

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 103774****(13) C2****(51) МПК****A61K 38/22** (2006.01)**A61P 11/16** (2006.01)**C07K 14/535** (2006.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2011 02093**  
(22) Дата подання заявки: **22.07.2009**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.11.2013**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/083,132**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.07.2008**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.05.2011, Бюл.№ 10**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.11.2013, Бюл.№ 22**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2009/051388, 22.07.2009**

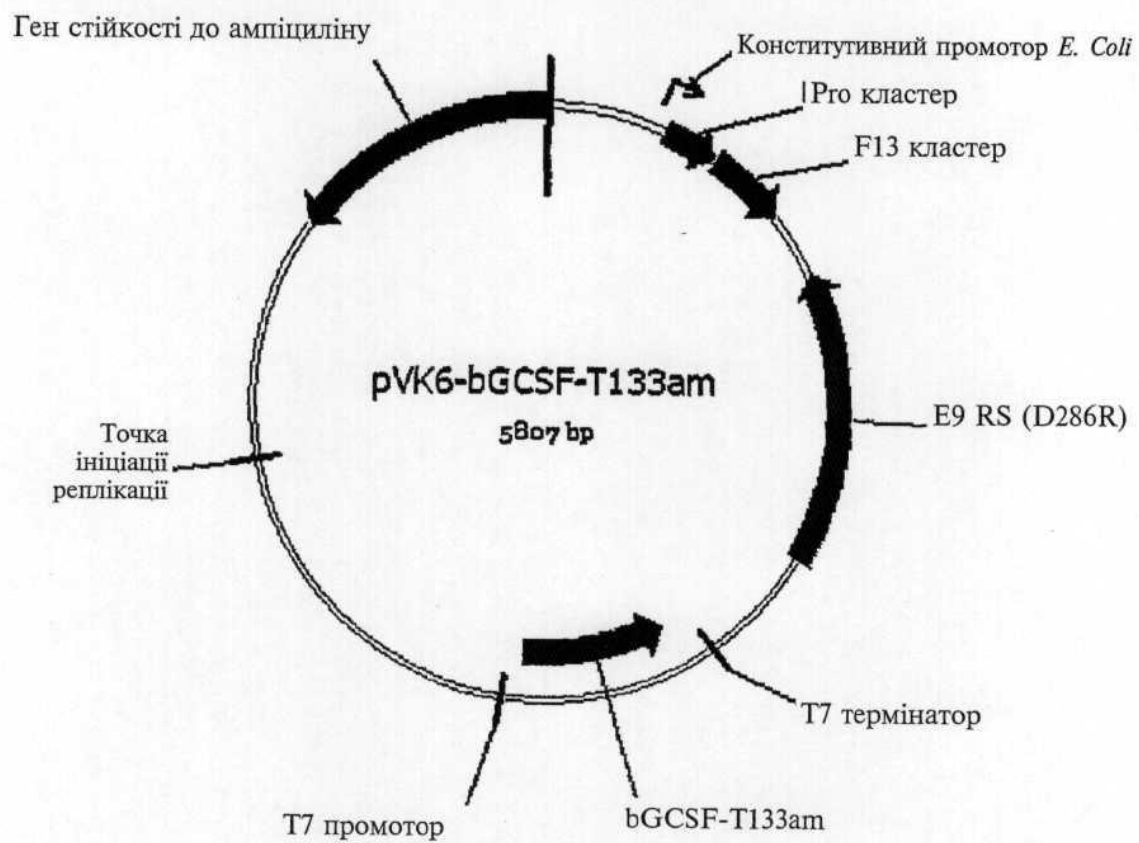
(72) Винахідник(и):  
**Хейз Патман Анна-Марія А. (US),  
Кнудсен Нік (US),  
Норман Тія (US),  
Кодер Алан (US),  
Крайнов Вадим (US),  
Хо Лілліан (US),  
Каннінг Пітер С. (US)**  
(73) Власник(и):  
**АМБРКС, ІНК.,  
10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La  
Jolla, CA 92037, United States of America  
(US),  
ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,  
Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285,  
United States of America (US)**  
(74) Представник:  
**Шляховецький Олександр Михайлович,  
реєстр. №21**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
**US 2008/0146781 A, 19.06.2008  
US 5,849,883 A, 15.12.1998  
US 2005/0142102 A1, 30.06.2005  
EP 0347041 A1, 201.12.1998**

**(54) МОДИФІКОВАНІ ПОЛІПЕПТИДИ БИЧАЧОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНІЄСТИМУЛЮВАЛЬНОГО ФАКТОРА (G-CSF) ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується поліпептиду bG-CSF, який містить послідовність SEQ ID NO:1 або послідовність SEQ ID NO:2, де положення 133 послідовності SEQ ID NO:1 або положення 134 послідовності SEQ ID NO:2 заміщене пара-ацетилфенілаланіном, і цей поліпептид сполучений із водорозчинним полімером, який містить полі(етиленгліколеву) складову, способу його одержання та застосування.

**UA 103774 C2**



ФІГ. 1

Галузь, до якої належить винахід

Цей винахід стосується поліпептидів бичачого гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (bG-CSF), факультативно модифікованих щонайменше однією штучно закодованою амінокислотою.

#### 5 Передумови створення винаходу

[01] Економічний вплив інфекційних захворювань на обсяг виробництва продуктів тваринництва є добре задокументованим. Інфекційні захворювання зменшують прибуток, підвищують витрати виробництва і створюють загрозу безпеці продовольчих продуктів, а також негативно впливають на продуктивність, стан здоров'я та благополуччя тварини. Хвороби 10 можуть зменшити надій та якість молока, результатом чого є великі економічні втрати для фермерів, які розводять молочну худобу, та постачальників м'ясної худоби, зокрема, коли у деяких випадках інфекційні мікробні захворювання спричиняють захворюваність та смертність новонароджених, молодих (наприклад, ремонтне поголів'я) та дорослих тварин. Два таких захворювання, мастит та респіраторні хвороби великої рогатої худоби (BRD), можуть чинити 15 спустошувальний вплив на обсяги виробництва продуктів тваринництва.

[02] Мастит визначають як запалення молочної залози. Це захворювання може уразити будь-якого ссавця, наприклад, корів, овець та кіз. Мастит великої рогатої худоби являє собою інфекцію вимені жуйних, таких як корови, яка спричинюється, головним чином, грампозитивними та грамнегативними бактеріями, зокрема, у корів, які утримуються на підприємствах з 20 виробництва молока за інтенсивною технологією. Наслідком згаданої бактеріальної інфекції є запалення молочної залози (тобто дійок та вимені). Тварини можуть стати більш сприйнятливими до маститу унаслідок порушеної мікробіцидної функції нейтрофілів у передродовий період. Це захворювання викликає особливу занепокоєність та має значну економічну важливість, оскільки згаданий патогенний організм легко передається від однієї 25 тварини до іншої у процесі доїння. Ця хвороба часто розвивається у перші декілька тижнів після отелення і може повторюватись з кожною лактацією. Деякими з головних патогенних мікроорганізмів, які спричиняють мастит великої рогатої худоби, є *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa*. Дивись також 30 публікацію *Bovine Mastitis*, під редакцією Glenys Bloomfield, V&O Publications 1987, яку включено до цього опису шляхом посилання. Ці мікроорганізми проникають до вимені через проток дійки і викликають запалення тканин молочної залози із спричиненням формування рубцевої тканини, яка, після утворення, може спричинювати постійне зниження молочної продуктивності корови. Інфекція може також змінити склад, кількість, зовнішній вигляд та якість молока. Патогенні 35 мікроорганізми, які спричиняють мастит, підрозділяються на дві категорії, а саме контагіозні та такі, що заселяють навколишнє середовище. Контагіозні бактерії, такі як *Streptococcus agalactiae* та *Staphylococcus aureus*, заселяють, головним чином, такі ділянки тканини хазяїна як молочні залози, протоки дійок та пошкодження шкіри дійок, і передаються від однієї інфікованої корови до іншої під час процесу доїння. Бактерії, що заселяють навколишнє середовище, до 40 яких часто належать стрептококи, ентерококи та коліформні мікроорганізми, існують, як правило, у середовищі, яке оточує корову, і з'являються з таких джерел як фекалії корів, ґрунт, матеріал рослинного походження, підстилка або вода, і інфікують тварину унаслідок випадкового умовно-патогенного контакту. Зазначена різниця між контагіозними патогенами та патогенами, що існують у навколишньому середовищі, хоча і не є вичерпною, але має 45 практичне значення, оскільки різні групи мікроорганізмів вимагають різних заходів з догляду за молочною чередою. У разі усіх випадків маститу великої рогатої худоби, незалежно від мікроорганізму, який його спричинив, шлях проникнення патогенного мікроорганізму до внутрішньої частини вимені проходить через отвір та проток дійки. Традиційними джерелами шкідливих мікроорганізмів є забруднене доїльне обладнання, доїльний апарат, інші хворі на 50 мастит тварини, середовище стійла у неналежному санітарному стані та процеси екскреції (дефекація/сечовипускання) самої тварини.

[03] Існує цілий ряд форм або типів маститу великої рогатої худоби, які різняться за тяжкістю або симптоматологією, у тому числі такі: (1) інфекція вимені; проникнення до порожнини вимені мікроорганізмів, які розмножуються у залозі та спричиняють запалення; (2) неклінічний або 55 субклінічний мастит; форма маститу, при якій відсутнє опухання залози і немає очевидних відхилень молока від норми, хоча молоко зазнає змін, які можуть бути виявлені специфічними тестами. Мастит цього типу є найбільш поширеним і спричинює найбільші загальні втрати у більшості черід. Його часто називають "прихованим" маститом; (3) клінічний мастит; форма маститу, у разі якої спостерігається аномальний стан вимені та секреції. Клінічний мастит у 60 легкій формі призводить до змін молока, таких як утворення пластівців, згустків, та водянистий

або незвичний зовнішній вигляд. Підвищена температура та чутливість вимені є слабкими або відсутніми, але можуть спостерігатись ознаки напухання. Тяжкий клінічний мастит характеризується раптовим розвитком з опуханням інфікованої чверті, яка є гарячою, твердою та чутливою. Молоко має ненормальний вигляд, і надій молока зменшується. Подеколи, окрім місцевих явищ у вимені, захворює сама корова. У тварини спостерігаються ознаки лихоманки, пришвидшення пульсу, пригнічений стан, слабкість та втрата апетиту. Комбінацію цих станів часто називають гострим системним маститом, оскільки уражається не лише вим'я, а тварина у цілому; та (4) хронічний мастит; форма маститу, що спричинюється постійною інфекцією вимені, яка більшість часу існує у неклінічній формі, але періодично може переходити у гостру клінічну форму. Після цих "раптових загострень" захворювання, як правило, тимчасово повертається до неклінічної форми. (Дивись, взагалі, публікацію Current Concepts of Bovine Mastitis, опубліковану у The National Mastitis Council, Inc., 2nd Ed. 1978, стор. 5).

[04] Як і раніш, мастит спричинює великі економічні втрати молочної промисловості. Мастит негативно впливає на прибутковість череди декількома шляхами, як безпосередньо, так і опосередковано, у тому числі: (1) втрата молочної продуктивності; (2) підвищена норма вибракування інфікованих корів; (3) зменшена вартість молока; (4) вибракуване молоко після обробки антибіотиками; (5) витрати на ветеринарне обслуговування (антибіотики та візити ветеринарного лікаря); та (6) смертність. (Bovine Mastitis, Glenys Bloomfield, *supra*, на стор. 33).

[05] Іншим поширеним захворюванням, яке уражає тваринництво на промисловій основі, є транспортна лихоманка (респіраторні хвороби великої рогатої худоби або BRD). Дехто вважає BRD "комплексом захворювань" з двох причин: транспортна лихоманка, як правило, спричинюється цілим рядом патогенних мікроорганізмів, як вірусних, так і бактеріальних, які взаємодіють між собою із спричиненням повністю розвиненого захворювання, та оскільки поведінка патогенних мікроорганізмів може являти собою послідовний процес, результатом якого, крок за кроком, стають хворі тварини. Бактеріальні патогенні мікроорганізми є найкраще відомою причиною гострого синдрому. Бактеріальні патогенні мікроорганізми можуть проникати до дихальних шляхів великої рогатої худоби після того, як тварини були ослаблені вірусною інфекцією. Передувати та додавати свій внесок до інфекції можуть також інші фактори, такі як стрес, який є наслідком відлучення, транспортування, зміни корму та коливань навколишньої температури та вологості. У багатьох випадках це додається до впливу патогенних організмів, якому піддається велика рогата худоба під час транспортування, коли худобу змішують із худобою іншого походження у вантажівках, дворах для худоби та аукціонних корівниках, результатом чого є високий рівень захворюваності великої рогатої худоби, доставленої до загороди для відгодовування.

[06] Бактерії декількох видів були виділені та асоційовані з BRD, і деякими з найбільш поширених є *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* та (або) *Histophilus somni*. *Haemophilus somni* являє собою вірулентний патогенний мікроорганізм, який спричинює септицемію великої рогатої худоби, і подеколи одержані в результаті прояви називають "комплексом *Haemophilus somni*", однією із форм якого є респіраторна хвороба; такі віруси, наприклад, як вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (IBR), вірусної діареї великої рогатої худоби (BVD) та респіраторно-синцитіальний вірус великої рогатої худоби (BRSV), також можуть приймати участь в ініціюванні комплексу BRD, часто відкриваючи двері для вторинних бактеріальних інфекцій.

[07] Оскільки ліквідувати ці мікроорганізми у навколишньому середовищі практично неможливо, до комплексу BRD слід підходити з точки зору запобігання проникненню цих хвороботворних агентів, виявлення і лікування клінічних випадків з усією можливою швидкістю та ефективністю. Респіраторні захворювання є головною причиною втрат м'ясної худоби від хвороб. Загальноновизнаним є те, що кінцевою причиною смерті у більшості випадків транспортної лихоманки є бактеріальна (як правило, пастерельозна) пневмонія. *Pasteurella haemolytica*, зокрема, тип 1A, є найпоширенішою бактерією, яка виділяється у випадках респіраторного захворювання у Північній Америці. Подеколи допомагає вакцинація проти деяких інфекційних агентів, які спричинюють транспортну лихоманку, але вакцини є доступними та ефективними лише для декількох агентів, що, як відомо, спричинюють згаданий комплекс захворювань.

[08] Антибіотикотерапія є головною складовою стратегії боротьби з маститом та BRD. У патенті США № 7,182,948, який у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання, вказується на те, що була показана ефективність занурення дійок у дезінфекційний протимікробний розчин, який містить йод, проти інфекцій молочної залози та бактерій, які спричинюють мастит (Pankey J.W. et al., (1983) J. Dairy Sci. 66 (1), 161-167). Ці композиції, як правило, застосовують для обробки дійок шляхом занурення або обприскування дійок перед

доїнням, а також після видалення доїльних стаканів. Для зниження рівня захворюваності на мастит були розроблені наявні у продажу розчини для дезінфекції дійок шляхом занурення, які містять різноманітні протимікробні агенти, у тому числі йодофори, четвертинні сполуки амонію, сполуки, що виділяють хлор (наприклад, гіпохлорити лужних металів), окисники (наприклад, пероксид водню, надкислоти), протоновані форми карбонових кислот (наприклад, гептанова, октанова, нонанова, деканова, ундеканова кислоти), аніонні кислоти (наприклад, алкіларилсульфонові кислоти), діоксид хлору (з хлориту) та бісбігуаніди, такі як хлоргексидин. Ці агенти, які мають різний ступінь ефективності, обмежують передавання маститу шляхом зменшення чисельності популяцій патогенних мікроорганізмів на дійках. Однак існують проблеми, пов'язані із застосуванням протимікробних препаратів. Найпоширенішими з них є подразнення та розтріскування дійок. Для полегшення цих ускладнень до складу таких композицій включають пом'якшувальні домішки, такі як гліцерин та ланолін. Однак, навіть незважаючи на застосування цих пом'якшувальних домішок, все ще можуть траплятись випадки подразнення шкіри.

[09] У патенті США № 6,790,867, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, зазначено, що підшкірні ін'єкції лікарських засобів, які об'єднують нестероїдний протизапальний лікарський засіб (NSAID), такий як флуніксин (flunixin), з фторованим хлорамфеніколом або антибіотиком, який є похідним тіамфеніколу, таким як флорфенікол (florfenicol), можуть бути застосовані для лікування BRD. У патентній публікації США № 2007/0155799, яка у повному обсязі включена до цього опису шляхом посилання, описані нові сполуки феніколу, які можуть застосовуватись як антибіотичні проліки та у комбінації з NSAID або іншими антибіотиками.

[10] NMC (у минулому Національна рада з маститу), неприбуткова організація, діяльність якої спрямована на зниження захворюваності маститом та підвищення якості молока, підкреслює важливість відповідної гігієни дійок, а також відповідного догляду за дійками для запобігання маститу. Економічна шкода, яка спричинюється маститом, примусила до проведення багатьох досліджень, спрямованих на боротьбу із цим захворюванням. Повідомляється, що фізичні стреси, а також умови навколишнього середовища є суттєвими факторами, що сприяють виникненню маститної інфекції. Дивись патентну публікацію США № 2002/0051789, яка включена до цього опису шляхом посилання. Оскільки було документально підтверджено, що субклінічний мастит безпосередньо пов'язаний з поганим станом дійок (Neijenhuis P. et al., (2001) J. Dairy Sci. (84) 2664-2672), був розроблений цілий ряд наявних у продажу розчинів для дезінфекції дійок шляхом занурення, які містять компоненти з кондиціонуальною дією (National Mastitis Council, Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since 1980; January 2002). Було показано, що затверділість та шерехатість кінців дійок мають прямий зв'язок із клінічним маститом (Neijenhuis F. et al., (2001) J. Dairy Sci. (84) 2664-2672). Зменшення розтріскування та подразнення дійок, а також підтримання гнучкості дійок відіграє дуже важливу роль у боротьбі з інфекціями молочних залоз. Гліцерин також застосовують як кондиціонер для дійок у розчинах для дезінфекції дійок шляхом занурення. Однак результати досліджень не показують значного зниження кількості бактерій, які спричинюють мастит, таких як *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* або коліформи, у разі підвищення вмісту гліцерину з 2 % до 10 % у 1 % йодному розчині для дезінфекції дійок шляхом занурення (National Mastitis Council, Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since 1980; January 2002). Таким чином, незважаючи на доступність таких продуктів як розчини для дезінфекції дійок шляхом занурення, все ще залишається незадоволеною необхідність зниження кількості випадків захворювання, повторюваності та/або тяжкості маститу.

