработка). Животных произвольно разделяют на блоки и обработку проводят внутри блоков.

В день -1 бычков осматривает ветеринар на предмет клинических признаков заболевания. Оценки включают частоту пульса, скорость дыхания и ректальную температуру так же, как общее состояние. Вес тел и ректальные температуры определяют и анти-коагуляционные образцы крови собирают для гематологических оценок (образцы предварительной обработки). Для включения в исследования отбирают животных в конкретном весовом интервале с нормальными гематологическими профилями на основании литературных ссылок интервалов и без клинических признаков заболевания.

В день 0 бычков обрабатывают или одной подкожной инъекцией ПЭГилированного bG-CSF T133pAF (40 мкг/кг), или буфером для лекарственных форм (1 мл/125 кг). Инъекции вводят в предлопаточную область с левой стороны шеи.

Полные образцы венозной крови (~30 мл) собирают в стерильные ампулы, содержащие или EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту) для определения абсолютного числа лейкоцитов либо ACD (кислота-цитрат-декстроза) для определения абсолютного числа нейтрофилов. Абсолютное число лейкоцитов определяют, используя анализатор крови Beckman Coulter ACT<sub>10</sub><sup>TM</sup>. Абсолютное число нейтрофилов (ANC) определяют, используя проточно-цитометрическую оценку процента нейтрофилов в CD45-

окрашенных образцах полной крови с помощью биоанализатора Becton Dickinson FACSSarray™. Абсолютное число нейтрофилов рассчитывают, умножая абсолютное число лейкоцитов на процент нейтрофилов.

Кроме образцов до обработки, полученных в день -1, образцы собирают спустя 4, 8 и 12 ч в день 0, через 24 и 36 ч после обработки и ежедневно в дни 3-14.

Результаты введения ПЭГилированных bG-CSF ANC представлены на фиг. 6. Животные, которых обрабатывают только буфером для лекарственных форм, демонстрируют относительно постоянные ANC значения на протяжении всей длительности исследований. Напротив, животные, которым вводили ПЭГилированный bG-CSF, демонстрируют заметное увеличение ANC в течение 8 ч после обработки. Максимальные ANC значения (приблизительно 10-кратное превышение уровней до обработки) наблюдаются через 72 ч после обработки. Абсолютное количество нейтрофилов снижается приблизительно в 4-5 раз по сравнению с уровнем до обработки на 5 день после обработки и остается на этом уровне до дня 10. Значения продолжают уменьшаться и к 11-14 дням достигают 3,5-кратного уменьшения по сравнению с уровнем до обработки с дня 11 до дня 14.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сайт-специфическое ПЭГилирование bG-CSF в положении T133 позволяет достигать высокой гематопозитической активности, которая сохраняется в течение по меньшей мере двух недель у бычков, которым ввели одну инъекцию белка.

Пример 27. Результаты гематологического исследования ПЭГилированного варианта bG-CSF T-133.

In vivo исследования осуществляют, чтобы оценить влияние bG-CSF-T133pAF 20K варианта ПЭГ в отношении гематологических реакций скота.

Рекомбинантные bG-CSF, содержащие одно pAF замещение в положении T133 (bG-CSF T133pAF-20K ПЭГ), получают в E. coli. Белок был ПЭГилирован по сайту встраивания pAF, используя 20 кДа оксиамино-ПЭГ, и очищают с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии до >98% чистоты. Конечная лекарственная форма содержит 7,377 мг/мл ПЭГилированного bG-CSF в буфере для лекарственных форм, состоящего из 4,26 мМ NaAc; 5% сорбита; 0,0033% Tween 20; 0,565 мМ NaCl; pH 4,0.

Коммерческих мясных бычков-кастратов результатов скрещивания английских и континентальных родителей весом приблизительно 150 кг покупают и транспортируют в исследовательский центр, где их индивидуально идентифицируют по ушным ярлыкам и акклиматизируют в течение 7 дней до включения в исследование. Животным не вводят ни антибиотики, ни вакцины во время прибытия или акклиматизации. На протяжении исследований животным не вводят никаких других медикаментов. Животных помещают в стойла с бетонным наклонным полом и содержат при комнатных температурах. Животных кормят один раз в день по желанию полным гранулированным кормом (Rumilab® 5508).

Исследования проводят, используя произвольный полный блок-дизайн, в котором бычки заключены в стойла. Двенадцать животных оценивают с точки зрения обработанных или негативного контроля (лекарственная форма буфера без белка) в группах (6 животных/обработка). Животных произвольно разделяют на блоки и обработку проводят внутри блоков.

В день -1 бычков осматривает ветеринар на предмет клинических признаков заболевания. Оценки включают частоту пульса, скорость дыхания и ректальную температуру так же, как общее состояние. Вес тел и ректальные температуры определяют и анти-коагуляционные образцы крови собирают для гематологических оценок (образцы предварительной обработки). Для включения в исследования отбирают животных в конкретном весовом интервале с нормальными гематологическими профилями на основании литературных ссылочных интервалов и без клинических признаков заболевания.

В день 0 бычков обрабатывают или одной подкожной инъекцией ПЭГилированного bG-CSF T133pAF (40 мкг/кг) или буфером для лекарственных форм (1 мл/125 кг). Инъекции вводят в предлопаточную область с левой стороны шеи.