[11] У патенті США № 5,849,883, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, описаний ряд антибіотиків, які застосовують при лікуванні маститів, у тому числі, але без обмеження, антибіотики бета-лактамового ряду, такі як пеніциліни (ампіцилін (ampicillin), клоксацилін (cloxacillin), гетацилін (hetacillin), нафцилін (nafcillin), пеніцилін G (penicillin G), (бензилпеніцилін (benzylpenicillin)), прокаїнпеніцилін (procainepenicillin)) та цефалоспорины (цефоперазон (cefoperazone), цефуроксим (cefuroxime), цефалоніум (Cefalonium), цефепірин (cefapirin), цефоксазол (cefoxazole), цефрацетрил (cefracetrile)); антибіотики аміноглікозидного ряду (фраміцетин (framycetin), неоміцин (neomycin), новобіоцин (novobiocin), стрептоміцин (streptomycin)); антибіотики макролідного ряду (еритроміцин (erythromycin)); тетрацикліни (хлортетрациклін (chlortetracycline), окситетрациклін (oxytetracycline)); та антибіотики поліпептидного ряду (поліміксин В (Polymyxin B)). Лікування маститу антибіотиками здійснюють, як правило, шляхом інтрамамарних впливів коровам у лактаційний період, у разі виявлення клінічного маститу, або у сухостійний період (лікування

сухостійних корів). (Bovine Mastitis, supra, на стор. 69). У випадках тяжких клінічних захворювань антибіотики повинні вводиться парентерально, оскільки інтрамамарні вливання є неефективними унаслідок закупорки протоків.

[12] Попередні сподівання, що антибіотики забезпечать повне подолання згаданого захворювання, не справдилися. Жоден із вищезгаданих антибіотиків, які були застосовані до цього часу, не виявився повністю задовільним. На додаток до цього, було встановлено, що було б дуже бажаним замінити лікування із застосуванням антибіотиків на лікування за допомогою хіміко-терапевтичних лікарських сполук неантибіотичної групи, з наведених нижче причин: (1) антибіотики, які є ефективними у галузі людської медицини, не повинні застосовуватись у ветеринарній медицині для запобігання розвитку стійкості бактеріальних штамів, які спричиняють людські захворювання; (2) антибіотики повинні зберігатись для таких захворювань, для лікування яких не існує хіміко-терапевтичної лікарської сполуки, оскільки було доказано, що у бактеріальних штамів розвивається стійкість до такого антибіоту після тривалого його застосування; та (3) у *Staphylococcus aureus*, одного з вищезазначених патогенних мікроорганізмів, вже розвинулась стійкість до більшості антибіотиків, які застосовують при лікуванні маститу великої рогатої худоби.

[13] Один із таких способів лікування хіміко-терапевтичною лікарською сполукою неантибіотичного ряду описано у патенті США № 4,610,993, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, та у якому описаний спосіб лікування маститу великої рогатої худоби ефективною кількістю щонайменше однієї сполуки, якою є дисульфід піридин-N-оксиду. Інший спосіб тих самих винахідників описано у патенті США № 4,401,666, який включений до цього опису шляхом посилання, та у якому описаний спосіб лікування маститу великої рогатої худоби ефективною кількістю щонайменше однієї металічної солі піридин-2-тіон-N-оксиду. Незважаючи на декілька цих опублікованих способів, дуже важливим залишається віднаходження економічно ефективних способів застосування сполук неантибіотичного ряду, які б суттєво подолали недоліки антибіотиків, що застосовувались до цього моменту, і, разом із тим, були б ефективними щодо лікування та запобігання маститу.

[14] Іншим розповсюдженим захворюванням, яке уражає тваринництво на промисловій основі, є транспортна лихоманка (респіраторні хвороби великої рогатої худоби). Респіраторні захворювання є головною причиною втрат м'ясної худоби від захворювань. Термін "транспортна лихоманка" вживають для опису комплексу респіраторних захворювань, які спостерігаються у худоби віком від 6 місяців і більше після транспортування до загород для відгодовування або на пасовисько. Стреси, що є наслідком відлучення, кастрації, видалення рогів, голодного витримування худоби перед забиттям, надмірної скупченості, піддання впливу інфекційних агентів, змін раціону, транспортування, перепадів температури навколишнього середовища та інших стрес-факторів, у поєднанні з вірусними, бактеріальними, мікоплазмовими та/або хламідійними інфекціями, сприяють виникненню комплексу транспортної лихоманки. Змішування телят з різних ферм та/або аукціонних залів значною мірою полегшує піддання впливу інфекційних агентів. Патент США № 6,497,869, який включений до цього опису шляхом посилання, описує деякі початкові інфекційні агенти, які можуть уражати велику рогату худобу. Змішування поголів'я може бути більш важливим сприятливим фактором для виникнення транспортної лихоманки, аніж стрес-фактори, хоча захворювання, яке виникає без змішування та стрес-факторів, як правило, різко погіршує перебіг респіраторного захворювання. Спроби зниження стресового навантаження унаслідок відлучення, кастрації, видалення рогів тощо, а також при звичування худоби до нових раціонів за дні та тижні до транспортування, бувають подеколи успішними (але можуть не бути економічно ефективними) щодо зниження рівня захворюваності на транспортну лихоманку. Подеколи допомагає вакцинація проти деяких інфекційних агентів, які спричиняють транспортну лихоманку, але вакцини є доступними та ефективними лише для декількох інфекційних агентів, відомих як агенти, які спричиняють згаданий комплекс захворювань.

[15] Загальновизнаним є те, що кінцевою причиною смерті у більшості випадків транспортної лихоманки є бактеріальна (як правило, пастерельозна) пневмонія. *Pasteurella haemolytica*, зокрема, тип 1A, є найпоширенішою бактерією, що виділяється у випадках респіраторного захворювання у Північній Америці. Спроби експериментального відтворення бактеріальної пневмонії у великої рогатої худоби є, як правило, безуспішними без важкого стресу та супутнього пошкодження дихальних шляхів. Вважають, як правило, що у разі стресу віруси, мікоплазми та/або хламідії найчастіше спричиняють початкове пошкодження дихальних шляхів, яке сприяє виникненню тяжкої бактеріальної інфекції та захворювання.

[16] Типовий спалах клінічного респіраторного захворювання розпочинається, як правило, через декілька годин або днів після прибуття худоби до загороди для відгодовування. У

нещодавно привезеної худоби у ваговому діапазоні від 400 фунтів до 500 фунтів (181,4-226,8 кг) рівень захворюваності на хвороби органів дихання становить від 10 % до 80 %, а рівень смертності дорівнює 1-10 % або більше. У разі аналізу сироватки цієї худоби виявляють чотирикратне підвищення рівня антитіл (сероконверсія), а при мікробіологічних дослідженнях дихальних шляхів та їх секретів можуть бути ідентифіковані міриади етіологічних агентів. Можна показати, що багато тварин (як хворих, так і здорових на вигляд) перенесли інфікування одним або декількома агентами (захворювання органів дихання, ймовірно, зрідка коли викликається лише одним інфекційним агентом). Незважаючи на те, що комплекс респіраторних хвороб великої рогатої худоби клінічно розпізнається після прибуття до загороди для відгодовування, інфекції, унаслідок яких виникає клінічне захворювання, розпочинаються, ймовірно, у аукціонних залах, де спочатку збирається худоба з різних ферм. Дивись також публікацію Bovine Respiratory Disease, Loan R.W. Texas A & M University Press, 1984, яка включена до цього опису шляхом посилання.

[17] Корисним у ветеринарній медицині було б введення сполуки, яка лікує або зменшує кількість випадків захворювання, повторюваність, тривалість та/або тяжкість маститу або хвороби органів дихання у великої рогатої худоби або інших інфекцій у тварин, окрім людей, у тому числі, але без обмеження, великої рогатої худоби, птиці, свиней, коней, собак та кішок. До прикладів таких інфекцій належать, але без обмеження ними, септицемія новонароджених лоша́т, плевропневмонія у свиней та пневмонія у тварин, окрім людей. Такі сполуки можуть відновлювати або модулювати функцію нейтрофілів у тварини.

[18] Родина супергенів гормону росту (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. and Ihle J.N. (1996) Signaling by the Hematopoietic Cytokine Receptors) являє собою набір білків із подібними структурними характеристиками. До складу кожного члена цієї родини білків входить чотириспиральний пучок. Незважаючи на існування ще неідентифікованих членів цієї родини, прикладами деяких членів цієї родини є такі: гормон росту, пролактин, плацентарний лактоген, еритропоетин (EPO), тромбopoетин (TPO), інтерлейкін-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (субодиниця p35), IL-13, IL-15, онкостатин M, циліарний нейротропний фактор, фактор інгібування лейкозних клітин, інтерферон альфа, інтерферон бета, інтерферон гамма, інтерферон омега, інтерферон тау, інтерферон епсилон, гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор (GM-CSF), макрофагальний колонієстимулювальний фактор (M-CSF) та кардіотропін-1 (CT-1) ("родина супергенів GH"). Члени родини супергенів GH мають подібні вторинні та третинні структури, незважаючи на те, що вони, як правило, мають обмежену ідентичність амінокислот або послідовностей ДНК. Спільні відмітні структурні ознаки забезпечують можливість легкої ідентифікації нових членів згаданої родини генів. Опис пептидів із чотириспиральним пучком наведений у WO 2005/074650, що має назву "Modified Human Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses", яка у повному обсязі включена до цього опису шляхом посилання.

[19] Членом родини супергенів GH є гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF). Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF) є одним з декількох глікопротеїнів фактора росту, відомих як колонієстимулювальні фактори (CSF), оскільки вони підтримують проліферацію кровотворних клітин-попередників. G-CSF стимулює проліферацію специфічних клітин-попередників кісткового мозку та їх диференціацію у гранулоцити. Він відрізняється від інших CSF своєю здатністю як до стимулювання утворення колоній нейтрофільних гранулоцитів у напівтвердому агарі, так і до індукування термінальної диференціації мишачих лейкозних клітин мієломоноцитарного походження *in vitro*. Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор є сильнодіючим стимулятором проліферації та визрівання нейтрофілів *in vivo* (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 2484-2488, дивись також Heidari et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 2001; 81:45-57, ці публікації включені до цього опису шляхом посилання). G-CSF є також здатним до індукування функціональної активації або "праймування" зрілих нейтрофілів *in vitro* (Weisbart R.H., Gasson C.G., and D.W. Golde. Annals of Internal Medicine 1989; 110:297-303). Було показано, що G-CSF праймує людські гранулоцити і посилює виділення супероксиду, стимульоване хемотактичним пептидом, N-форміл-метіоніл-лейцил-феналаніном (S. Kitagawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 144:1143-1146, та C.F. Nathan, Blood 1989; 74:301-306), та активує людські нейтрофіли при IgA-опосередкованому фагоцитозі (Weisbart R.H., et al., Nature 1988; 332: 647-649).

[20] Нейтрофіли є критичною складовою механізмів захисту хазяїна проти бактеріальних та грибкових інфекцій. G-CSF є здатним до індукування підвищення абсолютної кількості циркулюючих нейтрофілів та стимулювання їх функції.

[21] Були описані кДНК клонування та експресія рекомбінантного людського G-CSF (hG-CSF), і було підтверджено, що рекомбінантний hG-CSF демонструє більшість (якщо не усі) біологічних властивостей нативної молекули (Souza L. et al. Science 232, 61-65 (1986)). Аналіз послідовностей клонів кДНК та геномної ДНК уможливив виведення амінокислотної послідовності та встановлення, що довжина білка становить 204 амінокислоти із сигнальною послідовністю довжиною у 30 амінокислот. Довжина зрілого білка дорівнює 174 амінокислотам, і він не має потенційних сайтів N-зв'язаного глікозилювання, але має декілька можливих сайтів O-зв'язаного глікозилювання.

[22] Клонування та експресія кДНК, яка кодує людський G-CSF, були описані двома групами (Nagata S. et. al., Nature 319, 415-418 (1986); Souza L.M. et al., Science 232, 61-65 (1986)). У першому повідомленні про клон кДНК G-CSF припускалось, що зрілий білок має 177 амінокислот у довжину. Автори повідомили, що вони також ідентифікували клон кДНК G-CSF, який кодував білок, якому бракувало відрізка з трьох амінокислот. Ця коротша форма кДНК G-CSF експресувала G-CSF очікуваної активності. Друге повідомлення описує послідовність кДНК, ідентичну цій короткій формі, і не згадує про інші варіанти. Оскільки ці автори підтвердили, що коротка кДНК експресує G-CSF з очікуваним профілем біологічної активності, ймовірно, що це є важлива форма G-CSF, і що довша форма є або вторинним сплайсинговим варіантом, або артефактом клонування.

[23] Matsumoto et al., у Infection and Immunity, Vol. 55, No. 11, стор. 2715 (1987), обговорюють захисний ефект людського G-CSF у разі мікробної інфекції у мишей з нейтропенією.

[24] Наведені нижче патентні публікації мають відношення до G-CSF: у WO 87/03689, яка включена до цього опису шляхом посилання, описані гібридами, які продукують моноклональні антитіла, специфічні до людського G-CSF, та їх застосування при очищенні G-CSF; у WO 87/02060, яка включена до цього опису шляхом посилання, описані людські G-CSF-подібні поліпептиди та способи їх продукування; у патенті США № 4,810,643, включеному до цього опису шляхом посилання, описані людські G-CSF-подібні поліпептиди, послідовності, які їх кодують, та способи їх продукування; та у WO 86/04605 і WO 86/04506, які включені до цього опису шляхом посилання, описані ген, який кодує людський G-CSF, та інгібітори інфекційних агентів, які містять людський G-CSF. Ізоляція h-GCSF та продукування G-CSF у клітинах-хазяях, наприклад, E. coli, описані, наприклад, у патентах США № 4,810,643; № 4,999,291; № 5,580,755; та № 6,716,606, які включені до цього опису шляхом посилання.

[25] G-CSF є фармацевтично активним білком, який регулює проліферацію, диференціацію та функціональну активацію нейтрофільних гранулоцитів (Metcalf, 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) та Gabrilove, J. Seminars in Hematology 26:2 1-14 (1989)). G-CSF було очищено до однорідності із супернатантів культури лінії клітин 5637 раку людського сечового міхура (Welte et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1985) 82:1526-1530). Послідовність кДНК, яка кодує нативний hG-CSF, є відомою з публікації Souza et al., Science (1986) 232:61-65. Як результат альтернативного сплайсингу у другому інтроні, існує дві природні форми hG-CSF з 204 амінокислотами або 207 амінокислотами, перші 30 з яких відповідають сигнальному пептиду (Lymphokines, IRL Press, Oxford, Washington D.C., Editors D. Male and C. Rickwood). Було показано, що зрілий білок має молекулярну масу приблизно 19 кДа і 5 цистеїнових залишків, які можуть утворювати міжмолекулярні та внутрішньомолекулярні дисульфідні містки. Результати досліджень зв'язування показали, що hG-CSF зв'язується з нейтрофільними гранулоцитами. Спостерігається незначне зв'язування або повна його відсутність з еритроїдами, еозинофілами лінії клітин лімфоїдного ряду, а також з макрофагами.

[26] У людей ендогенний G-CSF виявляють у плазмі крові (Jones et al. Bailliere's Clinical Hematology 2:1 83-111 (1989)). hG-CSF продукується фібробластами, макрофагами, Т-клітинами, трофобластами, ендотеліальними клітинами та епітеліальними клітинами і є продуктом експресії однокопійного гена, який включає в себе чотири екзони та п'ять інтронів, розміщених на сімнадцятій хромосомі. Транскрипція цього локусу продукує різновиди мРНК, які зазнають диференційованого процесингу, результатом чого є дві форми мРНК hG-CSF, де одна із цих версій кодує білок довжиною у 177 амінокислот, а друга кодує білок довжиною у 174 амінокислоти (Nagata et al. EMBO J 5: 575-581 (1986)), і було встановлено, що форма, яка складається з 174 амінокислот, має найбільшу специфічну біологічну активність in vivo. hG-CSF дає перехресну реакцію з іншими різновидами, так що, якщо людський G-CSF вводять іншому ссавцю, такому як миша, собака або мавпа, це спричинює тривалий нейтрофільний лейкоцитоз (Moore et al. PNAS-USA 84: 7134-7138 (1987)).



[27] G-CSF можна одержати і очистити з цілого ряду джерел. Природний людський G-CSF (nhG-CSF) можна виділити із супернатантів культивованих ліній клітин людських пухлин. Розробка методу рекомбінантних ДНК (дивись, наприклад, патент США № 4,810,643 (Souza), включений до цього опису шляхом посилання) надала можливість продукування G-CSF у промисловому масштабі у глікозилованій формі як продукт експресії еукаріотних клітин-хазяїв та G-CSF у неглікозилованій формі як продукт експресії прокаріотних клітин-хазяїв.

[28] Було встановлено, що G-CSF є прийнятним для лікування симптомів, у разі виникнення яких сприятливу дію може справити підвищення кількості нейтрофілів. G-CSF може мобілізувати стовбурові клітини та клітини-попередники з кісткового мозку і застосовується для лікування хворих у стані вичерпання гранулоцитів в результаті хіміотерапії або як вступний етап у разі трансплантації кісткового мозку. Наприклад, для хворих на рак G-CSF є корисним як засіб селективного стимулювання продукування нейтрофілів з метою компенсування кровотворної недостатності, яка є результатом хіміотерапії або променевої терапії. До інших варіантів застосування належить лікування різних інфекційних захворювань та споріднених станів, таких як сепсис, який, як правило, спричинюється метаболітами бактерій. G-CSF є також корисним окремо або у комбінації з іншими сполуками, такими як інші цитокіни, для культивування або експансії клітин у культурі, наприклад, для культивування клітин трансплантата кісткового мозку.

[29] Рецептор G-CSF (G-CSFR) є членом родини рецепторів кровотворного фактора/цитокінного фактора/фактора росту, яка включає в себе декілька інших рецепторів фактора росту, таких як рецептори інтерлейкіну (IL)-3,-4 та -6, рецептор гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF), рецептор еритропоєтину (EPO), а також рецептори пролактину та гормону росту. Дивись, Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 6934-6938 (1990). Члени родини цитокінних рецепторів містять чотири консервативні цистеїнові залишки та мотив "триптофан-серин-Х-триптофан-серин", розміщений безпосередньо за межами трансмембранної ділянки. Вважають, що консервативні послідовності приймають участь у білок-білкових взаємодіях. Дивись, наприклад, Chiba et al., Biochim. Biophys. Res. Comm. 184: 485-490 (1992). Рецептор G-CSF складається з одного пептидного ланцюга, який має молекулярну масу приблизно 150 кДа (Nicola, Immunol. Today 8 (1987), 134).

[30] Глікозилований hG-CSF порівнювали з деглікозилованим hG-CSF, який одержали шляхом *in vitro* ферментативного розщеплення нейрамінідазою та ендо- $\alpha$ -N-ацетилгалактозамінідазою, стосовно його стабільності у залежності від pH та температури (Oheda et al., 1990, J. Biol. Chem. 265 (20): 11432-11435). Деглікозилований hG-CSF, розчинений з концентрацією 1 мкг/мл у 20 мМ розчині фосфатного буфера, який містив 0,2 М розчин NaCl та 0,01 % розчин твін-20, швидко інактивувався у межах значення pH від приблизно pH 7 до приблизно pH 8 після дводенного інкубування при температурі 37°C. На відміну від цього, глікозилований hG-CSF зберігав більше 80 % своєї активності за таких самих умов. Окрім того, результати визначення термічної стабільності обох форм hG-CSF, яку визначали за допомогою біологічного аналізу та калориметричного аналізу, показали, що деглікозилований hG-CSF був менш термостабільним, аніж нативна форма hG-CSF.

[31] Із метою одержання стабільних, фармацевтично прийнятних композицій на основі G-CSF, здійснили ряд спроб. Одна зі спроб поліпшення композиційної стабільності G-CSF включала синтез похідних згаданого білка. У патенті США № 5,665,863 описане одержання рекомбінантних химерних білків, що містять G-CSF, зв'язаний з альбуміном, які мають нові фармакокінетичні властивості. У патенті США № 5,824,784 та патенті США № 5,320,840 описане хімічне приєднання водорозчинних полімерів до білків для поліпшення стабільності та забезпечення захисту проти протеолітичної деградації, і конкретніше, описані молекули G-CSF, модифіковані на N-кінці, які несуть хімічно приєднані полімери, у тому числі поліетиленгліколь.

[32] Структури ряду цитокінів, у тому числі 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)) та IL-5 (Milburn et al., Nature 363: 172-176 (1993)), були визначені рентгенографічними та ЯМР-дослідженнями і продемонстрували вражаючу консервативність, порівняно із структурою GH, незважаючи на відсутність суттєвої гомології первинної структури.

[33] Альтернативний підхід до підвищення стабільності G-CSF у композиції передбачає зміну амінокислотної послідовності білка. У патенті США № 5,416,195 описані сконструйовані методами генної інженерії аналоги G-CSF, які мають поліпшену композиційну стабільність, де цистеїновий залишок, який за нормальних обставин знаходиться у положенні 17 ланцюга

зрілого поліпептиду, залишок аспарагінової кислоти, який знаходиться у положенні 27, та щонайменше один із тандемних пролінових залишків, які знаходяться у положеннях 65 та 66, замінені на сериновий залишок. У патенті США № 5,773,581 описані сконструйовані методами генної інженерії аналоги G-CSF, які були кон'юговані з водорозчинним полімером.

[34] Різні форми людського G-CSF, а також методи їх одержання та очищення, прийнятні для способу лікування або запобігання маститу, докладно описані у патенті США № 4,810,643, включеному до цього опису шляхом посилання. У патенті США № 4,810,643 описані і заявлені нові сегменти генів, біологічно функціональні рекомбінантні плазмиди та віруси на основі вірусної ДНК і прокаріотні та еукаріотні клітини-хазяї, які містять ген G-CSF або сконструйований методами генної інженерії варіант гена G-CSF. Клітини-хазяї експресують біологічно активний G-CSF або сконструйований методами генної інженерії варіант G-CSF. У патенті США № 5,849,883 та WO 89/10932 описані різні дослідження, проведені з людським G-CSF на великій рогатій худобі. Згадані дослідження були проведені з метою вивчення захворювань органів дихання (*Pasteurella hemolytica*), реакцій на бактеріальні контрольні зараження (*Klebsiella pneumoniae*) або коліформний мастит (*E. coli*) у великої рогатої худоби.

[35] У патенті США № 5,849,883, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, представлені полінуклеотидна та поліпептидна послідовності зрілого бичачого G-CSF (bG-CSF) та описані способи клонування, ізолювання та очищення згаданого поліпептиду та його аналогів. Зрілий b-GCSF має у довжину 174 амінокислоти (послідовність SEQ ID NO: 1) і 82 % гомологію з hG-CSF. Поліпептид bG-CSF з вихідним залишком амінокислоти метіоніну представлений як послідовність SEQ ID NO: 2. Полінуклеотидна послідовність, яка кодує послідовність SEQ ID NO: 1, представлена як послідовність SEQ ID NO: 3. Полінуклеотидна послідовність, яка кодує послідовність SEQ ID NO: 2, представлена як послідовність SEQ ID NO: 4. Heidari et al. описали експресію, очищення та біологічну активність bG-CSF у *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57.

[36] Ковалентне приєднання гідрофільного полімеру полі(етиленгліколю), скорочено PEG, являє собою спосіб підвищення водорозчинності, біологічної доступності, підвищення періоду напіввиведення з плазми, підвищення періоду напіввиведення терапевтично ефективної кількості, модулювання імуногенності, модулювання біологічної активності або подовження періоду циркуляції багатьох біологічно активних молекул, у тому числі білків, пептидів і, зокрема, гідрофобних молекул. PEG широко застосовують у фармацевтичних препаратах, штучних імплантатах та в інших варіантах застосування, де важливу роль відіграє біологічна сумісність, відсутність токсичності та відсутність імуногенності. З метою доведення необхідних властивостей PEG до максимального рівня, загальна молекулярна маса та гідратаційний стан полімеру PEG або полімерів, приєднаних до біологічно активної молекули, повинні бути достатньо високими для наділення корисними характеристиками, які, як правило, пов'язуються з приєднанням полімеру PEG, такими як підвищена водорозчинність та підвищений період напіввиведення з плазми, без справляння одночасного негативного впливу на біологічну активність вихідної молекули.

[37] Похідні PEG часто зв'язуються з біологічно активними молекулами через реакційноздатні хімічні функціональні групи, такі як залишки лізину, цистеїну та гістидину, N-кінець та вуглеводні складові. Білки та інші молекули часто мають обмежену кількість реакційноздатних ділянок, доступних для приєднання полімеру. Часто ділянки, найбільш придатні для модифікування шляхом приєднання полімеру, відіграють суттєву роль у зв'язуванні рецептора і є необхідними для збереження біологічної активності молекули. Як результат, невпорядковане приєднання полімерних ланцюгів до таких реакційноздатних ділянок на біологічно активній молекулі часто призводить до значного зниження або навіть повної втрати біологічної активності модифікованої полімером молекули. R. Clark et al., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:21969-21977. Для одержання кон'югатів із достатньою молекулярною масою полімеру для надання необхідних переваг молекулі-мішені, відомі варіанти підходів включали, як правило, довільне приєднання численних відгалужень полімеру до молекули, з підвищенням, тим самим, ризику зменшення або навіть повної втрати біологічної активності вихідної молекули.

[38] Реакційноздатні ділянки, які утворюють локуси для приєднання похідних PEG до білків, визначаються структурою білка. Білки, у тому числі ферменти, складаються з різних послідовностей альфа-амінокислот, які мають загальну структуру  $H_2N-CHR-COOH$ . Альфа-аміноскладова ( $H_2N-$ ) однієї амінокислоти приєднується до карбоксильної складової ( $-COOH$ ) прилеглої амінокислоти з утворенням амідних зв'язків, які можуть бути представлені як  $-(NH-CHR-CO)_n-$ , де нижній індекс "n" може дорівнювати сотням або тисячам. Фрагмент,

представлений R, може містити реакційноздатні ділянки для біологічної активності білка і для приєднання похідних PEG.

[39] Наприклад, для амінокислоти лізину, у епсилон-положенні, а також у альфа-положенні існує  $-NH_2$  складова. Епсилон  $-NH_2$  є вільною для реагування за умов основного pH. Більшість зусиль у галузі дериватизації білків PEG була спрямована на розробку похідних PEG для приєднання до епсилон  $-NH_2$  складової залишку лізину, присутнього у білках. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, стор. 1-17. Усі ці похідні PEG, однак, мають спільне обмеження, яке полягає у тому, що вони не можуть селективно розміщуватись серед часто численних залишків лізину, присутніх на поверхні білків. Це може бути суттєвим обмеженням у випадках, коли залишок лізину є важливим для активності білка і знаходиться, наприклад, на ферментативно-активній ділянці, або у випадках, коли залишок лізину відіграє роль у опосередковуванні взаємодії білка з іншими біологічними молекулами, наприклад, у випадку рецептор-зв'язувальних ділянок.

[40] Друге і однаково важливе ускладнення існуючих способів пегілювання білків полягає у тому, що похідні PEG можуть вступити до небажаних побічних реакцій з іншими залишками, окрім необхідних. Гістидин містить реакційноздатну іміноскладову, структурно представлену як  $-N(H)-$ , однак багато хімічно реакційноздатних різновидів, які реагують з епсилон  $-NH_2$ , можуть також реагувати з  $-N(H)-$ . Аналогічно, бічний ланцюг амінокислоти цистеїну несе вільну сульфгідрильну групу, структурно представлену як  $-SH$ . У деяких випадках похідні PEG, спрямовані на епсилон  $-NH_2$  групу лізину, можуть також реагувати з цистеїновим, гістидиновим або іншими залишками. Це може призвести до утворення складних гетерогенних сумішей PEG-дериватизованих біологічно активних молекул і до ризику знищення активності біологічної молекули, яка виступає у ролі мішені. Бажано було б розробити похідні PEG, які дозволяли б введення хімічно функціональної групи на одній ділянці у межах білка, що у подальшому могло б забезпечити можливість селективного з'єднання одного або декількох полімерів PEG з біологічно активною молекулою на конкретних ділянках на поверхні білка, які є добре визначеними та прогнозованими.

[41] На додаток до залишків лізину, значні зусилля у цій галузі були спрямовані на розробку активованих реактивів PEG, за мішені для яких правлять інші бічні ланцюги амінокислот, у тому числі цистеїну, гістидину та N-кінця. Дивись, наприклад, патент США № 6,610,281, включений до цього опису шляхом посилання, та "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, стор. 1-17. Цистеїновий залишок можна ввести до визначеного сайту у структурі білків шляхом сайт-спрямованого мутагенезу та інших способів, відомих у цій галузі, і вільна сульфгідрильна складова, яка буде одержана, може реагувати з похідними PEG, які несуть тіол-реакційні функціональні групи. Цей підхід, однак, є складним у тому відношенні, що введення вільної сульфгідрильної групи може ускладнити експресію, укладання та стабільність білка, який буде одержано. Таким чином, бажано було б мати засіб введення хімічної функціональної групи до біологічно активних молекул, який забезпечував би селективне сполучення одного або декількох полімерів PEG із білком, з одночасною сумісністю (тобто невступленням до небажаних побічних реакцій з) із сульфгідрилами та іншими хімічно функціональними групами, які, як правило, входять до складу білків.

[42] Як видно із зразків у цій галузі, багато з цих похідних, які були розроблені для приєднання до бічних ланцюгів білків, зокрема  $-NH_2$  складової бічного ланцюга амінокислоти лізину та  $-SH$  складової бічного ланцюга цистеїну, виявились проблематичними щодо синтезу та застосування. Деякі утворюють нестабільні зв'язки з білком, який піддається гідролізу, і, унаслідок цього, розкладаються, деградують або є по-іншому нестабільними у рідких середовищах, таких як кров'яне русло. Деякі утворюють більш стабільні зв'язки, однак піддаються гідролізу до утворення зв'язку, що означає, що реактивна група на похідній PEG може бути інактивована до приєднання білка. Деякі мають певну токсичність і, унаслідок цього, є менш прийнятними для застосування *in vivo*. Деякі реагують занадто повільно, щоб бути практично прийнятними. Деякі спричиняють втрату активності білка в результаті приєднання до ділянок, які несуть відповідальність за активність білка. Деякі не є специфічними на ділянках, до яких вони приєднуються, результатом чого також може бути втрата бажаної активності та неможливість відтворення результатів. З метою подолання проблем, пов'язаних із модифікуванням білків полі(етиленгліколевыми) складовими, були розроблені похідні PEG, які є більш стабільними (наприклад, патент США № 6,602,498, включений до цього опису шляхом посилання) або які селективно реагують із тіоловими складовими на молекулах та поверхнях (наприклад, патент США № 6,610,281, включений до цього опису шляхом посилання). Безсумнівно, у цій галузі існує потреба у похідних PEG, які є хімічно нейтральними у

фізіологічному середовищі до виникнення необхідності селективного реагування для утворення стабільних хімічних зв'язків.

[43] Застосування кон'югатів гідроксіалкілкрохмалю і, зокрема, застосування гідроксіетилкрохмалю (HES), ковалентно зв'язаного з поліпептидом, було описано з метою потенційної зміни імуногенності та/або алергенності поліпептиду. Сполучення нативної молекули з HES є альтернативною методикою, описаною у ряді заявок на патент, права на які були передані компанії Fresenius Kabi AB, у тому числі у патентних публікаціях США № 2005/0063943, № 2006/0121073, № 2001/0100163, № 2005/0234230, № 2005/0238723, № 2006/0019877, № 2007/0134197, № 2007/0087961, а також у патенті США № 7,285,661, усі з яких включені до цього опису шляхом посилання. HES являє собою модифікований природний полімер, який застосовують клінічно як плазмозамінник, а процес приєднання гідроксіетилкрохмалю являє собою методику сполучення лікарських речовин із похідними HES для модифікування характеристик лікарської речовини, таких як фармакокінетика або водорозчинність. Сюди належить також збільшення періоду циркуляції білка у плазмі завдяки підвищеній стабільності молекули та зниженню ниркового кліренсу, результатом чого є підвищена біологічна активність. Окрім того, може бути зменшена імуногенність або алергенність. Шляхом змінювання різних параметрів, таких як молекулярна маса HES, можна одержувати різноманітні необхідні кон'югати HES. Однак гідроксіетилкрохмаль має спільний недолік з усіма іншими доступними на цей час полімерами: його полідисперсність. Полімерні кон'югати являють собою суміш молекул, молекулярна маса яких розподіляється довкола середнього значення. Результатом браку гомогенності є низький рівень визначення хімічних та біохімічних характеристик, що може запобігти досягненню фармацевтично активним компонентом ділянки його дії (рецептор, фермент тощо). У цих випадках лікарська речовина, яка повинна бути активною, потребує доставки у вихідній некон'югованій формі, тобто розщеплення полімеру метаболічними реакціями є необхідним для її фармацевтичної ефективності.

[44] Нещодавно з'явилось повідомлення про абсолютно нову технологію у галузі наук про білок, яка обіцяє подолання більшості обмежень, пов'язаних із сайт-специфічними модифікаціями білків. Конкретно, до білкового біосинтетичного механізму клітин прокариотів *Escherichia coli* (*E. coli*) (описаного, наприклад, у L. Wang, et al., (2001), *Science* 292:498-500) та клітин еукаріотів *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (описаного, наприклад, у J. Chin et al., *Science* 301:964-967 (2003)) були додані нові компоненти, які надали можливість введення негенетично закодованих амінокислот до білків *in vivo*. За допомогою цієї методики ряд нових амінокислот з новими хімічними, фізичними або біологічними властивостями, у тому числі фотоафінні мітки та амінокислоти, які зазнають фотоізомеризації, фотозшивні амінокислоти (дивись, наприклад, Chin J.W., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:11020-11024; та Chin J.W., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027), кето-амінокислоти, амінокислоти, що містять важкі атоми, та глікозиловані амінокислоти, були ефективно та з високою надійністю введені до білків *E. coli* та дріжджів у відповідь на амбер-кодон, TAG. Дивись, наприклад, 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; та L. Wang & P.G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Усі вищенаведені посилання у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання. Ці дослідження продемонстрували можливість селективного та нескладного введення хімічних функціональних груп, таких як кетогрупи, алкінові групи та азидні складові, яких немає у білках, які є хімічно нейтральними до усіх функціональних груп, що знаходяться у 20 звичайних генетично закодованих амінокислотах, і які можуть застосовуватись для ефективного та селективного реагування з утворенням стабільних ковалентних зв'язків.

[45] Можливість введення до білків негенетично закодованих амінокислот надає можливість введення хімічних функціональних груп, які могли б являти собою цінні альтернативні варіанти природним функціональним групам, таким як епсилон -NH<sub>2</sub> лізину, сульфгідрильна група -SH цистеїну, іміногрупа гістидину тощо. Відомо, що певні хімічні функціональні групи є нейтральними до функціональних груп, які знаходяться у 20 звичайних генетично закодованих амінокислотах, але чітко та ефективно реагують з утворенням стабільних зв'язків. У цій галузі відомо, наприклад, що азидні та ацетиленові групи вступають до реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена у водних умовах у присутності каталітичної кількості міді. Дивись, наприклад, Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; та Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Шляхом введення азидної складової до структури білка, наприклад, можна ввести функціональну групу, яка є хімічно нейтральною до амінів, сульфгідрилів, карбонових кислот, гідроксильних груп, які знаходяться у білках, але яка також чітко та ефективно реагує з

ацетиленовою складовою з утворенням продукту циклоприєднання. Важливим є те, що за відсутності ацетиленової складової, азид залишається хімічно нейтральним та інертним у присутності інших бічних ланцюгів білків та за фізіологічних умов.

[46] Цей винахід спрямований, разом з іншим, на проблеми, пов'язані з активністю та продукуванням поліпептидів bG-CSF, а також спрямований на продукування поліпептиду bG-CSF з поліпшеними біологічними або фармакологічними властивостями та/або подовженим періодом напіввиведення його терапевтично ефективної кількості.

Суть винаходу

[47] Цей винахід пропонує поліпептиди bG-CSF, які містять одну або декілька штучно закодованих амінокислот.

[48] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить одну або декілька посттрансляційних модифікацій. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF приєднаний до сполучного агента, полімеру або біологічно активної молекули. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF приєднаний до біфункціонального полімеру, біфункціонального сполучного агента або щонайменше одного додаткового поліпептиду bG-CSF.

[49] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота приєднана до водорозчинного полімеру. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згаданий водорозчинний полімер містить полі(етилєнглїколеву) складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота сполучена з водорозчинним полімером за допомогою сполучного агента або приєднана до водорозчинного полімеру. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекула полі(етилєнглїколю) є біфункціональним полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу біфункціональний полімер є сполученим з другим поліпептидом. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згаданим другим поліпептидом є поліпептид bG-CSF.

[50] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить щонайменше дві амінокислоти, сполучені з водорозчинним полімером, який містить полі(етилєнглїколеву) складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу щонайменше одна амінокислота є штучно закодованою амінокислотою.

[51] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та до будь-якої їхньої комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[52] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень 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, та будь-якої їх комбінації послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та будь-якої їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до положення 62 bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до положення 133 bG-

CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид за цим винаходом містить заміну, додання або делецію однієї або декількох природних амінокислот. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучних амінокислот вводять до лідерної або сигнальної послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF.

[53] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та у будь-якій їхній комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[54] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 62, 133, 166, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 62 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 133 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у лідерній або сигнальній послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF є сполученою з водорозчинним полімером.

[55] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють спорідненість поліпептиду bG-CSF до рецептора або партнера зв'язування, у тому числі, але без обмеження, білка, поліпептиду, невеликої молекули або нуклеїнової кислоти. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують стабільність поліпептиду bG-CSF при порівнянні зі стабільністю відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. Стабільність та/або розчинність можна визначати із застосуванням цілого ряду різних аналізів, відомих фахівцям у цій галузі. До таких аналізів належать (але без обмеження ними) гель-хроматографія за розміром молекул (SE-HPLC) та вискоефективна рідинна хроматографія з оберненою фазою (RP-HPLC). В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють імуногенність поліпептиду bG-CSF при порівнянні з імуногенністю відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють період напіввиведення поліпептиду bG-CSF з плазми або час знаходження поліпептиду bG-CSF у кровообізі при порівнянні з періодом напіввиведення з плазми або часом знаходження у кровообізі відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції.