Полные образцы венозной крови (~30 мл) собирают в стерильные ампулы, содержащие или EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту) для определения абсолютного числа лейкоцитов либо ACD (кислота-цитрат-декстроза) для определения абсолютного числа нейтрофилов. Абсолютное число лейкоцитов определяют, используя анализатор крови Beckman Coulter ACT<sub>10</sub>™. Абсолютное число нейтрофилов (ANC) определяют, используя проточно-цитометрическую оценку процента нейтрофилов в CD45-окрашенных образцах полной крови с помощью биоанализатора Becton Dickinson FACSSarray™. Абсолютное число нейтрофилов рассчитывают, умножая абсолютное число лейкоцитов на процент нейтрофилов.

Кроме образцов до обработки, полученных в день -1, образцы собирают спустя 4, 8 и 12 ч в день 0, через 24 и 36 ч после обработки и ежедневно в дни 3-14.

Результаты введения ПЭГилированных bG-CSF в отношении ANC представлены на фиг. 17. Животные, которых обрабатывают только буфером для лекарственных форм, демонстрируют относительно постоянные значения ANC на всем протяжении исследований. Напротив, животные, которым вводили ПЭГилированный bG-CSF, демонстрируют заметное увеличение ANC в течение 8 ч после обработки.

Максимальные ANC значения (приблизительно 10-кратное превышение уровней по сравнению с уровнями до обработки) наблюдаются через 72 ч после обработки. Абсолютное количество нейтрофилов снижается приблизительно в 4-5 раз по сравнению с уровнем до обработки на 5 день после обработки и остаются на этом уровне до 10 дня. Значения продолжают уменьшаться и достигают 3,5-кратного уменьшения по сравнению с уровнем до обработки с 11 до 14 дня (см фиг. 17).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сайт-специфическое ПЭГилирование bG-CSF в положении T133 позволяет достигать высокой гематопозитической активности, которая сохраняется в течение по меньшей мере двух недель у бычков, которым вводят одну инъекцию белка.

Следует понимать, что раскрытые здесь примеры и варианты представлены только с иллюстративной целью и что различные модификации или изменения в их свете, которые могут предложить специалисты в данной области, должны быть включены в объем и сферу действия рассматриваемого изобретения и объема формулы изобретения. Все цитированные в рассматриваемом изобретении публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей до той же степени, как если бы каждые отдельные публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы были включены в описание посредством ссылки для всех целей.

Пример 28. Результаты исследования эффективности ПЭГилированного варианта bG-CSF T-133 в отношении мастита.

Метафилактическая эффективность bG-CSF-T133pAF 20K варианта ПЭГ против природных интрамаммарных инфекций, связанных с ключевыми патогенами мастита, оценивают, используя модель искусственно вызванного мастита.

Рекомбинантные bG-CSF, содержащие одно pAF замещение в положении T133, продуцированы в *E. coli*. Белок ПЭГилируют по сайту встраивания pAF, используя 20 кДа оксиамино-ПЭГ, и очищают, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию исключения по размерам. Конечная лекарственная форма содержит ПЭГилированный bG-CSF в буфере для лекарственных форм, состоящем из 10 mM NaAc; 5% сорбита и 0,0033% Tween 20 при pH 4,0.

Многочратно телвившихся Holstein-Friesian репродуктивных коров весом приблизительно 600-800 кг отбирают из коммерческого продуктивного поголовья. Никакого противобактериального лечения коровам не проводят в течение 30 дней до включения в исследования. Животных кормят соответствующим сухим кормом для коров до отела, переходный рацион для коров включают в день отела и он используется на всем протяжении исследований. Животным предоставляется доступ к свежей воде ad libitum. Затем следуют рутинные процедуры и коров доят дважды в день.

Состояние здоровья коров регистрируют в исследовании приблизительно за семь дней до даты их ожидаемого отела на основании племенного учета и оценки их готовности к отелу ветеринаром. Коров совершенно произвольно разбивают на группы по обработке. В каждой такой группе содержится приблизительно пятьдесят коров.

Коров обрабатывают или стерильным солевым раствором (негативный контроль), ежедневные инъекции (с дня -7 до дня 6) неПЭГилированного bG-CSF-T133pAF, или различными дозами bG-CSF-T133pAF 20K ПЭГ варианта в день регистрации и в день отела. Инъекции вводят подкожно в предлопаточный участок шеи.

Индивидуум, которому неизвестно разделение на группы, наблюдает животных в отношении клинических признаков мастита при дойке в каждый из дней 0-28. Специфические наблюдения включают определение клинической оценки на основании внешнего вида молока и состояния молочных желез. Если обнаруживаются какие-либо ненормальности, проводят тест на California Mastitis на пораженном соске (сосках) и измеряют ректальную температуру животного. У каждого погибшего во время испытаний животного берут биопсию для определения причины гибели, если это возможно.

Удои записывают в каждый из 0-28 дней и исследуют состав образцов молока, полученного из здоровых сосков в дни 3, 5, 7 и 10, причем исследования состава включают определение количества соматических клеток, жирность молока, молочный белок, лактозу и твердую часть. Собирают также дополнительные образцы молока, полученные из сосков, демонстрирующих клинические ненормальности, для определения бактериальных патогенов.

Процент живорожденных и оценки концепции первой помощи после ребридинга с искусственным осеменением собирают для всех коров, включенных в исследования, чтобы оценить влияние обработки на репродуктивное здоровье. Ежедневные наблюдения за здоровьем всех телят также регистрируют в течение первых 30 дней их жизни и любые ненормальности документируют, чтобы оценить влияние обработки на здоровье телят.

Эффективность оценивают, сравнивая степени заболеваемости между группами как для коров, так и для отдельных четвертей. Вторичные конечные точки включают оценку влияния обработок на случаи заболеваемости, производство молока, состав молока и степень концепции первой помощи.

Влияние различных обработок на клинический мастит и смертность суммированы в табл. 10.

Таблица 10

| Описание обработки  | Заболеваемость | Смертность |
|---|----------------|------------|
| Стерильный солевой раствор (SIDx 2-7 дни и день 0)          | 26/50 (52%)    | 4          |
| bG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SIDx14, день-7 и день 0)         | 16/49 (33%)    | 6          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SIDx2, день-7 и день 0) | 6/53 (11%)     | 2          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SIDx2, день-7 и день 0) | 7/52 (13%)     | 3          |

Введение ежедневных доз неПЭГилированных bG-CSF T-133 pAF значительно снижает количество случаев новой инфекции клинического мастита по сравнению с контролем солевым раствором или с ежедневными инъекциями неПЭГилированного bG-CSF T133-pAF. Введение каждой дозы bG-CSF T133-pAF 20K ПЭГ приводит к небольшому численному уменьшению смертности по сравнению с контролями и с солевым раствором.

Влияние обработки на ежедневные удои у здоровых коров суммировано на фиг. 18. Уровни удоев были аналогичными у коров, обработанных стерильным солевым раствором или неПЭГилированным bG-CSF T133-pAF и низшими дозами bG-CSF T133-pAF 20K ПЭГ. Указанные животные демонстрируют повышение удоев на протяжении исследования, что обычно наблюдается для первого месяца лактации. Животные, обработанные более высокими дозами bG-CSF T133-pAF 20K ПЭГ, демонстрируют значительно пониженные удои по сравнению с удоями для групп с другими обработками на протяжении всей длительности исследований.

Влияние обработок на количество соматических клеток представлено на фиг. 19. Животные, обработанные или неПЭГилированным bG-CSF T133-pAF либо bG-CSF T133 pAF 20K ПЭГ, демонстрируют количество соматических клеток, которое или равно или меньше, чем количество, которое наблюдалось у контрольных животных, обработанных солевым раствором в дни 3, 5 и 7 после отела. К десятому дню после отела количество соматических клеток у животных, обработанных неПЭГилированным bG-CSF T133-pAF или bG-CSF T133 pAF 20K ПЭГ, было значительно ниже, чем у контрольных животных, что предполагает, что такие обработки, по-видимому, уменьшают количество случаев неклинического мастита в дополнение к клиническому маститу.

Результаты микробиологических анализов указывают на то, что заболеваемость коров находится в типичном интервале бактериальных патогенов, включая кишечные бактерии, *Streptococcus species*, *Staphylococcus species* и *Vacillus species*. Полученные результаты предполагают, что введение bG-CSF T133-pAF 20K ПЭГ оказывается эффективным в плане уменьшения заболеваемости как против грамположительных, так и грамотрицательных видов бактерий.

Влияние обработок на живорождение и оценки концепции первой помощи суммировано в табл. 11. Не наблюдается заметных различий в процентах живорождения между обработками, что предполагает, что экспериментальные обработки не оказывают влияния на жизнеспособность телят в матке. Наблюдается несколько улучшений в оценках концепции первой помощи среди животных, обработанных или неПЭГилированным bG-CSF T133-pAF либо bG-CSF T133 pAF 20K ПЭГ, и животных, обработанных солевым раствором. Указанные результаты предполагают, что экспериментальные обработки не оказывают вредного воздействия на репродуктивное здоровье.

Таблица 11

| Описание обработки  | % живорожденных | Оценка концепции первой помощи |
|---|-----------------|--------------------------------|
| Стерильный солевой раствор (SIDx 2-7 дни и день 0)          | 94%             | 25.6%                          |
| bG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SIDx14, день-7 и день 0)         | 98%             | 41.2%                          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SIDx2, день-7 и день 0) | 92%             | 34.2%                          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SIDx2, день-7 и день 0) | 93%             | 34.2%                          |

Влияние на здоровье во время пребывания в матке живорожденных телят, включенных в исследования, суммировано в табл. 12. Полученные результаты свидетельствуют о том, что никакие экспериментальные обработки не уменьшают количество случаев кишечных или респираторных заболеваний по сравнению со случаями для группы, обработанной солевым раствором в первые тридцать дней жизни. Однако введение как неПЭГилированного bG-CSF T133-pAF, так и bG-CSF T133 pAF 20K ПЭГ значительно уменьшает смертность по сравнению с контролями с солевым раствором. Приведенные результаты позволяют предположить, что экспериментальные обработки оказывают положительное влияние на тяжесть заболевания.

Таблица 12

| Описание обработки   | Случаи кишечных заболеваний | Случаи респираторных заболеваний | Смертность |
|--|-----------------------------|----------------------------------|------------|
| Стерильный солевой раствор (SIDx 2-7 дни и день 0)           | 28                          | 1                                | 6          |
| bG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SIDx14, день -7 – день 6)         | 32                          | 1                                | 1          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SIDx2, день -7 и день 0) | 30                          | 2                                | 0          |
| bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SIDx2, день -7 и день 0) | 34                          | 2                                | 1          |

Пример 29. Влияние bG-CSF T-133 ПЭГилированного варианта на респираторное заболевание. Результаты изучения эффективности.

Метафилактическую эффективность различных доз bG-CSF-T133 pAF 20K варианта ПЭГ против природного респираторного заболевания крупного рогатого скота оценивают в промышленных условиях фермы.