[56] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують розчинність поліпептиду bG-CSF у воді при порівнянні із

розчинністю у воді відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують розчинність поліпептиду bG-CSF, продукovanого клітиною-хазяїном при порівнянні із розчинністю відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують експресію поліпептиду bG-CSF у клітині-хазяїні або підвищують синтез *in vitro* при порівнянні з експресією або синтезом відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. Поліпептид bG-CSF, який містить цю заміну, зберігає агоністичну активність і зберігає або поліпшує рівні експресії у клітині-хазяїні. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують стійкість поліпептиду bG-CSF до протеаз при порівнянні із стійкістю до протеаз відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють активність трансдукції сигналу рецептора при порівнянні з активністю рецептора при взаємодії з відповідним поліпептидом bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють його зв'язування з іншою молекулою, такою як рецептор, при порівнянні зі зв'язуванням відповідного поліпептиду bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють гемопоез при порівнянні з гемопоезом у присутності відповідного поліпептиду bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють проліферацію нейтрофілів при порівнянні з проліферацією нейтрофілів у присутності відповідного поліпептиду bG-CSF без заміни, додання або делеції. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які модулюють визрівання нейтрофілів при порівнянні з визріванням нейтрофілів у присутності відповідного поліпептиду bG-CSF без заміни, додання або делеції.

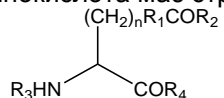
[57] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить заміну, додання або делецію, які підвищують сумісність поліпептиду bG-CSF із фармацевтичними консервантами (наприклад, м-крезолом, фенолом, бензиловим спиртом) при порівнянні із сумісністю відповідного bG-CSF без заміни, додання або делеції. Ця підвищена сумісність надає можливість одержання консервованої фармацевтичної лікарської форми, яка зберігає фізико-хімічні властивості та біологічну активність білка під час зберігання.

[58] В деяких варіантах здійснення цього винаходу з однією або декількома штучними амінокислотами утворюють один або декілька сконструйованих зв'язків. Внутрішньомолекулярний зв'язок може бути утворений багатьма способами, у тому числі, але без обмеження, шляхом реакції між двома амінокислотами у межах білка за відповідних умов (одна або обидві амінокислоти можуть бути штучною(-ими) амінокислотою(-ами)); шляхом реакції двох амінокислот, кожна з яких може бути природно закодованою або штучно закодованою, зі сполучною групою, полімером або іншою молекулою за відповідних умов тощо.

[59] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька амінокислотних заміну у поліпептиді bG-CSF можуть відбуватись з однією або декількома природними або штучними амінокислотами. В деяких варіантах здійснення цього винаходу амінокислотні заміни у поліпептиді bG-CSF можуть відбуватись з природними або штучними амінокислотами, за умови, що щонайменше одна заміна відбувається зі штучно закодованою амінокислотою. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька амінокислотних заміну у поліпептиді bG-CSF можуть відбуватись з однією або декількома природними амінокислотами і, крім того, щонайменше одна заміна відбувається зі штучно закодованою амінокислотою.

[60] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить карбонільну групу, ацетильну групу, амінооксигрупу, гідразинову групу, гідразидну групу, семікарбазидну групу, азидну групу або алкінову групу.

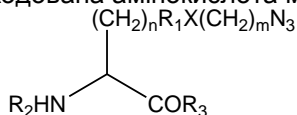
[61] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить карбонільну групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота має структуру:



де  $n = 0-10$ ;  $\text{R}_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил;  $\text{R}_2$  – H, алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил;  $\text{R}_3$  – H, амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор;  $\text{R}_4$  – H, амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор.

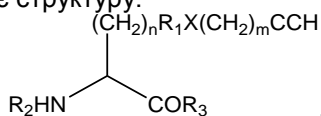
[62] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить амінооксигрупу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить гідразидну групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить гідразинову групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить семікарбазидну групу.

[63] В деяких варіантах здійснення цього винаходу залишок штучно закодованої амінокислоти містить азидну групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота має структуру:



де  $n = 0-10$ ;  $\text{R}_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл, заміщений арил або відсутній;  $\text{X} = \text{O}, \text{N}, \text{S}$  або відсутній;  $m = 0-10$ ;  $\text{R}_2 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, і  $\text{R}_3 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор.

[64] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить алкінову групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота має структуру:



де  $n = 0-10$ ;  $\text{R}_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил;  $\text{X} = \text{O}, \text{N}, \text{S}$  або відсутній;  $m = 0-10$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, і  $\text{R}_3 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор.

[65] В деяких варіантах здійснення цього винаходу згаданий поліпептид є агоністом, частковим агоністом, антагоністом, частковим антагоністом або зворотним агоністом поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу агоніст, частковий агоніст, антагоніст, частковий антагоніст або зворотний агоніст поліпептиду bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту, сполучену з водорозчинним полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу агоніст, частковий агоніст, антагоніст, частковий антагоніст або зворотний агоніст поліпептиду bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту та одну або декілька посттрансляційних модифікацій, сполучних агентів, полімерів або біологічно активних молекул.

[66] Цей винахід пропонує також ізольовані нуклеїнові кислоти, які містять полінуклеотид, який гібридується за суворих умов із послідовностями SEQ ID NO: 3, 4, або нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди послідовностей SEQ ID NO: 1, 2. Цей винахід пропонує також ізольовані нуклеїнові кислоти, які містять полінуклеотид, який гібридується за суворих умов з послідовностями SEQ ID NO: 3, 4, або полінуклеотиди, які гібридизуються за суворих умов з полінуклеотидами, які кодують поліпептиди, представлені послідовностями SEQ ID NO: 1, 2, де згаданий полінуклеотид містить щонайменше один селекторний кодон. Цей винахід пропонує також ізольовані нуклеїнові кислоти, які містять полінуклеотид, який кодує поліпептиди, представлені послідовностями SEQ ID NO: 1, 2. Цей винахід пропонує також ізольовані нуклеїнові кислоти, які містять полінуклеотид, який кодує поліпептиди, представлені послідовностями SEQ ID NO: 1, 2 з однією або декількома штучно закодованими амінокислотами. Фахівцю у цій галузі легко зрозуміло, що ряд різних полінуклеотидів може закодувати будь-який поліпептид за цим винаходом.

[67] В деяких варіантах здійснення цього винаходу селекторний кодон вибраний з групи, яку складають амбер-кодон, охра-кодон, опал-кодон, унікальний кодон, рідкісний кодон, п'ятиосновний кодон та чотириосновний кодон.

[68] Цей винахід також пропонує способи одержання поліпептиду bG-CSF, сполученого з водорозчинним полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу спосіб включає введення в контакт ізольованого поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, з водорозчинним полімером, який містить складову, яка контактує із штучно закодованою амінокислотою. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота, яка включена до складу поліпептиду bG-CSF, може реагувати з водорозчинним полімером, який, за інших обставин, не реагує з жодною з 20 звичайних амінокислот. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота, яка включена до складу поліпептиду bG-CSF, може реагувати зі сполучним агентом, полімером або біологічно активною молекулою, які, за інших обставин, не реагують із жодною з 20 звичайних амінокислот.



[69] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, сполучений з водорозчинним полімером, одержують шляхом введення в реакцію поліпептиду bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, з молекулою полі(етилєнєлїколю), яка містить амінооксигрупу, гїдразинову групу, гїдразидну групу або семїкарбазидну групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу амінооксигрупа, гїдразинова група, гїдразидна група або семїкарбазидна група сполучена з молекулою полі(етилєнєлїколю) через амїдний зв'язок. В деяких варіантах здійснення цього винаходу амінооксигрупа, гїдразинова група, гїдразидна група або семїкарбазидна група сполучена з молекулою полі(етилєнєлїколю) через карбаматний зв'язок.

[70] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, сполучений з водорозчинним полімером, одержують шляхом введення в реакцію молекули полі(етилєнєлїколю), яка містить карбонільну групу, з поліпептидом, який містить штучно закодовану амінокислоту, яка містить амінооксигрупу, гїдразинову групу, гїдразидну групу або семїкарбазидну групу.

[71] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, сполучений з водорозчинним полімером, одержують шляхом введення в реакцію поліпептиду bG-CSF, який містить алкїнвмісну амінокислоту, з молекулою полі(етилєнєлїколю), яка містить азидну складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу азидна група або алкїнова група сполучена з молекулою полі(етилєнєлїколю) через амїдний зв'язок.

[72] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, сполучений з водорозчинним полімером, одержують шляхом введення в реакцію поліпептиду bG-CSF, який містить азидвмісну амінокислоту, з молекулою полі(етилєнєлїколю), яка містить алкїнову складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу азидна група або алкїнова група сполучена з молекулою полі(етилєнєлїколю) через амїдний зв'язок.

[73] В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекула полі(етилєнєлїколю) має молекулярну масу у межах від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекула полі(етилєнєлїколю) має молекулярну масу у межах від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа.

[74] В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекула полі(етилєнєлїколю) є розгалуженим полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу кожне розгалуження розгалуженого полімеру полі(етилєнєлїколю) має молекулярну масу у межах від приблизно 1 кДа до приблизно 100 кДа або від приблизно 1 кДа до приблизно 50 кДа.

[75] В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер, сполучений з поліпептидом bG-CSF, містить поліалкїленєлїколеву складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу залишок штучно закодованої амінокислоти, введений до складу поліпептиду bG-CSF, містить карбонільну групу, амінооксигрупу, гїдразидну групу, гїдразинову групу, семїкарбазидну групу, азидну групу або алкїнову групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу залишок штучно закодованої амінокислоти, введений до складу поліпептиду bG-CSF, містить карбонільну складову, а водорозчинний полімер містить амінооксигрупу, гїдразидну групу, гїдразинову групу або семїкарбазидну складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу залишок штучно закодованої амінокислоти, введений до складу поліпептиду bG-CSF, містить алкїнову складову, а водорозчинний полімер містить азидну складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу залишок штучно закодованої амінокислоти, введений до складу поліпептиду bG-CSF, містить азидну складову, а водорозчинний полімер містить алкїнову складову.

[76] Цей винахід також пропонує композиції, що містять фармацевтично прийнятний носій і поліпептид bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота сполучена з водорозчинним полімером.

[77] Цей винахід пропонує також клітини, які містять полінуклеотид, який кодує поліпептид bG-CSF, що містить селекторний кодон. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадані клітини містять ортогональну РНК-синтетазу та/або ортогональну тРНК для введення штучно закодованої амінокислоти до поліпептиду bG-CSF.

[78] Цей винахід також пропонує способи одержання поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадані способи включають культивування клітин, які містять полінуклеотид або полінуклеотиди, які кодують поліпептид bG-CSF, ортогональну РНК-синтетазу та/або ортогональну тРНК, за умов, які дозволяють експресію поліпептиду bG-CSF; і очищення поліпептиду bG-CSF з клітин та/або культурального середовища.

[79] Цей винахід також пропонує способи підвищення періоду напіввиведення терапевтично ефективної кількості поліпептидів bG-CSF, періоду напіввиведення bG-CSF з плазми або часу знаходження поліпептидів bG-CSF у кровообізі. Цей винахід також пропонує способи модулювання імуногенності поліпептидів bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадані способи включають заміну будь-якої однієї або декількох амінокислот природних поліпептидів bG-CSF на штучно закодовану амінокислоту та/або сполучення поліпептиду bG-CSF зі сполучним агентом, полімером, водорозчинним полімером або біологічно активною молекулою.

[80] Цей винахід також пропонує способи лікування пацієнта, який потребує такого лікування, ефективною кількістю молекули bG-CSF за цим винаходом. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадані способи включають введення в організм пацієнта терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить поліпептид bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, та фармацевтично прийнятний носій. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота сполучена з водорозчинним полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF є глікозилованим. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF не є глікозилованим.

[81] Цей винахід також пропонує поліпептиди bG-CSF, які містять послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 1, 2 або будь-якою іншою послідовністю поліпептиду bG-CSF, за виключенням того, що щонайменше одна амінокислота замінена штучно закодованою амінокислотою. Цей винахід також пропонує поліпептиди bG-CSF, які містять послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 1, 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота сполучена з водорозчинним полімером. В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить карбонільну групу, амінооксигрупу, гідразидну групу, гідразинову групу, семікарбазидну групу, азидну групу або алкінову групу.

[82] Цей винахід також пропонує фармацевтичні композиції, які містять фармацевтично прийнятний носій та поліпептид bG-CSF, який містить послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 1, 2 або будь-якою іншою послідовністю поліпептиду bG-CSF, де щонайменше одна амінокислота замінена штучно закодованою амінокислотою. Цей винахід також пропонує фармацевтичні композиції, які містять фармацевтично прийнятний носій та поліпептид bG-CSF, який містить послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 1, 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота містить сахаридну складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер сполучений з поліпептидом через сахаридну складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу сполучний агент, полімер або біологічно активна молекула сполучені з поліпептидом bG-CSF через сахаридну складову.

[83] Цей винахід також пропонує поліпептид bG-CSF, який містить водорозчинний полімер, сполучений ковалентним зв'язком із поліпептидом bG-CSF на одній амінокислоті. В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згаданою амінокислотою, ковалентно сполученою з водорозчинним полімером, є штучно закодована амінокислота, присутня у поліпептиді.

[84] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить HES, сполучений ковалентним зв'язком із поліпептидом bG-CSF, є сполученим на одній амінокислоті. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна амінокислота, ковалентно сполучена з HES, є штучно закодованою амінокислотою, присутньою у поліпептиді. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить численні штучно закодовані амінокислоти, які можуть бути сполучені з численними молекулами HES та/або молекулами полі(етиленгліколю).

[85] Цей винахід пропонує поліпептид bG-CSF, який містить щонайменше один(-у) сполучний агент, полімер або біологічно активну молекулу, де згаданий(-а) сполучний агент, полімер або біологічно активна молекула є приєднаним(-ою) до поліпептиду за через функціональну групу штучно закодованої амінокислоти, введеної до складу згаданого поліпептиду за допомогою рибосом. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згаданий поліпептид є моноpegільованим. Цей винахід також пропонує поліпептид bG-CSF, який містить сполучний агент, полімер або біологічно активну молекулу, приєднаний(-у) до однієї або декількох штучно закодованих амінокислот, де згадана штучно закодована амінокислота введена до складу згаданого поліпептиду на заздалегідь вибраних ділянках за допомогою рибосом.

[86] До обсягу цього винаходу входить лідерна або сигнальна послідовність bG-CSF, приєднана до кодувальної ділянки bG-CSF, а також гетерологічна сигнальна послідовність, приєднана до кодувальної ділянки bG-CSF. Вибраною гетерологічною лідерною або сигнальною послідовністю повинна бути така лідерна або сигнальна послідовність, яка розпізнається та процесується, наприклад, секреторною системою клітини-хазяїна для секретування і, можливо, розщеплення сигнальною пептидазою, клітиною-хазяїном. Спосіб лікування стану або розладу із застосуванням bG-CSF за цим винаходом включає лікування із застосуванням bG-CSF з або без сигнального або лідерного пептиду.

[87] Цей винахід пропонує спосіб лікування та запобігання інфекцій у тварин. Цей винахід також пропонує спосіб лікування та запобігання маститу та транспортної лихоманки у великої рогатої худоби. Цей винахід також пропонує спосіб лікування інфекцій у тварин без розвитку стійкості у бактеріальних штамів. Окрім того, цей винахід пропонує також очищений та ізольований поліпептид, який має частину або усю первинну структурну конформацію та одну або декілька біологічних властивостей природного бичачого bG-CSF, та послідовності ДНК, які кодують такий бичачий bG-CSF.

[88] В іншому варіанті здійснення цього винаходу інфікованій тварині з bG-CSF вводять один або декілька додаткових колонієстимулювальних факторів, у тому числі, але без обмеження, GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор), M-CSF (макрофагальний колонієстимулювальний фактор) та мульти-CSF (IL-3). Згадані колонієстимулювальні фактори (CSF) вводять разом або роздільно. За іншим варіантом здійснення цього винаходу інфекції тварин лікують шляхом введення G-CSF з одним або декількома такими агентами: інтерферонами, у тому числі, але без обмеження, інтерфероном типу альфа, інтерлейкіном-2 (IL2) та фактором некрозу пухлин (TNF), або традиційними антибіотиками, у тому числі, але без обмеження, пеніцилінами, цефалоспоринами та аміноглікозидами.

[89] В іншому варіанті здійснення цього винаходу лікування bG-CSF застосовують із профілактичною метою. bG-CSF можна застосовувати як профілактичний лікарський засіб для посилення захисту тварин-хазяїв із підвищеним ризиком ураження бактеріальною, дріжджовою або грибовою інфекцією. Наприклад, bG-CSF можна застосовувати як профілактичний лікарський засіб для нормальних тварин із підвищеним ризиком ураження інфекцією, у тому числі, але без обмеження, пневмонією. Термін "нормальна", який вживають у цьому описі, означає тварину, яка має нормальну імунну функцію та нормальну кількість лейкоцитів і нормальну лейкоцитарну формулу. Велику рогату худобу піддають профілактичному лікуванню перед транспортуванням або у інших випадках, які можуть ослабити худобу, з метою посилення та праймування їх здатності до супротиву інфекціям. Введення bG-CSF можна здійснювати під час обробки великої рогатої худоби, тобто під час проведення вакцинації, таврування тощо. Обробку bG-CSF можна здійснювати також у процесі лікування сухостійних корів та/або безпосередньо перед отеленням для зменшення ймовірності виникнення постнатальних ендометральних інфекцій та маститу на початкових стадіях лактації. Дивись Kehrli et al., Am. J. Vet. Res., 50, No.2, 207 (1989); Oliver et al., J. Dairy Sci. 71:2584-2606 (1988); та Kehrli et al., J. Dairy Sci. 74:4399-4412 (1991), де описане функціонування нейтрофілів великої рогатої худоби у передродовий період. Як правило, лікування антибіотиками безпосередньо перед отеленням не проводять, оскільки у молоці корови можуть з'явитись залишки антибіотиків, що зробить його непридатним для споживання.

[90] В іншому варіанті здійснення цього винаходу кон'югування поліпептиду bG-CSF, який містить одну або декілька штучних амінокислот, з іншою молекулою, у тому числі, але без обмеження, молекулою полі(етилєнглїколю), надає можливість одержання по суті очищеного bG-CSF завдяки унікальній хімічній реакції, яка застосовується для кон'югування із штучною амінокислотою. Кон'югування поліпептиду bG-CSF, який містить одну або декілька штучно закодованих амінокислот, з іншою молекулою, такою як молекула полі(етилєнглїколю), можна здійснювати з іншими методами очищення, які здійснюють перед або після етапу кон'югування з одержанням по суті чистого bG-CSF.