Рекомбинантные bG-CSF, содержащие одно pAF замещение в положении T133, продуцированы в *E. coli*. Белок ПЭГилируют по сайту встраивания pAF, используя 20 кДа оксиамино-ПЭГ, и очищают, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию исключения по размерам. Конечная лекарственная форма содержит ПЭГилированный bG-CSF в буфере для лекарственных форм, состоящем из 10 мМ NaAc; 5% сорбита и 0,0033% Tween 20 при pH 4,0.

Коммерческих бычков от скрещивания английской и континентальной пород весом приблизительно 225 кг и типичных промышленных телят-откормочников закупают на фермах на юго-востоке США. После прибытия на место назначения животных идентифицируют и их осматривает ветеринар на предмет клинических нарушений. Регистрируют также ректальную температуру и животных без клинических симптомов и с ректальными температурами <40°C отбирают для включения в исследования. Образцы крови для определения полного и дифференциальных количеств лейкоцитов отбирают до обработки.

Телят произвольно разбивают на группы для различных обработок, как представлено в табл. 13.

Таблица 13

| Обработка                          | Дозовый режим | Число животных |
|------------------------------------|---------------|----------------|
| 1) Стерильный солевой раствор      | SIDx1         | 40             |
| 2) bG-CSF-T133 20K PEG (20 мкг/кг) | SIDx1         | 40             |
| 3) bG-CSF-T133 20K PEG (10 мкг/кг) | SIDx1         | 40             |
| 4) bG-CSF-T133 20K PEG (5 мкг/кг)  | SIDx1         | 40             |

Стерильный солевой раствор или bG-CSF-T133 pAF 20K ПЭГ вводят подкожной инъекцией в предплечевой участок шеи.

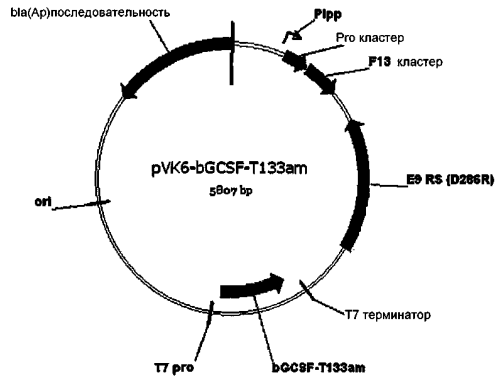
На следующее утро телят погружают в грузовики и отвозят приблизительно за 2250 км на промышленную ферму в Северном Колорадо. По прибытии телят размещают в стойла и снабжают кормом и водой. В течение 4 ч после прибытия телят перемещают в зону обработки, где их взвешивают и у первых десяти телят, приписанных к каждой из групп обработки, отбирают кровь для получения образцов для определения полного и дифференциальных количеств лейкоцитов. Эти цифры используют для подтверждения того, что животные реагируют на обработку, о чем свидетельствует увеличение абсолютного числа нейтрофилов. Телят произвольно распределяют в загон для исследования, по пять животных в каждой обрабатываемой группе при полном количестве 20 животных в загоне.

Ветеринар, не осведомленный о принадлежности животных к той или иной группе, ежедневно наблюдает телят в течение 14 дней после прибытия в отношении клинических симптомов заболевания. Каждое животное получает оценку заболеваемости по шкале от 0 (здоровый) до 4 (умирающий). Животных с оценкой заболеваемости >0 перемещают в зону осмотра и регистрируют их ректальную температуру. Животных, которые демонстрируют оценку заболеваемости >0 при ректальных температурах >40°C, идентифицируют как умирающих, обрабатывают соответствующими антибиотиками и возвращают в их исследовательские стойла. Идентичность животных, которые гибнут во время исследований, регистрируют и берут образцы биопсии для определения причины гибели.

Основным критерием для определения эффективности является показатель относительной заболеваемости между группами с различной обработкой. Вторичные критерии эффективности включают оценки смертности, среднее дневное увеличение веса и среднюю оценку дневной заболеваемости для каждой обрабатываемой группы.

Следует понимать, что раскрытые здесь примеры и варианты приведены только с иллюстративными целями и что различные модификации или изменения в их свете, которые могут предпринять специалисты в данной области, должны быть включены в объем и границы рассматриваемого изобретения и прилагаемой формулы изобретения. Все цитированные в рассматриваемом изобретении публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей, как если бы каждые из публикаций, патентов, патентных заявок и/или других документов были отдельно включены по ссылке для всех целей.



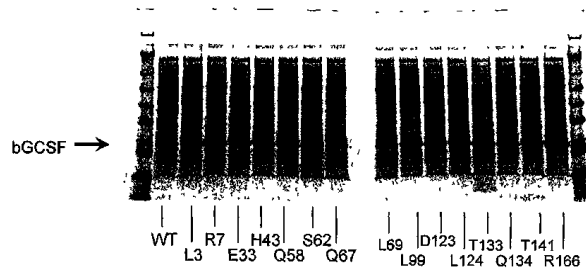


Фиг. 1

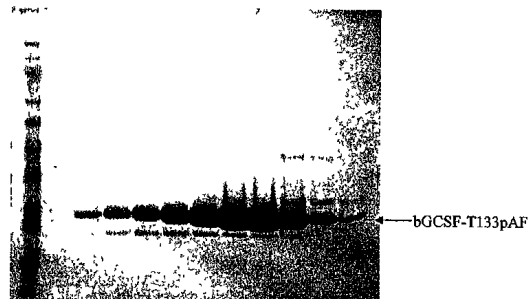
Штамм: производное *E. coli* штамма K12-W3110 *E. coli*  
 Генотип: F- I- *rph-1* INV(*rrmD* - *rrmE*) *araB::g1 tetA*

| Генотип                          | Объяснение  |
|----------------------------------|---|
| F <sup>-</sup>                   | У хозяина отсутствует F' эписома  |
| λ <sup>-</sup>                   | Не лизогенный – фаг не интегрирован в хромосому   |
| <i>rph-1</i>                     | Сдвиг рамки в <i>rph</i> (рибонуклеаза PH), влияющий на уровни экспрессии <i>rugE</i> (оротат фосфорибозилтрансферазы)                      |
| INV( <i>rrmE</i> - <i>rrmD</i> ) | Часть хромосомы (785kb) между генами <i>rrmE</i> и <i>rrmD</i> инвертирована  |
| <i>araB::g1 tetA</i>             | Ген полимеразы T7 РНК бактериофага <i>g1</i> под контролем промотора <i>araB</i> . Встроен маркер <i>tetA</i> (устойчивость к тетрациклину) |

Фиг. 2

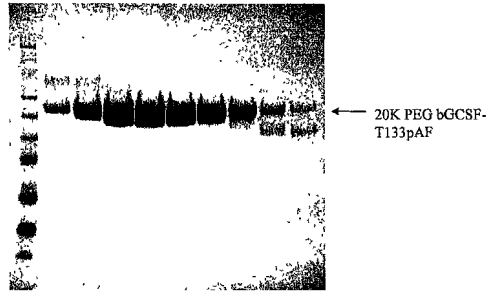


Фиг. 3

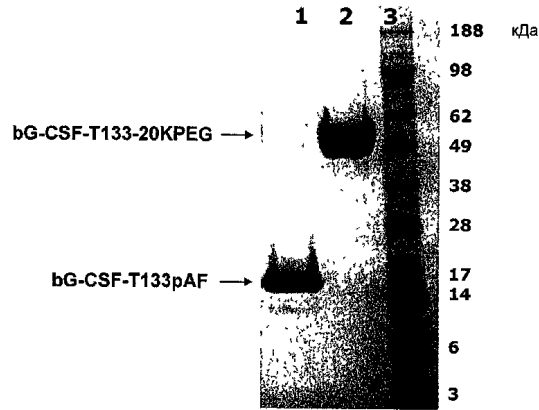


Фиг. 4

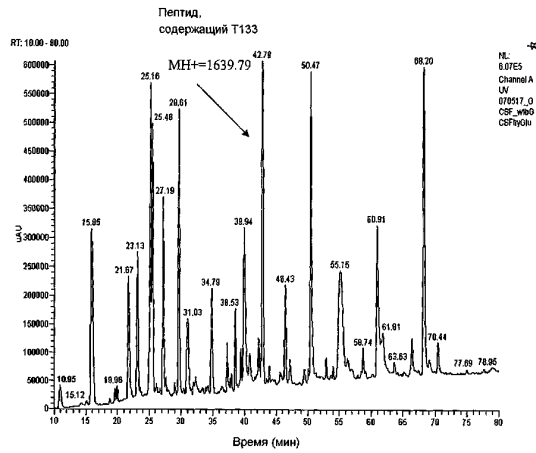
019968



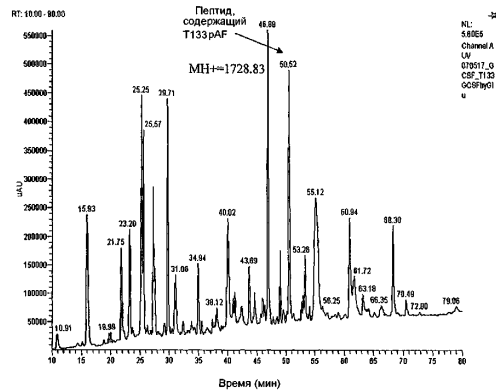
Фиг. 5



Фиг. 6



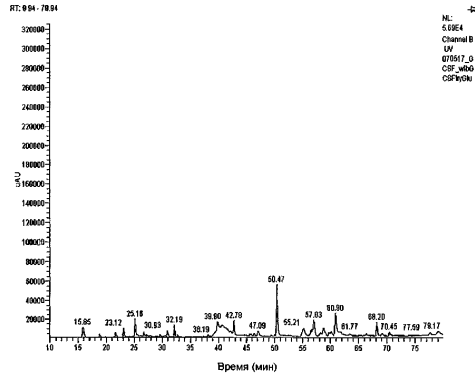
Фиг. 7а



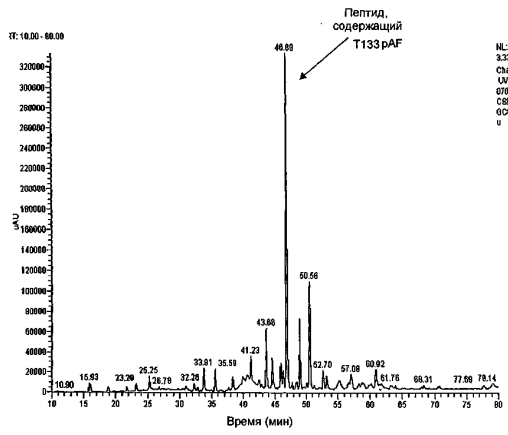
Фиг. 7б



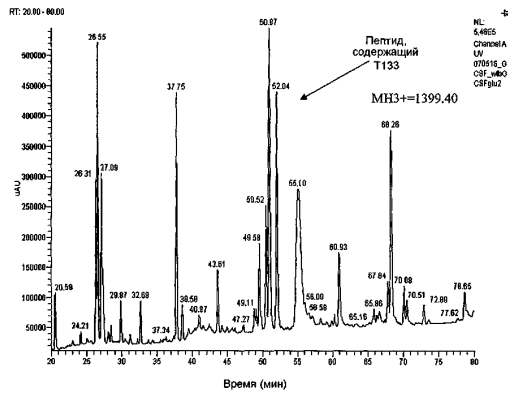
019968



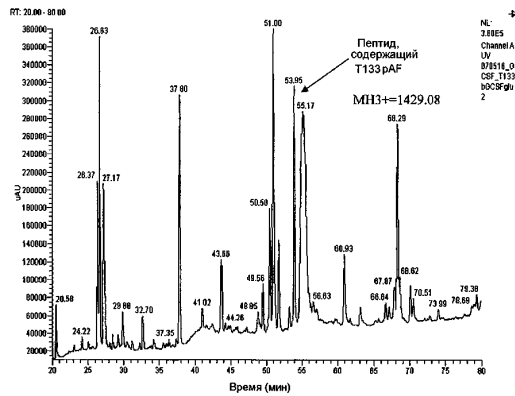
Фиг. 8a



Фиг. 8b

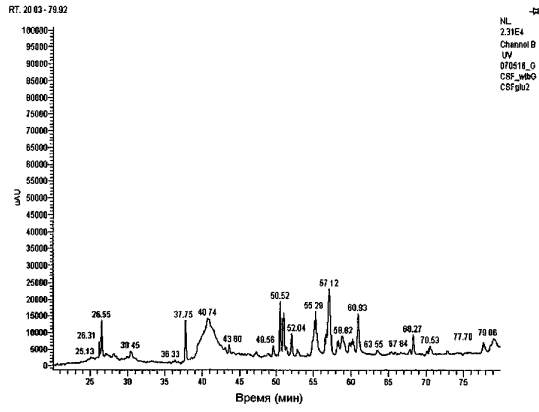


Фиг. 9a

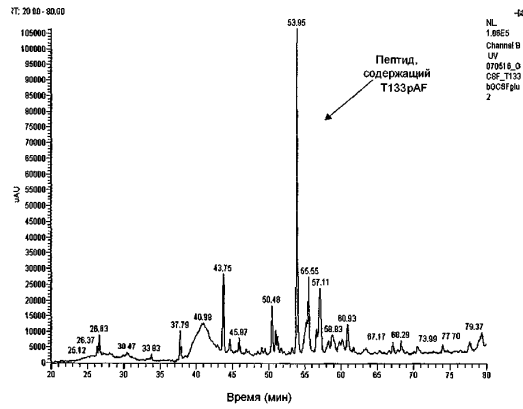


Фиг. 9b

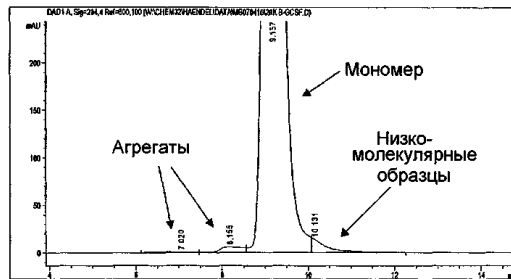
019968



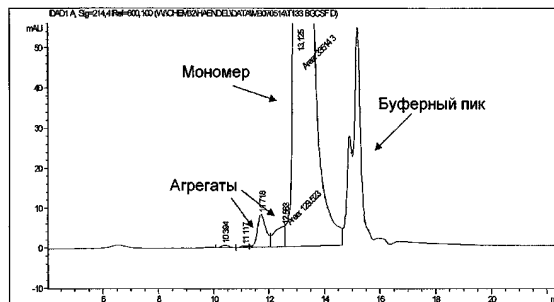
Фиг. 10а



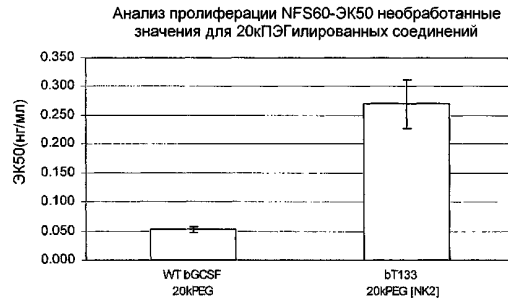
Фиг. 10б



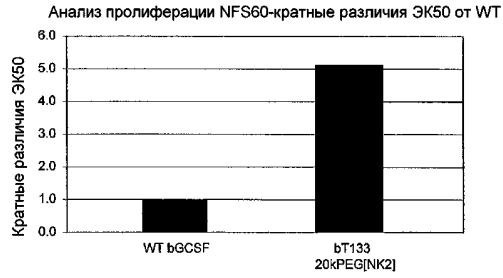
Фиг. 11



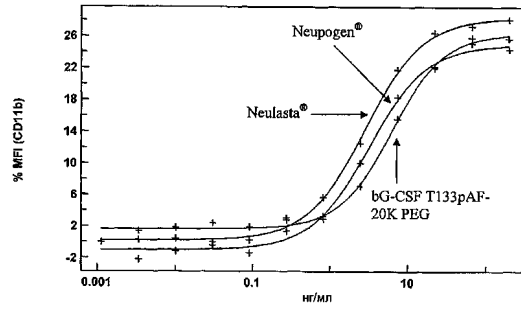
Фиг. 12



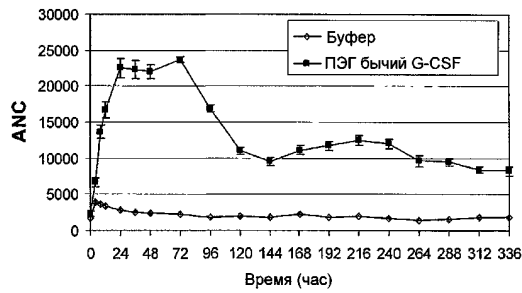
Фиг. 13