Короткий опис фігур

[91] Фіг. 1 – Показана плазмїда, яка застосовується для експресії bG-CSF.

[92] Фіг. 2 – Показані подробиці щодо лінії клітин-хазяїв, яка застосовувалась для експресії bG-CSF.

[93] Фіг. 3 – Показані результати SDS PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) аналізу експресії поліпептидів bG-CSF за цим винаходом.

[94] Фіг. 4 – Показані результати SDS PAGE аналізу пікових фракцій bG-CSF з CM FF колонки перед пегілуванням.

[95] Фіг. 5 – Показані результати SDS PAGE аналізу пікових фракцій пегільованого bG-CSF-T133pAF з SP HP колонки.

[96] Фіг. 6 – Показані результати SDS-PAGE аналізу b-GCSF перед та після пегілування.

5 [97] Фіг. 7a – Показано трипсиновий/Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детектування при 214 нм).

[98] Фіг. 7b – Показано трипсиновий/Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детектування при 214 нм).

[99] Фіг. 8a – Показано трипсиновий/Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детектування при 250 нм).

10 [100] Фіг. 8b – Показано трипсиновий/Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детектування при 250 нм).

[101] Фіг. 9a – Показано Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детектування при 214 нм).

[102] Фіг. 9b – Показано Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детектування при 214 нм).

[103] Фіг. 10a – Показано Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детектування при 250 нм).

15 [104] Фіг. 10b – Показано Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детектування при 250 нм).

[105] Фіг. 11 – Показані результати SEC-HPLC аналізу пегільованого поліпептиду bG-CSF.

[106] Фіг. 12 – Показані результати SEC-HPLC аналізу поліпептиду bG-CSF.

[107] Фіг. 13 – Показані невиправлені значення  $EC_{50}$  аналізу проліферації M-NFS60 з 20K пегільованим бичачим G-CSF T133pAF та bG-CSF дикого типу.

20 [108] Фіг. 14 – Показана кратність різниць  $EC_{50}$  20K пегільованого бичачого G-CSF T133pAF у аналізі проліферації M-NFS60 у зіставленні з bG-CSF дикого типу.

[109] Фіг. 15 – Показані результати експерименту з аналізом нейтрофілів великої рогатої худоби, забарвлених антитілом CD11b.

25 [110] Фіг. 16 – Показані результати введення пегільованого bG-CSF на ANC (абсолютний вміст нейтрофілів).

[111] Фіг. 17 – Лінійний графік, який показує абсолютний вміст нейтрофілів (середнє  $\pm$  середня квадратична помилка) у телят, яким вводили буфер для лікарської форми або пегільований bG-CSF, після однієї підшкірної ін'єкції у дозі 40 мкг/кг.

30 [112] Фіг. 18 – Лінійний графік, який показує середньодобовий надій молока від корів з прикладу з введенням 40 мкг/кг.

[113] Фіг. 19 – Стовпчаста діаграма, яка показує різниці у кількості соматичних клітин у дні 3, 5, 7 та 10 після отелення між чотирма групами корів, у тому числі контрольною групою, групою, якій щоденно вводили непегільований bG-CSF, групою, якій вводили пегільований bG-CSF у дозі 40 мкг/кг, та групою, якій вводили пегільований bG-CSF у дозі 20 мкг/кг.

35 Визначення

[114] Слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретною методологією, методами, лініями клітин, генно-інженерними конструкціями та реактивами, опис яких наведений у цій заявці, оскільки вони можуть змінюватись. Слід розуміти, що термінологія, яка вживається у цьому описі, призначена лише для опису конкретних прикладів здійснення і не призначена для обмеження обсягу цього винаходу, який обмежується лише формулою винаходу, яка додається.

40 [115] Слід зазначити, що у разі вживання у цьому описі і формулі винаходу, яка додається, форми однини охоплюють і форми множини, якщо контекст явно не вказує на інше. Так, наприклад, посилання на "bGCSF", "бичачий G-CSF", "bG-CSF", "поліпептид бичачого G-CSF" або "поліпептид bG-CSF" та різні форми з дефісом та без дефісу є посиланням на один білок або декілька таких білків і охоплює їх еквіваленти, відомі фахівцям у цій галузі тощо.

45 [116] Якщо не зазначено інше, усі технічні та наукові терміни, які вживаються у цьому описі, мають загальноприйняте значення, зрозуміле для фахівця у галузі, до якої належить цей винахід. Наведений опис способів, пристроїв та матеріалів, яким віддається перевага, хоча при практичному здійсненні або випробуванні цього винаходу можуть бути застосовані будь-які способи, пристрої та матеріали, аналогічні або еквівалентні тим, які описані.

50 [117] Усі публікації і патенти, на які у цьому описі є посилання, включені до нього шляхом посилань з метою опису та розкриття, наприклад, генно-інженерних конструкцій та методів, описаних у публікаціях, які можуть застосовуватись у зв'язку з винаходом, опис якого наводиться. Обговорення публікацій, згаданих у цьому описі, стосується виключно наведеної в них інформації, опублікованої перед датою подання цієї заявки. Ніщо у цій заявці не повинно розглядатись як припущення того, що винахідники не мають права датувати такий опис більш ранньою датою на підставі попереднього винаходу або з будь-якої іншої причини.

55 [118] Словосполучення "по суті очищений" означає поліпептид bG-CSF, який може бути значною мірою або по суті вільним від компонентів, які, за нормальних обставин, супроводжують або взаємодіють з білком у його природному середовищі, тобто у нативній

клітині або клітині-хазяїні у разі рекомбінантно продукованих поліпептидів bG-CSF. Поліпептид bG-CSF, який може бути по суті вільним від клітинного матеріалу, включає препарати білка, які мають менше ніж приблизно 30 %, менше ніж приблизно 25 %, менше ніж приблизно 20 %, менше ніж приблизно 15 %, менше ніж приблизно 10 %, менше ніж приблизно 5 %, менше ніж приблизно 4 %, менше ніж приблизно 3 %, менше ніж приблизно 2 % або менше ніж приблизно 1 % (за сухою масою) забруднювального білка. Якщо поліпептид bG-CSF або його варіант продукується клітинами-хазяями рекомбінантним шляхом, білок може бути присутнім на рівні приблизно 30 %, приблизно 25 %, приблизно 20 %, приблизно 15 %, приблизно 10 %, приблизно 5 %, приблизно 4 %, приблизно 3 %, приблизно 2 % або приблизно 1 % чи менше від сухої маси клітин. Якщо поліпептид bG-CSF або його варіант продукується клітинами-хазяями рекомбінантним шляхом, білок може бути присутнім у культуральному середовищі на рівні приблизно 5 г/л, приблизно 4 г/л, приблизно 3 г/л, приблизно 2 г/л, приблизно 1 г/л, приблизно 750 мг/л, приблизно 500 мг/л, приблизно 250 мг/л, приблизно 100 мг/л, приблизно 50 мг/л, приблизно 10 мг/л або приблизно 1 мг/л чи менше від сухої маси клітин. Таким чином, "по суті очищений" поліпептид bG-CSF, одержаний за способами за цим винаходом, може мати рівень чистоти щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 35 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 45 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 55 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 65 %, щонайменше приблизно 70 %, конкретно, рівень чистоти щонайменше приблизно 75 %, 80 %, 85 %, і ще конкретніше, рівень чистоти щонайменше приблизно 90 %, рівень чистоти щонайменше приблизно 95 %, рівень чистоти щонайменше приблизно 99 % або більше, при визначенні відповідними способами, наприклад, аналізом SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC та капілярним електрофорезом.

[119] Словосполучення "рекомбінантна клітина-хазяїн" або "клітина-хазяїн" означає клітину, яка містить екзогенний полінуклеотид, незалежно від способу, який застосовували для введення, наприклад, пряме захоплення, трансдукція, f-кон'югація або інші способи, відомі у цій галузі для одержання рекомбінантних клітин-хазяїв. Екзогенний полінуклеотид можна зберігати як неінтегрований вектор, наприклад, плазмиду, або у іншому варіанті здійснення цього винаходу його можна інтегрувати до генотипу клітини-хазяїна.

[120] Термін "живильне середовище" або "живильні середовища", який вживають у цьому описі, охоплює будь-яке культуральне середовище, розчин, тверду, напівтверду або жорстку основу, яка може підтримувати або містити будь-яку клітину-хазяїна, у тому числі бактеріальні клітини-хазяї, дріжджові клітини-хазяї, клітини-хазяї комах, клітини-хазяї рослин, еукаріотні клітини-хазяї, клітини-хазяї ссавців, клітини CHO, прокаріотні клітини-хазяї, клітини-хазяї E. coli або клітини-хазяї Pseudomonas та вміст клітин. Таким чином, згаданий термін може охоплювати живильне середовище, у якому була вирощена клітина-хазяїн, наприклад, середовище, у яке був секретований поліпептид bG-CSF, у тому числі середовище перед або після етапу проліферації. Згаданий термін може також охоплювати буфери або реактиви, які містять лізати клітин-хазяїв, наприклад, у разі, коли поліпептид bG-CSF продукується усередині клітин, і клітини-хазяї піддають лізису або руйнуванню для вивільнення поліпептиду bG-CSF.

[121] Термін "відновник", який вживають у цьому описі стосовно рефолдингу білків, визначається як будь-яка сполука або матеріал, який підтримує сульфгідрильні групи у відновленому стані та відновлює внутрішньомолекулярні та міжмолекулярні дисульфідні зв'язки. До числа прийнятих відновників належать, але без обмеження ними, дитіотреїтол (DTT), 2-меркаптоетанол, дитіоеритритол, цистеїн, цистеамін (2-аміноетантіол) та відновний глутатіон. Фахівцям у цій галузі легко зрозуміло, що найрізноманітніші відновники є прийнятними для застосування у способах та композиціях за цим винаходом.

[122] Термін "окисник", який вживають у цьому описі стосовно рефолдингу білків, означає будь-яку сполуку або матеріал, що є здатним(-ою) до видалення електрону зі сполуки, яку піддають окисненню. До числа прийнятих окисників належать, але без обмеження ними, окиснений глутатіон, цистин, цистамін, окиснений дитіотреїтол, окиснений еритреїтол та кисень. Фахівцям у цій галузі легко зрозуміло, що найрізноманітніші окисники є прийнятними для застосування у способах та композиціях за цим винаходом.

[123] Термін "денатуруюча речовина" або "денатурант", який вживають у цьому описі, означає будь-яку сполуку або матеріал, що спричинює оборотне розгортання білкової молекули. Сила денатуруючої речовини або денатуранту визначається як властивостями, так і концентрацією конкретної денатуруючої речовини або денатуранту. Прийнятними денатуруючими речовинами або денатурантами можуть бути хаотропи, детергенти, органічні розчинники, водозмішувальні розчинники, фосфоліпіди або комбінація двох або декількох таких речовин. До прийнятих хаотропів належать (але без обмеження ними) сечовина, гуанідин та тіоціанат натрію. До прийнятих детергентів можуть належати (але без обмеження ними) сильні

детергенти, такі як додецилсульфат натрію або прості ефіри поліоксіетилену (наприклад, такі детергенти як твін або тритон), саркозил, м'які неіоногенні детергенти (наприклад, дигітонін), м'які катіоногенні детергенти, такі як N-2,3-(діолеїлокси)пропіл-N, N,N-триметиламоній, м'які іоногенні детергенти (наприклад, холат натрію або дезоксихолат натрію) або цвіттеріонні детергенти, у тому числі, але без обмеження, сульфобетаїни (цвіттергент), 3-(3-холамідопропіл)диметиламонію-1-пропансульфат (CHAPS) та 3-(3-холамідопропіл)диметиламонію-2-гідрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO). Органічні водозмішувальні розчинники, такі як ацетонітрил, нижчі алканолі (зокрема, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алканолі, такі як етанол або ізопропанол) або нижчі алкандіолі (зокрема, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-алкандіолі, такі як етиленгліколь), можуть застосовуватись як денатуранти. Фосфоліпідами, прийнятними для цього винаходу, можуть бути природні фосфоліпіди, такі як фосфатидилетаноламін, фосфатидилхолін, фосфатидилсерин та фосфатидилінозитол, або синтетичні похідні чи варіанти фосфоліпідів, такі як дигексаноїлфосфатидилхолін або дигептаноїлфосфатидилхолін.

[124] Термін "рефолдинг", який вживають у цьому описі, описує будь-який процес, реакцію або метод, що трансформує поліпептиди, які містять дисульфідні зв'язки, з невідповідно укладеного або розгорнутого стану у нативну або відповідно укладену конформацію відносно дисульфідних зв'язків.

[125] Термін "сумісне вкладання", який вживають у цьому описі, стосується конкретно процесів, реакцій або методів рефолдингу, у яких застосовують щонайменше два поліпептиди, які взаємодіють між собою, результатом яких є трансформування неукладених або невідповідно укладених поліпептидів у нативні, відповідно укладені поліпептиди.

[126] Термін "гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор" або "G-CSF", який вживають у цьому описі, означає ті поліпептиди та білки, які мають щонайменше одну біологічну активність G-CSF (наприклад, як описано у патентах США № 6,716,606; № 6,689,351; № 6,565,841; № 6,162,426; № 5,811,301; № 5,776,895; № 5,718,893; № 5,580,755; № 5,536,495; № 5,202,117; № 5,043,156; № 4,999,291; № 4,810,643 та № 4,968,618, для hG-CSF, які включено до цього опису шляхом посилання), а також аналоги G-CSF, ізоформи G-CSF, міметики G-CSF, фрагменти G-CSF, гібридні білки G-CSF, гібридні олігомерні та мультимерні білки, гомологи, глікозиловані варіанти та мутеїни, незалежно від їх біологічної активності і, окрім того, незалежно від способу їх синтезування або одержання, у тому числі, але без обмеження, рекомбінантними (продукованими з кДНК, геномної ДНК, синтетичної ДНК або нуклеїнової кислоти іншої форми), синтетичними, трансгенними методами та методами активації генів. До конкретних прикладів G-CSF належать (але без обмеження ними) пегфілграстим (pegfilgrastim (NEULASTA®)), філграстим (filgrastim (NEUPOGEN®)), аналог G-CSF, мутанти G-CSF, змінений глікозилований G-CSF та PEG-кон'юговані аналоги G-CSF. Конкретні приклади ліній клітин, модифікованих для експресії ендогенного людського G-CSF, описані у Devlin et al., J. Leukoc. Biol. 41:306 (1987); патентах США № 6,716,606; № 6,379,661; № 6,004,548; № 5,830,705; № 5,582,823; № 4,810,643; та № 6,242,218, які включені до цього опису шляхом посилання.

[127] Термін "бичачий гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор", "бичачий G-CSF" або "bG-CSF", який вживають у цьому описі, означає ті поліпептиди та білки, які мають щонайменше одну біологічну активність bG-CSF, а також аналоги bG-CSF, ізоформи bG-CSF, міметики bG-CSF, фрагменти bG-CSF, гібридні білки bG-CSF, гібридні олігомерні та мультимерні білки, гомологи, глікозиловані варіанти та мутеїни, незалежно від їх біологічної активності і, окрім того, незалежно від способу їх синтезування або одержання, у тому числі, але без обмеження, рекомбінантними (продукованими з кДНК, геномної ДНК, синтетичної ДНК або нуклеїнової кислоти іншої форми), синтетичними, трансгенними методами та методами активації генів. До конкретних прикладів G-CSF належать (але без обмеження ними) мутанти bG-CSF, змінений глікозилований G-CSF та PEG-кон'юговані аналоги G-CSF.

[128] Термін "бичачий G-CSF (bG-CSF)" або "пептид bG-CSF" означає бичачий гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор або G-CSF, описаний вище, а також поліпептид, який зберігає щонайменше одну біологічну активність природного bG-CSF. До поліпептидів bG-CSF належать фармацевтично прийнятні солі та проліки, а також проліки, які являють собою солі, поліморфи, гідрати, сольвати, біологічно активні фрагменти, біологічно активні варіанти та стереоізомери природного бичачого bG-CSF, а також агоністичні, міметичні та антагоністичні варіанти природного бичачого bG-CSF та його гібридні поліпептиди. До прикладів поліпептидів та міметиків bG-CSF належать описані у WO 89/10932, патентах США № 5,849,883 та № 6,497,869, які у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання. Гібриди, які містять додаткові амінокислоти на амінокінці, карбоксильному кінці або на обох кінцях, охоплюються терміном "поліпептид bG-CSF". До прикладів гібридів належать (але без обмеження ними), наприклад, метіоніл bG-CSF, у якого метіонін є сполученим з N-кінцем bG-

CSF (такий як поліпептид, представлений послідовністю SEQ ID NO: 2), який є результатом рекомбінантної експресії зрілої форми bG-CSF, гібриди, призначені для очищення (у тому числі, але без обмеження, полігістидин або афінні антигенні детермінанти), гібриди з пептидами, які зв'язують сироватковий альбумін, та гібриди із сироватковими білками, такими як сироватковий альбумін. Відомими є нуклеїнові кислоти природного bG-CSF та амінокислотні послідовності неперцесованих та зрілих форм, а також варіанти, такі як одноамінокислотні варіанти та сплайсовані варіанти. Амінокислотна послідовність зрілого bG-CSF, а також амінокислотна послідовність метіоніл-bG-CSF представлені у цьому описі послідовністю SEQ ID NO: 1 та послідовністю SEQ ID NO: 2, відповідно. Відомі також нуклеїновокислотні молекули, які кодуєть мутанти bG-CSF та мутантні поліпептиди bG-CSF.

[129] Бичачий гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор, або bG-CSF, має цілий ряд біологічних активностей, у тому числі, але без обмеження, зв'язування свого рецептора, спричинення димеризації свого рецептора, стимуляції продукування нейтрофілів та стимуляції проліферації та диференціації клітин. Приклади деяких біологічних активностей гранулоцитарного колонієстимулювального фактора та hG-CSF описані вище та у патентах США № 6,676,947; № 6,579,525; № 6,531,121; № 6,521,245; № 6,489,293; № 6,368,854; № 6,316,254; № 6,268,336; № 6,239,109; № 6,165,283; № 5,986,047; № 5,830,851; № 5,043,156; та № 5,773,569, які включені до цього опису шляхом посилання.