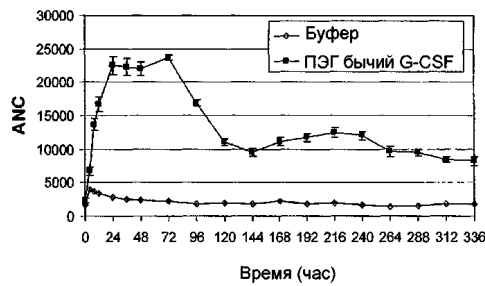
Фиг. 14



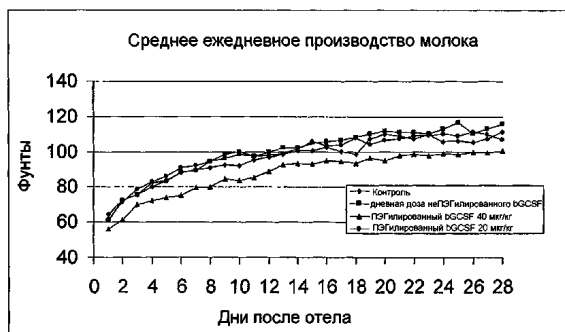
Фиг. 15



Фиг. 16

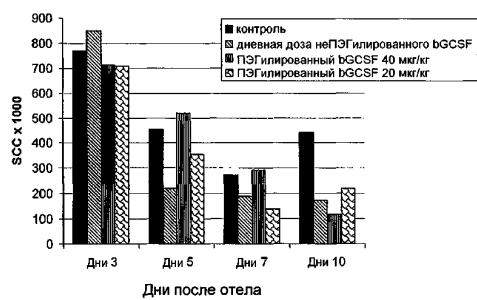


Фиг. 17



Фиг. 18

Количество соматических клеток



Фиг. 19

## Список последовательностей

<110> Hays Putnam, Anna-Maria  
 Knudsen, Nick  
 Norman, Thea  
 Koder, Alan  
 Kraynov, Vadim  
 Ho, Lillian  
 Canning, Peter

<120> Модифицированные бычьи полипептиды G-CSF и их применение

<130> AMBX-0154.00PCT

<150> 61/083,132  
 <151> 2008-07-23

<160> 24

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1  
 <211> 174  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Бос быка

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln  
 20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met  
 35 40 45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
 50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His Gly  
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser  
 85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp  
 100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro  
 115 120 125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe  
 130 135 140

## 019968

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe  
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
 165 170

<210> 2  
 <211> 175  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Bos быка

<400> 2

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
 20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
 35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
 50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
 65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
 115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
 145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
 165 170 175

<210> 3  
 <211> 525  
 <212> ДНК  
 <213> Bos быка

<400> 3  
 actccattag gtccctgcacg tagcctgcct caaagttttc tgctgaaatg cctggagcag 60  
 gtccgcaaaa ttcaagetga tgggtcggaa ctgcaggagc gtctgtgtgc cgcacataaa 120  
 ctgtgccacc cggagaact gatgctgctg cgcattcac tgggaatccc acaggctcct 180  
 ctgtcctcgt gtagctctca aagtctgcag ctgacttcat gcctgaatca actgcacgga 240  
 gccctgttcc tgtatcaggg tctgctgcag gcctggccg ggatttcccc ggagctggca 300  
 ccgacactgg acaccctgca actggatgta acggactttg ctactaacat ctggctgcag 360  
 atggaagatc tgggagcggc cccagcagtg caacctacac agggcgctat gccgacctc 420  
 acgtcggcgt ttcagcctcg cgcgggtggc gttctggctg caagccaact gcatcgtttc 480  
 ctggagctgg cgtaccgagg tctgcgttat ctggctgaac cgtaa 525

<210> 4  
 <211> 528  
 <212> ДНК  
 <213> Bos быка

<400> 4  
 atgactccat taggtcctgc acgtagcctg cctcaaagtt ttctgctgaa atgcctggag 60  
 caggctccga aaattcaagc tgatggtgcg gaactgcagg agcgtctgtg tgccgcacat 120  
 aaactgtgcc acccggaaga actgatgctg ctgcgccatt cactgggaat cccacaggct 180  
 cctctgtcct cgtgtagctc tcaaagtctg cagctgactt catgcctgaa tcaactgcac 240  
 ggaggcctgt tctctatca gggctctgct caggcctgg ccgggatttc cccggagctg 300  
 gcaccgacac tggacacct gcaactggat gtaacggact ttgctactaa catctggctg 360  
 cagatggaag atctgggagc ggcgccgca gtgcaacct caccggcgc tatgcccacc 420  
 ttcacgtcgg cgtttcagcg tcgcgccggg ggcgttctgg tcgcaagcca actgcatcgt 480  
 ttcctggagc tggcgtaccg cggctcgtct tatctggctg aaccgtaa 528