[130] Терміни "поліпептид бичачого G-CSF", "поліпептид bG-CSF", "бичачий G-CSF" або "bG-CSF" та їх дефісні і бездефісні форми, які вживають у цьому описі, включають ті поліпептиди та білки, які мають щонайменше одну біологічну активність CSF, аналогів bG-CSF, мутантів G-CSF, зміненого глікозилизованого bG-CSF, PEG-кон'югованого bG-CSF, ізоформ bG-CSF, міметиків bG-CSF, фрагментів bG-CSF, гібридних білків bG-CSF, гібридних білків, олігомерів та мультимерів, гомологів, глікозилованих варіантів, варіантів, сплайсованих варіантів та мутантів, незалежно від їх біологічної активності, і, окрім того, незалежно від способу їх синтезування або одержання, у тому числі, але без обмеження, рекомбінантними методами (продукованими з кДНК, геномної ДНК, синтетичної ДНК або нуклеїнової кислоти іншої форми), *in vitro*, *in vivo*, методом мікроін'єкції молекул нуклеїнової кислоти, синтетичними, трансгенними методами та методом активації генів. Термін "поліпептид бичачого G-CSF", "поліпептид bG-CSF", "бичачий G-CSF" або "bG-CSF" охоплює поліпептиди bG-CSF, які містять одну або декілька амінокислотних замінь, додань або делецій. Аналоги бичачого G-CSF дивись у патенті США № 5,849,883, включеному до цього опису шляхом посилання.

[131] Були описані заміни цілого ряду амінокислотних положень bG-CSF. Заміни включають (але без обмеження ними) такі заміни, які модулюють фармацевтичну стабільність, підвищують агоністичну активність, підвищують стійкість до протеаз, перетворюють поліпептид на антагоніста тощо та охоплюються терміном "поліпептид G-CSF", "поліпептид бичачого bG-CSF", "бичачий G-CSF" або "bG-CSF".

[132] У іншому варіанті здійснення цього винаходу запропоновані рекомбінантні нуклеїнові кислоти, які кодуєть варіантні білки, вектори експресії, які містять варіантні нуклеїнові кислоти, клітини-хазяї, які містять варіантні нуклеїнові кислоти та/або вектори експресії, і способи продукування варіантних білків. У іншому варіанті здійснення цього винаходу запропоноване лікування інфекції шляхом введення тварині варіантного білка, як правило, з фармацевтичним носієм, у терапевтично ефективній кількості.

[133] Мутанти bG-CSF, які обговорюються у патенті США № 5,849,883, у повному обсязі включеному до цього опису шляхом посилання, містять поліпептиди, сконструйовані з кодоном, оптимізованим для *E. coli*, та гібридні білки, створені з послідовностями бичачого та людського G-CSF. Патент США № 5,416,195, у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, описує мутанти hG-CSF, у яких було здійснено щонайменше одну з наведених нижче амінокислотних замінь (номенклатура амінокислот відповідає зрілому білку; таким чином, у разі присутності N-кінцевого метіоніну, його положення позначається як -1 або 0): Cys17 нативної послідовності був замінений залишком Ser17, Asp27 нативної послідовності був замінений залишком Ser27, Leu15 нативної послідовності був замінений залишком Glu15, Lys23 нативної послідовності був замінений залишком Arg23, Gly28 нативної послідовності був замінений залишком Ala28, Lys40 нативної послідовності був замінений залишком Arg40, Pro44 нативної послідовності був замінений залишком Ala44, Leu49 нативної послідовності був замінений залишком Lys49, Gly55 нативної послідовності був замінений залишком Ala55, Cys60 нативної послідовності був замінений залишком Ser60, Pro111 нативної послідовності був замінений залишком Glu111, Thr115 нативної послідовності був замінений залишком Ser115 і Tyr165 нативної послідовності був замінений залишком Arg165. Багато із цих залишків є присутніми у послідовності bG-CSF, і одну або декілька із цих замінь можна знайти у поліпептиду

bG-CSF за цим винаходом. Carter et al. Biologicals (2004) 32:37 описали мутований hG-CSF, якому бракує сайтів глікозилювання. Подібні мутації можуть бути знайдені у поліпептидів bG-CSF за цим винаходом.

[134] В деяких варіантах здійснення поліпептиди bG-CSF за цим винаходом є по суті ідентичними послідовностям SEQ ID NO: 1, 2 або будь-якій іншій послідовності поліпептиду bG-CSF. Нуклеїновокислотні молекули, які кодують поліпептиди bG-CSF, у тому числі мутанти, та способи експресії і очищення поліпептидів bG-CSF є добре відомими.

[135] Термін "поліпептид bG-CSF" включає також фармацевтично прийнятні солі та проліки, а також проліки, які являють собою солі, поліморфи, гідрати, сольвати, біологічно активні фрагменти, біологічно активні варіанти та стереоізомери природного bG-CSF, а також агоністичні, міметичні та антагоністичні варіанти природного бичачого bG-CSF та його гібридні поліпептиди. Гібриди, які містять додаткові амінокислоти на амінокінці, карбоксильному кінці або на обох кінцях, охоплюються терміном "поліпептид bG-CSF". До прикладів гібридів належать (але без обмеження ними), наприклад, метіоніл bG-CSF, у якого метіонін є сполученим з N-кінцем bG-CSF, що є результатом рекомбінантної експресії зрілої форми bG-CSF, якій бракує лідерного або сигнального пептиду чи його частини (метіонін є сполученим з N-кінцем bG-CSF, що є результатом рекомбінантної експресії), гібриди, призначені для очищення (у тому числі, але без обмеження, полігістидин або афінні антигенні детермінанти), гібриди з пептидами, які зв'язують сироватковий альбумін, та гібриди із сироватковими білками, такими як сироватковий альбумін. Патент США № 5,750,373, включений до цього опису шляхом посилання, описує спосіб відбору нових білків, таких як гормон росту, та варіантів фрагмента антитіла, які мають змінені властивості зв'язування відповідних рецепторних молекул. Згаданий спосіб включає лігування гена, що кодує білок, який становить інтерес, з карбоксикінцевою ділянкою білкової оболонки гена III нитчастого фагу M13. Химерні молекули містять bG-CSF та одну або декілька інших молекул. Химерна молекула може містити специфічні ділянки або фрагменти одного або обох bG-CSF та інших(-ої) молекул(-и). Будь-який із таких фрагментів можна одержати з білків стандартними біохімічними методами або шляхом експресії полінуклеотиду, який кодує згаданий фрагмент. bG-CSF або його фрагмент можна одержати як гібридний білок, який містить людський сироватковий альбумін (HSA), Fc або його частину. Такі гібридні генно-інженерні конструкції є придатними для посилення експресії bG-CSF або його фрагмента в еукаріотній клітині-хазяїні. До прикладів фрагментів HSA належить N-кінцевий поліпептид (амінокислоти 1-369, 1-419 та проміжні довжини, починаючи з амінокислоти 1), описаний у патенті США № 5,766,883 та WO 97/24445, включених до цього опису шляхом посилання. Інші химерні поліпептиди можуть включати білок HSA з bG-CSF або його фрагменти, приєднані до кожного з C- та N-кінців HSA. Інші гібриди можна одержати шляхом злиття bG-CSF з а) Fc-фрагментом імуноглобуліну; б) аналогом Fc-фрагмента імуноглобуліну, та с) фрагментами Fc-фрагмента імуноглобуліну.

[136] У різних джерелах описана модифікація поліпептидів шляхом кон'югації з полімерами або глікозилювання. Термін "поліпептид bG-CSF" охоплює поліпептиди, кон'юговані з полімером, таким як полі(етиленгліколь), і які можуть складатись з однієї або декількох похідних цистеїну, лізину або інших залишків. На додаток до цього, поліпептид bG-CSF може містити сполучний агент або полімер, де амінокислота, з якою кон'югується сполучний агент або полімер, може бути штучною амінокислотою за цим винаходом, або вони можуть кон'югуватись із природною амінокислотою за допомогою методів, відомих у цій галузі, наприклад, шляхом сполучення з лізином або цистеїном.

[137] Було повідомлено про модифікацію поліпептидів полімерами. IFN $\beta$  згадується як один із прикладів поліпептиду, який належить до суперродини гормонів росту. У WO 00/23114 описані глікозилований та пегільований IFN $\beta$ . У WO 00/23472 описані гібридні білки IFN $\beta$ . У патенті США № 4,904,584 описані пегільовані поліпептиди з дефіцитом лізину, де щонайменше один залишок лізину був видалений або замінений залишком будь-якої іншої амінокислоти. У WO 99/67291 описаний процес кон'югування білка з полі(етиленгліколем), де щонайменше один залишок амінокислоти білка видаляється, і білок контактує з полі(етиленгліколем) за умов, достатніх для забезпечення кон'югування з білком. У WO 99/03887 описані пегільовані варіанти поліпептидів, які належать до суперродини гормонів росту, де залишок цистеїну був замінений залишком замінної амінокислоти, розміщеним на визначеній ділянці поліпептиду. У WO 00/26354 розкритий спосіб одержання глікозилизованого варіанта поліпептиду із зниженою алергенністю, який містить щонайменше один додатковий сайт глікозилювання у порівнянні з відповідним вихідним поліпептидом. У патенті США № 5,218,092, включеному до цього опису шляхом посилання, описана модифікація гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (G-CSF)



та інших поліпептидів шляхом введення щонайменше одного додаткового вуглеводного ланцюга у порівнянні з нативним поліпептидом.

[138] Термін "поліпептид bG-CSF" також охоплює глікозилований bG-CSF, такий як (але без обмеження), поліпептиди, глікозиловані в будь-якому амінокислотному положенні, N-зв'язані або O-зв'язані глікозиловані форми поліпептиду. Варіанти, які містять одонуклеотидні заміни, також вважаються біологічно активними варіантами поліпептиду bG-CSF. Варіанти, які містять одонуклеотидні заміни, також вважаються біологічно активними варіантами bG-CSF. Крім того, термін охоплює також сплайсовані варіанти. Термін "поліпептид bG-CSF" охоплює також гетеродимери, гомодимери, гетеромультимери або гомомультимери будь-якого одного або декількох bG-CSF чи будь-якого іншого поліпептиду, білка, вуглеводу, полімеру, невеликої молекули, сполучного агента, ліганду або іншої активної молекули будь-якого типу, приєднаних хімічними засобами або експресованими як гібридний білок (дивись патенти США № 6,261,550; № 6,166,183; № 6,204,247; № 6,261,550; № 6,017,876, включені до цього опису шляхом посилання), а також аналоги поліпептидів, які містять, наприклад, специфічні делеції чи інші модифікації, але зберігають біологічну активність (патенти США № 6,261,550; № 6,004,548; № 6,632,426, включені до цього опису шляхом посилання).

[139] Усі посилання на амінокислотні положення bG-CSF, опис яких наведено, робляться на основі положень послідовності SEQ ID NO: 1, якщо не вказується інше (тобто коли вказується, що порівняння робиться на основі послідовності SEQ ID NO: 2 або іншої послідовності bG-CSF). Наприклад, амінокислотою у положенні 1 послідовності SEQ ID NO: 1 є треонін, і відповідний треонін знаходиться у послідовності SEQ ID NO: 2 у положенні 2. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що амінокислотні положення, які відповідають положенням послідовності SEQ ID NO: 1, можуть бути легко ідентифіковані у будь-якій іншій молекулі bG-CSF, такий як послідовність SEQ ID NO: 2. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що амінокислотні положення, які відповідають положенням послідовностей SEQ ID NO: 1, 2 або будь-якої іншої послідовності bG-CSF, можуть бути легко ідентифіковані у будь-якій іншій молекулі bG-CSF, такий як гібриди, варіанти, фрагменти bG-CSF тощо. Наприклад, для вирівнювання та ідентифікування конкретного положення у білка, який відповідає положенню послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF можуть застосовуватись програми вирівнювання послідовностей, такі як BLAST. Заміни, делеції або додання амінокислот, опис яких наведено відносно послідовностей SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF, призначені також для посилання на заміни, делеції або додання у відповідних положеннях гібридів, варіантів, фрагментів bG-CSF тощо, опис яких наведений або які є відомими у цій галузі і явно охоплюються цим винаходом.

[140] Термін "поліпептид bG-CSF" або "bG-CSF" охоплює поліпептиди bG-CSF, які містять одну або декілька амінокислотних заміни, додань або делецій. Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можуть містити модифікації однієї або декількох природних амінокислот у поєднанні з однією або декількома модифікаціями штучних амінокислот. Були описані приклади заміні різноманітних амінокислотних положень природних поліпептидів bG-CSF, у тому числі, але без обмеження, заміни, які модулюють фармацевтичну стабільність, які модулюють одну або декілька біологічних активностей поліпептиду bG-CSF, у тому числі, але без обмеження, підвищують агоністичну активність, підвищують розчинність поліпептиду, підвищують стійкість до протеаз, перетворюють поліпептид на антагоніста тощо і охоплюються терміном "поліпептид bG-CSF". В деяких варіантах здійснення цього винаходу антагоніст bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту, сполучену з водорозчинним полімером, який знаходиться на ділянці зв'язування рецепторів молекули bG-CSF.

[141] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF також містять додання, заміну або делецію, що модулює біологічну активність поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF також містять додання, заміну або делецію, що модулює регульовану поліпептидом bG-CSF проліферацію, функціонування та/або диференціацію нейтрофілів. Наприклад, додання, заміни або делеції можуть модулювати одну або декілька властивостей або активностей bG-CSF. Наприклад, додання, заміни або делеції можуть модулювати спорідненість до рецептора, модулювати період напіввиведення поліпептиду bG-CSF з плазми, модулювати період напіввиведення терапевтично ефективної кількості поліпептиду bG-CSF, модулювати стабільність поліпептиду, модулювати розщеплення протеазами, модулювати дозу, модулювати вивільнення або біологічну доступність, полегшувати очищення або поліпшувати чи змінювати конкретний шлях введення. Подібним чином, поліпептиди bG-CSF можуть містити послідовності розщеплення протеазами, реакційноздатні групи, антигензв'язувальні центри (у тому числі, але без обмеження, FLAG або полі-His) або інші послідовності на основі спорідненості (у тому числі, але без обмеження,

FLAG, полі-His, GST тощо) чи сполучені молекули (у тому числі, але без обмеження, біотин), які поліпшують виявлення (у тому числі, але без обмеження, GST), очищення або інші відмітні ознаки поліпептиду.

[142] Термін "поліпептид bG-CSF" також охоплює гомодимери, гетеродимери, гомомультимери та гетеромультимери, що є сполученими, у тому числі, але без обмеження, з гомодимерами, гетеродимерами, гомомультимерами та гетеромультимерами, сполученими безпосередньо через бічні ланцюги штучно закодованих амінокислот із бічними ланцюгами тих самих або інших штучно закодованих амінокислот, з бічними ланцюгами природних амінокислот або опосередковано через сполучний агент. До прикладів сполучних агентів належать (але без обмеження ними) невеликі органічні сполуки, водорозчинні полімери різної довжини, такі як полі(етиленгліколь) або полідекстран, чи поліпептиди різної довжини.

[143] Словосполучення "штучно закодована амінокислота" означає амінокислоту, яка не є однією з 20 звичайних амінокислот або піролізином чи селеноцистеїном. Іншими словосполученнями, які можуть застосовуватись синонімічно із словосполученням "штучно закодована амінокислота" є "неприродна амінокислота" та інші варіанти цього словосполучення з дефісом або без дефісу. Словосполучення "штучно закодована амінокислота" також включає (але ними не обмежується) амінокислоти, які одержують шляхом модифікування (наприклад, посттрансляційні модифікації) природної амінокислоти (у тому числі, але без обмеження, 20 звичайних амінокислот або піролізину чи селеноцистеїну), але які самі по собі природним чином не вводяться до збільшеного трансляційним комплексом ланцюга поліпептиду. До прикладів таких штучних амінокислот належать (але без обмеження ними) N-ацетилглюкозамініл-L-серин, N-ацетилглюкозамініл-L-треонін та O-фосфотирозин.

[144] Словосполучення "амінокінцева група-модифікатор" означає будь-яку молекулу, яка може приєднуватись до амінокінця поліпептиду. Так само, словосполучення "карбоксикінцева група-модифікатор" означає будь-яку молекулу, яка може приєднуватись до карбоксильного кінця поліпептиду. До кінцевих груп-модифікаторів належать (але без обмеження ними) різні водорозчинні полімери, пептиди або білки, такі як сироватковий альбумін, або інші складові, які підвищують період напіввиведення пептидів із плазми.

[145] Словосполучення "функціональна група", "активна складова", "активувальна група", "відщеплювана група", "реакційно-активна ділянка", "хімічно-активна група" та "хімічно-активна складова" вживаються у цій галузі та у цьому описі для посилання на певні визначені ділянки або елементи молекули. Згадані словосполучення є до певної міри синонімічними у галузі хімії і вживаються у цьому описі для визначення ділянок молекул, які здійснюють якусь функцію або активність і є реакційноактивними з іншими молекулами.

[146] Термін "зв'язок" або "сполучний агент" вживають у цьому описі для посилання на агенти або зв'язки, які (за нормальних обставин) формуються як результат хімічної реакції і, як правило, є ковалентними зв'язками. Словосполучення "гідролітично стабільні зв'язки" означає, що зв'язки є по суті стабільними у воді і не реагують з водою при застосовуваних значеннях pH, у тому числі, але без обмеження, за фізіологічних умов впродовж тривалого періоду часу, можливо, навіть безкінечно. Словосполучення "гідролітично нестабільні або гідролітично розкладальні зв'язки" означає, що зв'язки розпадаються у воді або у водних розчинах, у тому числі, наприклад, у крові. Словосполучення "ферментативно нестабільні або ферментативно розкладальні зв'язки" означає, що зв'язок може бути розкладений одним або декількома ферментами. Як розуміється у цій галузі, поліетилен та споріднені полімери можуть мати розкладальні зв'язки у каркасі полімеру або у сполучній групі між каркасом полімеру та однією або декількома кінцевим функціональними групами полімерної молекули. Наприклад, складноєфірні зв'язки, утворені в результаті реакції пегільованих карбонових кислот або PEG-активованих карбонових кислот зі спиртовими групами біологічно активного агента, зазвичай гідролізуються за фізіологічних умов з виділення згаданого агента. До інших гідролітично розкладальних зв'язків належать (але без обмеження ними) карбонатні зв'язки; імінові зв'язки, які є результатом реакції аміну та альдегіду; фосфатноефірні зв'язки, утворені шляхом реакції спирту з фосфатною групою; гідразонові зв'язки, які є продуктом реакції гідразиду та альдегіду; ацеталеві зв'язки, які є продуктом реакції альдегіду та спирту; складні ортоєфірні зв'язки, які є продуктом реакції форміату та спирту; пептидні зв'язки, які утворюються аміногрупою, у тому числі, але без обмеження, на кінці полімеру, такого як полі(етиленгліколь), та карбоксильною групою пептиду; та олігонуклеотидні зв'язки, які утворюються фосфорамідитною групою, у тому числі, але без обмеження, на кінці полімеру, та 5' гідроксильною групою олігонуклеотиду.