<210> 5  
 <211> 77  
 <212> ДНК  
 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 5  
 ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60  
 tccggcccgc cggacca 77

<210> 6  
 <211> 88  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Оптимизированная эмбер-супрессорная тРНК

<400> 6  
 cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60  
 gaggggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 7  
 <211> 89  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Оптимизированная AGGA супрессорная тРНК со сдвигом рамки

<400> 7  
 gcaagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttctt aatccgttct ctaggagtt 60  
 caggggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 8  
 <211> 307  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтаза для встраивания п-азидо-L-фенилаланина

<400> 8

Gly Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile  
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala  
 20 25 30

Gly Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu  
 35 40 45

Gln Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile  
 50 55 60

Ile Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala  
 85 90 95

Met Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp  
 100 105 110

Lys Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu  
 115 120 125

Lys Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn  
 130 135 140



## 019968

Pro Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr  
145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys  
165 170 175

Ile His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile  
180 185 190

His Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser  
195 200 205

Ser Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg  
210 215 220

Ala Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn  
225 230 235 240

Pro Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile  
245 250 255

Lys Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu  
260 265 270

Glu Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu  
275 280 285

Lys Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg  
290 295 300

Lys Arg Leu  
305

<210> 9

<211> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил ТРНК-синтетаза для встраивания п-бензоил-L-фенилаланина

<400> 9

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly  
20 25 30

## 019968

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

## 019968

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 10

<211> 305

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания пропаргилфенилаланина

<400> 10

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His  
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn  
 180 185 190

## 019968

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys  
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys  
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile  
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg  
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu  
 260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn  
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg  
 290 295 300

Leu  
 305

<210> 11  
 <211> 305  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтезаза для астраивания пропаргилфенилаланина

<400> 11

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

## 019968

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr  
 145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His  
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn  
 180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys  
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys  
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile  
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg  
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu  
 260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn  
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg  
 290 295 300

Leu  
 305

<210> 12  
 <211> 305  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

## 019968

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания пропаргилфенилаланина

&lt;400&gt; 12

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr  
 145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His  
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn  
 180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys  
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys  
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile



019968

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His  
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 14  
 <211> 306  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтегаза для встраивания п-азидофенилаланина

<400> 14

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr



019968

20 25 30  
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His  
 145 150 155 160  
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys



## 019968

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
290 295 300

Arg Leu  
305

<210> 16  
<211> 306  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания л-азидофенилаланина  
<400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr  
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
65 70 75 80

## 019968

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110  
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125  
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His  
 145 150 155 160  
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305  
 <210> 17  
 <211> 306

## 019968

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания п-ацетилфенилаланина

<400> 17

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His  
 145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

## 019968

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 18

<211> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил тРНК-синтезаза для встраивания п-ацетилфенилаланина

<400> 18

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

## 019968

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His  
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
290 295 300

Arg Leu  
305

<210> 19  
<211> 306  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания п-ацетилфенилаланина

<400> 19

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

## 019968

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His  
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270



## 019968

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300

Arg Leu  
 305

<210> 20  
 <211> 306  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания п-азидофенилаланина

<400> 20

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His  
 145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
 165 170 175  
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
 180 185 190  
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
 260 265 270  
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys  
 275 280 285  
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
 290 295 300  
 Arg Leu  
 305  
 <210> 21  
 <211> 306  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> Аминоацил тРНК-синтетаза для встраивания п-азидофенилаланина  
 <400> 21  
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly  
 20 25 30  
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile



305  
 <210> 22  
 <211> 921  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Мутантная синтетаза, полученная из Methanococcus jannaschii синтетазы

<400> 22  
 atggacgaat ttgaaatgat aaaagagaac acatctgaaa ttatcagcga ggaagagtta 60  
 agagaggttt taaaaaaga tgaaaaatct gctgttatag gttttgaacc aagtggtaaa 120  
 atacatttag gccattatct ccaataaaaa aagatgattg atttacaata tgctggattt 180  
 gatataatta tatatttggc tgatttacac gcctatttaa accagaaagg agagtgggat 240  
 gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca 300  
 aaatatgttt atggaagtga acatggtctt gataaggatt atacctgaa tgtctataga 360  
 ttggctttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaaacttat agcaagagag 420  
 gatgaaatc caaagggtgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggtaa tgggattcat 480  
 tatgagggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca 540  
 agggagcttt taccaaaaaa ggttgtttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttggat 600  
 ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa 660  
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca 720  
 ataatggaga tagctaaata ctctctgaa tacccttaa ccataaaaaag gccagaaaaa 780  
 tttggtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag 840  
 gaattgcctc caatggattt aaaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gatttttagag 900  
 ccaattagaa agagattata a 921

<210> 23  
 <211> 77  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Мутантная тРНК, полученная из Methanococcus jannaschii тРНК

<400> 23  
 ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactetaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60  
 tccagccccc cggacca 77

<210> 24  
 <211> 306  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>

<223> Мутантная синтетаза, полученная из Methanococcus jannaschii  
синтетазы

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val  
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln  
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile  
50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp  
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met  
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys  
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys  
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro  
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His  
145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile  
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His  
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser  
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala  
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro  
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys  
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu  
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Arg Leu Lys  
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys  
290 295 300

Arg Leu  
305



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2