[147] Словосполучення "біологічно активна молекула", "біологічно активна складова" або "біологічно активний агент", у разі застосування у цьому описі, означає будь-яку речовину, яка може впливати на будь-які фізичні або біохімічні властивості біологічної системи, шлях,

молекулу або взаємодію, пов'язану з організмом, у тому числі, але без обмеження, вірусами, бактеріями, бактеріофагом, транспозоном, пріоном, комахами, грибами, рослинами, тваринами та людьми. Зокрема, як описано у цьому описі, до біологічно активних молекул належить (але без обмеження ними) будь-яка речовина, призначена для діагностування, лікування, заспокоєння або запобігання хвороби у людей або інших тварин чи поліпшення іншим шляхом фізичного або психічного благополуччя людей або тварин. До прикладів біологічно активних молекул належать (але без обмеження ними) пептиди, білки, ферменти, дрібномолекулярні лікарські засоби, вакцини, імуногени, сильнодіючі наркотичні лікарські засоби, слабкі наркотичні лікарські засоби, вуглеводи, неорганічні атоми або молекули, барвники, ліпіди, нуклеозиди, радіонукліди, олігонуклеотиди, токсоеїди, токсини, прокаріотні та еукаріотні клітини, віруси, полісахариди, нуклеїнові кислоти та їх фрагменти, одержані з вірусів, бактерій, комах, тварин або іншої клітини чи клітини іншого типу, ліпосоми, мікрочастинки та міцели. Поліпептиди bG-CSF можна додавати до лікарської форми на основі міцел. До класів біологічно активних агентів, які є прийнятними для застосування з цим винаходом, належать (але без обмеження ними) лікарські речовини, проліки, радіонукліди, візуалізаційні (контрастні) речовини, полімери, антибіотики, фунгіциди, протівірусні агенти, протизапальні агенти, протипухлинні агенти, засоби для лікування серцево-судинних захворювань, антифобічні седативні засоби, гормони, фактори росту, стероїдні агенти, токсини мікробного походження тощо.

[148] Словосполучення "біфункціональний полімер" означає полімер, який містить дві окремі функціональні групи, які є здатними до реагування, зокрема, з іншими складовими (у тому числі, але без обмеження, бічними групами амінокислот) з утворенням ковалентних або нековалентних зв'язків. Біфункціональна сполучна група, яка має одну функціональну групу, що може реагувати з групою конкретної біологічно активної складової, та іншу групу, що може реагувати з групою другої біологічної складової, може застосовуватись для утворення кон'югату, який містить першу біологічно активну складову, біфункціональну сполучну групу та другу біологічно активну складову. Відомо багато методів та сполучних молекул для приєднання різних сполук до пептидів. Дивись, наприклад, заявку на європатент № 188,256; патенти США № 4,671,958, № 4,659,839, № 4,414,148, № 4,699,784; № 4,680,338 та № 4,569,789, включені до цього опису шляхом посилання. Словосполучення "багатофункціональний полімер" означає полімер, який містить дві або декілька окремих функціональних груп, що є здатними до реагування, зокрема, з іншими складовими (у тому числі, але без обмеження, бічними групами амінокислот) з утворенням ковалентних або нековалентних зв'язків. Біфункціональний полімер або багатофункціональний полімер може мати будь-яку бажану довжину або молекулярну масу і його можна вибирати таким чином, щоб забезпечувати конкретний необхідний проміжок або конформацію між однією або декількома молекулами, сполученими з bG-CSF та його рецептором або bG-CSF.

[149] У тому разі, коли замінні групи визначаються традиційними хімічними формулами, записаними зліва-направо, вони також охоплюють хімічно ідентичні замісники, які є результатом запису структури справа-наліво, наприклад, структура  $-\text{CH}_2\text{O}-$  є еквівалентною структурі  $-\text{OCH}_2-$ .

[150] Термін "замісники" включає, але не обмежується терміном "нейтральні замісники". До числа "нейтральних замісників" належать групи, які формують стабільні сполуки. До прийнятних нейтральних замісників або радикалів належать (але без обмеження ними) галоген,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкіл,  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ -алкеніл,  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ -алкініл,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкоксигрупа,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -аралкіл,  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -алкарил,  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ -циклоалкіл,  $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ -циклоалкеніл, феніл, заміщений феніл, толуол, ксиленіл, біфеніл,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкоксіалкіл,  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ -алкоксіарил,  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$ -арилоксіалкіл,  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$ -оксіарил,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкілсульфініл,  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкілсульфоніл,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-O-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)}$ , де  $m$  – від 1 до 8, арил, заміщений арил, заміщена алкоксигрупа, фторалкіл, гетероциклічний радикал, заміщений гетероциклічний радикал, нітроалкіл,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NRC(O)-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)}$ ,  $-\text{C(O)-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)}$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ -алкілтіоалкіл,  $-\text{C(O)O-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SO}_2$ ,  $=\text{S}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NR}_2$ , карбоніл,  $-\text{C(O)-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)-CF}_3$ ,  $-\text{C(O)-CF}_3$ ,  $-\text{C(O)NR}_2$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-арил)-S-(C}_6\text{-C}_{10}\text{-арил)}$ ,  $-\text{C(O)-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-арил)}$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{-O-(CH}_2)_m\text{-O-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкіл)}$ , де кожен  $m$  – від 1 до 8,  $-\text{C(O)NR}_2$ ,  $-\text{C(S)NR}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}_2$ ,  $-\text{NRC(O)NR}_2$ ,  $-\text{NRC(S)NR}_2$ , їх солі тощо. Кожен R, як описано у цьому описі, являє собою H, алкіл або заміщений алкіл, арил або заміщений арил, аралкіл або алкарил.

[151] Термін "галоген" охоплює фтор, хлор, йод та бром.

[152] Термін "алкіл", сам по собі або як частина іншого замісника, означає, якщо не зазначено інше, вуглеводневий радикал із прямим або розгалуженим ланцюгом чи циклічний вуглеводневий радикал або їх комбінацію, який може бути повністю насиченим, моно- або поліненасиченим і може включати бі- та полівалентні радикали, які мають вказану кількість атомів вуглецю (тобто  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  означає від одного до десяти атомів вуглецю). До прикладів насичених вуглеводневих радикалів належать (але без обмеження ними) такі групи як метил,

етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, трет-бутил, ізобутил, втор-бутил, циклогексил, циклогексилметил, циклопропілметил, гомологи та ізомери, наприклад, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил тощо. Ненасиченою алкільною групою є група, яка має один або декілька подвійних зв'язків або потрійних зв'язків. До прикладів ненасичених алкільних груп належать (але без обмеження ними) вініл, 2-пропеніл, кротил, 2-ізопентеніл, 2-(бутадієніл), 2,4-пентадієніл, 3-(1,4-пентадієніл), етиніл, 1- та 3-пропініл, 3-бутиніл і вищі гомологи та ізомери. Термін "алкіл", якщо не зазначено інше, також охоплює похідні алкілу, які докладніше визначені нижче, такі як "гетероалкіл". Алкільні групи, які є обмеженими вуглеводневими групами, позначені як "гомоалкіл".

[153] Термін "алкілен", сам по собі або як частина іншого замітника, означає бівалентний радикал, який є похідною алкану, необмежувальними прикладами якого є структури  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  та  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , і який також означає групи, які описуються нижче як "гетероалкілен". За типовим варіантом, алкільна (або алкіленова) група буде мати від 1 атома вуглецю до 24 атомів вуглецю, де ті групи, які мають 10 або менше атомів вуглецю, є конкретним прикладом здійснення способів та композицій, опис яких наведено. "Нижчим алкілом" або "нижчим алкіленом" є алкільна або алкіленова група з коротшим ланцюгом, який складається, як правило, з восьми або менше атомів вуглецю.

[154] Терміни "алкокси-", "алкіламіно-" та "алкілтіо-" (або тіоалкоксигрупа) вживають у їх традиційному значенні і вони означають алкільні групи, приєднані до решти молекули через атом кисню, аміногрупу або атом сірки, відповідно.

[155] Термін "гетероалкіл", сам по собі або у комбінації з іншим терміном, означає, якщо не зазначено інше, стабільний вуглеводневий радикал із прямим або розгалуженим ланцюгом чи циклічний вуглеводневий радикал або їх комбінацію, яка може складатись із зазначеної кількості атомів вуглецю і щонайменше одного гетероатому, вибраний з групи, яку складають O, N, Si та S, і де атоми азоту та сірки можуть факультативно бути окисненими, а гетероатом азоту може факультативно бути кватернізованим. Гетероатом(-и) O, N та S і Si може(-уть) бути розміщені у будь-якому внутрішньому положенні гетероалкільної групи або у положенні, у якому алкільна група приєднується до решти молекули. До прикладів належать (але без обмеження ними)  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$  та  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . До двох гетероатомів можуть бути розміщені послідовно, наприклад,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  та  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Подібним чином, термін "гетероалкілен", сам по собі або як частина іншого замітника, означає бівалентний радикал, який є похідною гетероалкілу, наприклад, але без обмеження,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  та  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . В гетероалкіленових групах однакові або різні гетероатоми можуть також займати будь-який або обидва кінці ланцюга (у тому числі, але без обмеження, алкіленокси-, алкілендіокси-, алкіленаміно-, алкілендіаміногрупа, амінооксіалкілен тощо). Окрім того, для алкіленових та гетероалкіленових сполучних груп, орієнтація сполучної групи не визначається напрямком, у якому записується формула сполучної групи. Наприклад, формула  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  означає як  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ , так і  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ .

[156] Терміни "циклоалкіл" та "гетероциклоалкіл", самі по собі або у комбінації з іншими термінами, означають, якщо не зазначено інше, циклічні варіанти "алкілу" та "гетероалкілу", відповідно. Так, циклоалкіл або гетероциклоалкіл включає насичені, частково ненасичені або повністю ненасичені циклічні зв'язки. Окрім того, для гетероциклоалкілу, гетероатом може займати положення, у якому гетероцикл приєднується до решти молекули. До прикладів циклоалкілу належать, але без обмеження ними, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексеніл, 3-циклогексеніл, циклогептил тощо. До прикладів гетероциклоалкілу належать, але без обмеження ними, 1-(1,2,5,6-тетрагідропіридил), 1-піперидиніл, 2-піперидиніл, 3-піперидиніл, 4-морфолініл, 3-морфолініл, тетрагідрофуран-2-іл, тетрагідрофуран-3-іл, тетрагідротієн-2-іл, тетрагідротієн-3-іл, 1-піперазиніл, 2-піперазиніл тощо. Окрім того, згаданий термін охоплює біциклічні та трициклічні структури. Подібним чином, термін "гетероциклоалкілен", сам по собі або як частина іншого замітника, означає бівалентний радикал, який є похідною гетероциклоалкілу, а термін "циклоалкілен", сам по собі або як частина іншого замітника, означає бівалентний радикал, який є похідною циклоалкілу.

[157] Термін "водорозчинний полімер", який вживають у цьому описі, означає будь-який полімер, який є розчинним у водних розчинниках. Результатом сполучення водорозчинних полімерів із поліпептидами bG-CSF можуть бути зміни, у тому числі, але без обмеження, підвищення або модулювання періоду напіввиведення з плазми або підвищення чи модулювання періоду напіввиведення терапевтично ефективної кількості, у порівнянні з немодифікованою формою, модульована імуногенність, модульовані характеристики фізичних зв'язків, таких як агрегування та утворення мультимерів, змінене зв'язування з рецептором,

змінене зв'язування з одним або декількома партнерами зв'язування та змінена димеризація або мультимеризація рецепторів. Водорозчинний полімер може мати або може не мати своєї власної біологічної активності, і його можна застосовувати як сполучну групу для приєднання bG-CSF до інших речовин, у тому числі, але без обмеження, до одного або декількох поліпептидів bG-CSF або однієї чи декількох біологічно активних молекул. До прийнятних полімерів належать (але без обмеження ними) поліетиленгліколь, пропіональдегід поліетиленгліколю, їх моно- $C_1$ - $C_{10}$ -алкокси- або арилокси-похідні (описані у патенті США № 5,252,714, включеному до цього опису шляхом посилання), монометоксиполіетиленгліколь, полівінілпіролідон, полівініловий спирт, поліамінокислоти, співполімер дивінілового ефіру/малеїнового ангідриду, N-(2-гідроксипропіл)метакриламід, декстран, похідні декстрану, у тому числі сульфат декстрану, поліпропіленгліколь, співполімер поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксіетилований поліол, гепарин, фрагменти гепарину, полісахариди, олігосахариди, глікани, целюлоза та похідні целюлози, у тому числі але без обмеження, метилцелюлозу та карбоксиметилцелюлозу, крохмаль та похідні крохмалю, поліпептиди, поліалкіленгліколь та його похідні, співполімери поліалкіленгліколю та їх похідні, ефіри полівінілетилену та альфа-бета-полі[(2-гідроксіетил)-DL-аспартамід тощо або їх суміші. До прикладів таких водорозчинних полімерів належать (але без обмеження ними) поліетиленгліколь та сироватковий альбумін. У WO 03/074087 та WO 03/074088 описане кон'югування білків або дрібних молекул із гідроксіалкілкрохмалем (HAS). До прикладів гідроксіалкілкрохмалів належить (але без обмеження) гідроксіетилкрохмаль. Кон'югати гідроксіалкілкрохмалю та іншої молекули, наприклад, можуть містити ковалентний зв'язок між кінцевими альдегідними групами HAS та реакційноздатними групами іншої молекули.

[158] Термін "поліалкіленгліколь" або "полі(алкенгліколь)", який вживають у цьому описі, означає поліетиленгліколь (полі(етиленгліколь)), поліпропіленгліколь, полібутиленгліколь та їх похідні. Термін "поліалкіленгліколь" охоплює як лінійні, так і розгалужені полімери та середні молекулярні маси у межах від 0,1 кДа до 100 кДа. Інші приклади здійснення наведені, наприклад, у каталогах комерційних постачальників, таких як каталог компанії Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

[159] Термін "арил" означає, якщо не зазначено інше, поліненасичений, ароматичний вуглеводневий замінник, який може мати один цикл або численні цикли (у тому числі, але без обмеження, від 1 циклу до 3 циклів), які конденсуються або зв'язуються між собою ковалентними зв'язками. Термін "гетероарил" означає арильні групи (або цикли), які містять від одного до чотирьох гетероатомів, вибраних з групи, яку складають N, O та S, де атоми азоту та сірки факультативно окиснені, а атом(-и) азоту факультативно кватернізований(-і). Гетероарильна група може бути приєднана до решти молекули через гетероатом. До необмежувальних прикладів арильних та гетероарильних груп належать феніл, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-біфеніл, 1-піроліл, 2-піроліл, 3-піроліл, 3-піразоліл, 2-імідазоліл, 4-імідазоліл, піразиніл, 2-оксазоліл, 4-оксазоліл, 2-феніл-4-оксазоліл, 5-оксазоліл, 3-ізоксазоліл, 4-ізоксазоліл, 5-ізоксазоліл, 2-тіазоліл, 4-тіазоліл, 5-тіазоліл, 2-фурил, 3-фурил, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, 2-піримідил, 4-піримідил, 5-бензотіазоліл, пуриніл, 2-бензимидазоліл, 5-індоліл, 1-ізохіноліл, 5-ізохіноліл, 2-хіноксалініл, 5-хіноксалініл, 3-хіноліл та 6-хіноліл. Замісники для кожної з вищезазначених арильних та гетероарильних циклічних систем вибирають із групи прийнятних замінників, опис яких наведений нижче.

[160] Для стислості, термін "арил", у разі застосування у комбінації з іншими термінами (у тому числі, але без обмеження, арилокси-, арилтіоксигрупа, арилалкіл), включає як арильні, так і гетероарильні цикли, які відповідають визначенню наведеному вище. Таким чином, термін "арилалкіл" охоплює ті радикали, у яких арильна група приєднана до алкільної групи (у тому числі, але без обмеження, бензил, фенетил, піридилметил тощо), у тому числі, ті алкільні групи, у яких атом вуглецю (у тому числі, але без обмеження, метиленова група) був замінений, наприклад, атомом кисню (у тому числі, але без обмеження, феноксиметил, 2-піридиллоксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропіл тощо).

[161] Кожен із вищезгаданих термінів (у тому числі, але без обмеження, "алкіл", "гетероалкіл", "арил" та "гетероарил") охоплює як заміщені, так і незаміщені форми вказаного радикалу. Приклади замінників для радикалів кожного типу наведені нижче.

[162] Замісниками для алкільних та гетероалкільних радикалів (у тому числі для тих груп, які часто позначають як алкіленові, алкенільні, гетероалкіленові, гетероалкенільні, алкінільні, циклоалкільні, гетероциклоалкільні, циклоалкенільні та гетероциклоалкенільні) можуть бути одна або декілька з цілого ряду груп, вибраних з-посеред наведених нижче (але без обмеження ними):  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ , -галоген,  $-SiR'R'R''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR'C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR'R''$ ,  $-NR'C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R'R'')=NR'''$ ,  $-NR-$

$C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  та  $-NO_2$  у кількості від нуля до  $(2m'+1)$ , де  $m'$  – загальна кількість атомів вуглецю у такому радикалі. Кожен з  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  and  $R''''$ , незалежно від інших, означає водень, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, у тому числі, але без обмеження, арил, заміщений 1-3 атомами галогену, заміщений або незаміщений алкіл, алкоксильну або тіоалкоксильну групи чи арилалкільні групи. У разі, коли сполука за цим винаходом містить, наприклад, більше ніж одну  $R$  групу, кожна з  $R$  груп вибирається незалежно одна від одної, так само, як і кожна з  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  та  $R''''$  груп, у разі, коли присутньою є більше ніж одна із цих груп. У разі, коли  $R'$  та  $R''$  приєднуються до того самого атому азоту, вони можуть комбінуватись з атомом азоту з утворенням 5-, 6- або 7-членного циклу. Наприклад,  $-NR'R''$  охоплює (але не обмежується ними) 1-піролідініл та 4-морфолініл. З вищенаведеного обговорення замісників фахівцю у цій галузі зрозуміло, що термін "алкіл" охоплює групи, які містять атоми вуглецю, приєднані до інших груп, окрім гідроксильних груп, таких як галогеналкільна (у тому числі, але без обмеження,  $-CF_3$  та  $-CH_2CF_3$ ) та ацильною (у тому числі, але без обмеження,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  тощо).

[163] Подібно до замісників, описаних для алкільного радикалу, існують різні замісники для арильних та гетероарильних груп, які вибирають з-посеред наведених нижче (але без обмеження ними): галоген,  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ , -галоген,  $-SiR'R'R''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR'C(O)R'$ ,  $-NR'C(O)NR'R''$ ,  $-NR'C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R'R'')=NR'''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-CN$  та  $-NO_2$ ,  $-R'$ ,  $-N_3$ ,  $-CH(Ph)_2$ , фторо( $C_1-C_4$ )алкокси та фторо( $C_1-C_4$ )алкіл у кількості від нуля до загального числа відкритих валентностей у ароматичній циклічній системі; і де кожен з  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  та  $R''''$ , незалежно від інших, вибирають з-посеред водню, алкілу, гетероалкілу, арилу та гетероарилу. У разі, коли сполука за цим винаходом містить, наприклад, більше ніж одну  $R$  групу, кожна з  $R$  груп вибирають незалежно одна від одної, так само, як і кожна з  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  та  $R''''$  груп, у разі, коли присутньою є більше ніж одна із цих груп.

[164] Словосполучення "модульований період напіввиведення з плазми", яке вживають у цьому описі, означає позитивну або негативну зміну часу знаходження модифікованого bG-CSF у кровообізі, порівняно з його немодифікованою формою. Період напіввиведення з плазми визначають шляхом відбирання проб крові у різні моменти часу після введення bG-CSF і визначення концентрації цієї молекули у кожній пробі. Кореляція концентрації у сироватці та часу надає можливість обчислення періоду напіввиведення з плазми. Бажаним є щонайменше двократне підвищення періоду напіввиведення з плазми, але корисним може бути і менше підвищення, наприклад, у тому разі, коли воно забезпечує задовільну схему приймання лікарського засобу або дозволяє уникнути токсичного ефекту. В деяких варіантах здійснення цього винаходу підвищення є щонайменше приблизно трикратним, щонайменше приблизно п'ятикратним або щонайменше приблизно десятикратним.

[165] Словосполучення "модульований період напіввиведення терапевтично ефективної кількості", яке вживають у цьому описі, означає позитивну або негативну зміну періоду напіввиведення терапевтично ефективної кількості bG-CSF, порівняно з його немодифікованою формою. Період напіввиведення терапевтично ефективної кількості визначають шляхом визначення фармакокінетичних та/або фармакодинамічних властивостей молекули у різні моменти часу після введення. Підвищений період напіввиведення терапевтично ефективної кількості надає можливість розробки особливо сприятливої схеми приймання лікарського засобу, особливо сприятливої загальної дози та уникання небажаного ефекту. В деяких варіантах здійснення цього винаходу підвищений період напіввиведення терапевтично ефективної кількості є результатом підвищеної активності, підвищеного або зменшеного зв'язування модифікованої молекули з мішенню, підвищеного або зменшеного розкладу молекули ферментами, такими як протеази, або підвищення чи зменшення іншого параметра або механізму дії немодифікованої молекули або підвищення чи зниження опосередкованого рецептором кліренсу згаданої молекули.

[166] Термін "ізолювана(-ий)", у разі застосування у відношенні нуклеїнової кислоти або білка, означає те, що нуклеїнова кислота або білок є вільною(-им) від принаймні деяких клітинних компонентів, з якими вона(він) є пов'язаною(-им) у природному стані, або те, що нуклеїнова кислота або білок була(був) сконцентрована(-ий) до рівня, який перевищував її(його) концентрацію у продукті in vivo або in vitro. Амінокислота(білок) може бути у однорідному стані. Ізолювані речовини можуть бути у сухому або напівсухому стані чи у розчині, у тому числі, але без обмеження, водному розчині. Амінокислота(білок) може бути складовою фармацевтичної композиції, яка містить додаткові фармацевтично прийнятні носії та/або допоміжні речовини. Чистоту і однорідність, як правило, визначають за допомогою методів аналітичної хімії, наприклад, за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі або високоефективної

рідинної хроматографії. Білок, який є найпоширеним різновидом, присутнім у препараті, є по суті очищеним. Зокрема, ізольований ген відділяють від відкритих рамок зчитування, які фланкують ген та кодують білок, окрім гена, який становить інтерес. Термін "очищена(-ий)" означає, що нуклеїнова кислота або білок утворює по суті одну смугу у електрофоретичному гелі. Зокрема, цей термін може означати, що нуклеїнова кислота або білок має щонайменше 85 % чистоту, щонайменше 90 % чистоту, щонайменше 95 % чистоту, щонайменше 99 % або більшу чистоту.

[167] Термін "нуклеїнова кислота" означає дезоксирибонуклеотиди, дезоксирибонуклеозиди, рибонуклеозиди або рибонуклеотиди та їх полімери у одно- чи двонитковій формі. У разі відсутності конкретного обмеження, згаданий термін охоплює нуклеїнові кислоти, що містять відомі аналоги природних нуклеотидів, які мають подібні зв'язувальні властивості, що і еталонна нуклеїнова кислота, і метаболізуються у спосіб, подібний до природних нуклеотидів. У разі відсутності інших конкретних обмежень, згаданий термін також означає аналоги олігонуклеотидів, у тому числі PNA (пептидонуклеїнова кислота), аналоги ДНК, які застосовуються у методах антисмислових мРНК (фосфоротіоати, фосфороамідати тощо). Якщо не зазначено інше, послідовність конкретної нуклеїнової кислоти також беззастережно охоплює її консервативно модифіковані варіанти (у тому числі, але без обмеження, заміни вироджених кодонів) та комплементарні послідовності, а також прямо вказані послідовності. Зокрема, заміни вироджених кодонів можуть здійснюватись шляхом одержання послідовностей, у яких третє положення одного або декількох вибраних (або усіх) кодонів замінюється залишками зі змішаними основами та/або залишками дезоксіінозину (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[168] Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" вживають у цьому описі взаємозамінно для позначення полімеру залишків амінокислот. Тобто опис, спрямований на поліпептид, такою самою мірою стосується опису пептиду та опису білка, і навпаки. Згадані терміни є застосовними до полімерів природних амінокислот, а також до полімерів амінокислот, у яких один або декілька амінокислотних залишків є штучно закодованими амінокислотами. Згадані терміни, які вживають у цьому описі, охоплюють амінокислотні ланцюги будь-якої довжини, у тому числі непроцесовані білки, де залишки амінокислот є сполучені ковалентними пептидними зв'язками.

[169] Термін "амінокислота" означає природні та штучні амінокислоти, а також аналоги амінокислот та міметики амінокислот, які функціонують у спосіб, подібний до природних амінокислот. Природними амінокислотами є 20 звичайних амінокислот (аланін, аргінін, аспарагін, аспарагінова кислота, цистеїн, глутамін, глутамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, тирозин та валін) та піролізін і селеноцистеїн. Словосполучення "аналоги амінокислот" означає сполуки, які мають таку саму основну хімічну структуру, що і природна амінокислота, тобто  $\alpha$ -вуглець, приєднаний до водню, карбоксильна група, аміногрупа та R група, така як гомосерин, норлейцин, сульфоксид метіоніну, метіонінметилсульфоній. Такі аналоги мають модифіковані R групи (такі як норлейцин) або модифіковані пептидні каркаси, але зберігають ту саму основну хімічну структуру, що і природна амінокислота. Посилання на амінокислоту охоплює, наприклад, природні протеогенні L-амінокислоти; D-амінокислоти, хімічно модифіковані амінокислоти, такі як варіанти та похідні амінокислот; природні непротеогенні амінокислоти, наприклад,  $\beta$ -аланін, орнітин тощо; та хімічно синтезовані сполуки, які мають властивості, відомі у цій галузі, як такі, що є характерними для амінокислот. До прикладів штучних амінокислот належать (але без обмеження ними)  $\alpha$ -метиламінокислоти (наприклад,  $\alpha$ -метилаланін), D-амінокислоти, гістидиноподібні амінокислоти (наприклад, 2-аміногістидин,  $\beta$ -гідроксигістидин, гомогістидин,  $\alpha$ -фторометилгістидин та  $\alpha$ -метилгістидин), амінокислоти, які мають зайвий метилен у бічному ланцюзі ("гомо" амінокислоти), та амінокислоти, у яких функціональну групу карбоксильної кислоти у бічному ланцюзі замінюють сульфокислотною групою (наприклад, цистеїнова кислота). Введення штучних амінокислот, у тому числі синтетичних штучних амінокислот, замінених амінокислот або однієї або декількох D-амінокислот до білків за цим винаходом може мати переваги з цілого ряду причин. Пептиди, що містять D-амінокислоти, і подібні сполуки демонструють підвищену стабільність *in vitro* або *in vivo*, порівняно з аналогами, які містять L-амінокислоти. Так, конструкція пептидів і подібних сполук, які містять D-амінокислоти, може бути особливо корисною у разі необхідності підвищеної внутрішньоклітинної стабільності. Конкретніше, D-пептиди і подібні сполуки є стійкими до ендогенних пептидаз та протеаз, що забезпечує поліпшену біологічну доступність молекули, та подовжений період напіввиведення *in vivo*, у разі виникнення необхідності у таких властивостях. На додаток до цього, D-пептиди і

подібні сполуки не можуть ефективно процесуватись для рестрикованої (за головним комплексом гістосумісності II класу) презентації Т-клітинам-хелперам і, завдяки цьому, можуть з меншою ймовірністю індукувати гуморальні імунні реакції в організмі у цілому.

[170] На амінокислоти у цьому описі можна посилались за допомогою їх широковідомих трилітерних умовних позначень або за допомогою однолітерних умовних позначень, рекомендованих Комісією з біохімічної номенклатури ІЮПАК (Міжнародна спілка з теоретичної та прикладної хімії) – ІЮБ (Міжнародна спілка з біохімії).

[171] Словосполучення "консервативно модифіковані варіанти" є застосовним як до амінокислот, так і до нуклеїновокислотних послідовностей. Стосовно конкретних нуклеїновокислотних послідовностей, словосполучення "консервативно модифіковані варіанти" означає ті нуклеїнові кислоти, які кодують ідентичні або по суті ідентичні амінокислотні послідовності, або, у разі, коли нуклеїнова кислота не кодує амінокислотної послідовності, по суті ідентичні послідовності. З причини виродженості генетичного коду, велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодує будь-який певний білок. Наприклад, усі кодони GCA, GCC, GCG та GCU кодують амінокислоту аланін. Таким чином, у кожному положенні, де аланін визначається кодоном, згаданий кодон може бути замінений на будь-який з відповідних описаних кодонів без зміни закодованого поліпептиду. Такі нуклеїновокислотні варіанти є "мовчазними варіантами", які являють собою один із різновидів консервативно модифікованих варіантів. Кожна нуклеїновокислотна послідовність у цьому описі, яка кодує поліпептид, також описує кожний можливий мовчазний варіант нуклеїнової кислоти. Фахівцю у цій галузі зрозуміло, що кожен кодон у нуклеїновій кислоті (за виключенням AUG, який, як правило, є єдиним кодоном для метіоніну, та TGG, який, як правило, є єдиним кодоном для триптофану) може бути модифікованим з одержанням функціонально ідентичної молекули. Відповідно, кожен мовчазний варіант нуклеїнової кислоти, який кодує поліпептид, є прихованим у кожній описаній послідовності.

[172] Щодо амінокислотних послідовностей, фахівцю у цій галузі зрозуміло, що індивідуальні заміни, делеції або додання до нуклеїнової кислоти, пептиду, поліпептиду або білкової послідовності, які змінюють, додають або видаляють одну амінокислоту або невеликий відсоток амінокислот у закодованій послідовності, являють собою "консервативно модифікований варіант", де результатом зміни є делеція амінокислоти, додання амінокислоти або заміна амінокислоти хімічно подібною амінокислотою. Таблиці консервативних заміन, які пропонують функціонально подібні амінокислоти, є відомими фахівцям у цій галузі. Такі консервативно модифіковані варіанти не виключають поліморфних варіантів, міжвидових гомологів та алелей за цим винаходом і є доповненням до них.

[173] Таблиці консервативних замін, що пропонують функціонально подібні амінокислоти, є відомими фахівцям у цій галузі. Кожна з наведених нижче восьми груп містить амінокислоти, які є консервативно взаємозамінними:

- 1) Аланін (A), Гліцин (G);
  - 2) Аспарагінова кислота (D), Глутамінова кислота (E);
  - 3) Аспарагін (N), Глутамін (Q);
  - 4) Аргінін (R), Лізин (K);
  - 5) Ізолейцин (I), Лейцин (L), Метіонін (M), Валін (V);
  - 6) Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W);
  - 7) Серин (S), Треонін (T); та
  - 8) Цистеїн (C), Метіонін (M)
- (дивись, наприклад, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman & Co.; 2<sup>nd</sup> edition (December 1993)).

[174] Терміни "ідентична" або відсоткова "ідентичність", у контексті двох або декількох нуклеїнових кислот або поліпептидних послідовностей, означають дві або декілька послідовностей або субпослідовностей, які є однаковими. Послідовності є "по суті ідентичними", якщо вони мають відсоток однакових залишків амінокислот або нуклеотидів (тобто приблизно 60 % ідентичність, приблизно 65 % ідентичність, приблизно 70 % ідентичність, приблизно 75 % ідентичність, приблизно 80 % ідентичність, приблизно 85 % ідентичність, приблизно 90 % ідентичність або приблизно 95 % ідентичність на визначеній ділянці) при порівнянні та вирівнюванні для визначення максимальної відповідності у "вікні" порівняння або на визначеній ділянці, як визначається за допомогою одного з наведених нижче алгоритмів порівняння послідовностей (або інших алгоритмів, доступних для фахівців у цій галузі), або шляхом ручного вирівнювання та візуальної перевірки. Це визначення має відношення також до комплементу досліджуваної послідовності. Ідентичність може існувати на ділянці, яка має щонайменше приблизно 50 амінокислот або нуклеотидів у довжину, або на ділянці, яка має 75-100



амінокислот або нуклеотидів у довжину, або, у разі відсутності визначення, на усій послідовності полінуклеотиду або поліпептиду. Полінуклеотид, який кодує поліпептид за цим винаходом, у тому числі гомологи видів окрім людини, можна одержати за допомогою процесу, який включає етапи скринінгу бібліотеки за жорстких умов гібридизації з міченим зондом, який

5 полінуклеотидну послідовність за цим винаходом або її фрагмент, та ізоляції непроцесованої кДНК та геномних клонів, які містять згадану полінуклеотидну послідовність. Такі методи гібридизації є добре відомими фахівцю.

[175] При порівнянні послідовностей, як правило, одна послідовність відіграє роль еталонної послідовності, з якою порівнюють експериментальні послідовності. При застосуванні алгоритму порівняння послідовностей, досліджувану та еталонну послідовності вводять до комп'ютера, задають координати послідовностей, у разі необхідності, та задають параметри програми алгоритму послідовностей. Можуть застосовуватись параметри програми за умовчанням або можуть визначатись альтернативні параметри. Після цього алгоритм порівняння послідовностей обчислює відсоткову ідентичність досліджуваних послідовностей відносно еталонної

10 послідовності, виходячи з параметрів програми.

[176] Термін "вікно порівняння", який вживають у цьому описі, означає посилання на сегмент будь-якого одного з ряду суміжних положень, вибраний з групи, яку складають від 20 до 600, як правило, від приблизно 50 до приблизно 200, частіше від приблизно 100 до приблизно 150 положень, на якому послідовність може порівнюватись з еталонною послідовністю, яка має таку

20 саму кількість суміжних положень, після оптимального вирівнювання двох послідовностей. Способи вирівнювання послідовностей для порівняння є відомими фахівцям у цій галузі. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може здійснюватись, у тому числі, але без обмеження, за алгоритмом локальної гомології Сміта-Уотермена (Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c), за алгоритмом вирівнювання для знаходження гомології Нідлмана-Вунша (Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443), за методом пошуку подібності Пірсона-Ліпмана (Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444), шляхом комп'ютеризованого застосування цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA та TFASTA у пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, компанія Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, штат Вісконсін) або шляхом ручного вирівнювання та візуальної перевірки

25 (дивись, наприклад, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995, додаток)).

[177] Прикладом алгоритмів, які є прийнятними для визначення відсоткової ідентичності та подібності послідовностей є алгоритми BLAST та BLAST 2.0, опис яких наведено у Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, та Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, відповідно. Пакет програм для проведення аналізу BLAST знаходиться у вільному доступі через

35 Національний центр біотехнологічної інформації, доступ до якого відкритий у мережі Інтернет за адресою [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Параметри W, T та X програми BLAST визначають чутливість та швидкість вирівнювання. Програма BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) застосовує за умовчанням довжину слів (W) 11, очікування (E) 10, M=5, N=-4 та порівняння обох ниток. Для амінокислотних послідовностей програма BLASTP застосовує за умовчанням довжину слів 3, очікування (E) 10 і оцінювальну матрицю BLOSUM62 (дивись Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) з вирівнюванням (B) 50, очікуванням (E) 10, M=5, N=-4 та порівнянням обох ниток. Алгоритм BLAST, як правило, застосовують із відключеним фільтром "низької складності".

40

[178] Алгоритм BLAST здійснює також статистичний аналіз подібності між двома послідовностями (дивись, наприклад, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Одним із критеріїв подібності, який надається алгоритмом BLAST, є ймовірність найменшої суми (P(N)), який надає показник ймовірності, за яким могла б трапитись випадкова сумісність двох нуклеотидних або амінокислотних послідовностей. Наприклад, нуклеїнова кислота вважається подібною до еталонної послідовності, якщо ймовірність найменшої суми

50 при порівнянні експериментальної нуклеїнової кислоти з еталонною нуклеїновою кислотою є меншою ніж приблизно 0,2 або меншою ніж приблизно 0,01 чи меншою ніж приблизно 0,001.

[179] Словосполучення "селективно (або специфічно) гібридизуватись з" означає зв'язування, утворення дуплексу або гібридизацію молекули лише з конкретною нуклеотидною послідовністю за суворих умов гібридизації, коли ця послідовність є присутньою у складній суміші (з включенням (але без обмеження) загальної клітинної або бібліотечної ДНК або РНК).

55

[180] Словосполучення "суворі умови гібридизації" означає гібридизацію послідовностей ДНК, РНК, ПНК або інших нуклеїновокислотних міметиків чи їх комбінацій за умов низької іонної сили та високої температури як відомо у цій галузі. За суворих умов зонд, як правило, буде гібридизуватись зі своєю послідовністю-мішенню у складній суміші нуклеїнової кислоти (у тому числі, але без обмеження, загальної клітинної або бібліотечної ДНК або РНК), але не буде

60

гібридизуватись з іншими послідовностями у складній суміші. Суворі умови залежать від послідовностей і будуть іншими за інших обставин. Довші послідовності гібридизуються, як правило, при більш високих температурах. Вичерпну інформацію стосовно гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти у Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Взагалі, температуру за суворих умов вибирають на приблизно 5-10°C нижче, ніж температура плавлення ( $T_m$ ) конкретної послідовності при визначеній іонній силі, рН.  $T_m$  являє собою температуру (при визначеній іонній силі, рН та концентрації нуклеїнових кислот), при якій 50 % зондів, комплементарних до мішені, гібридизуються з послідовністю-мішенню у стані рівноваги (оскільки послідовності-мішені є присутніми з надлишком, при  $T_m$  ступінь зайнятості зондів у стані рівноваги дорівнює 50 %). Суворими можуть бути умови, за яких концентрація солі є меншою ніж приблизно 1,0 М іонів натрію, як правило, концентрація іонів натрію (або інших солей) становить від приблизно 0,01 М до 1,0 М при значенні рН від 7,0 до 8,3 і температурі щонайменше приблизно 30°C для коротких зондів (у тому числі, але без обмеження, від 10 нуклеотидів до 50 нуклеотидів) та щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (у тому числі, але без обмеження, більших за 50 нуклеотидів). Суворі умови можуть бути забезпечені також у разі додання дестабілізуючих речовин, таких як формамід. У разі селективної або специфічної гібридизації, позитивний сигнал може перевищувати фонову гібридизацію щонайменше удвічі, факультативно у десять разів. Типові умови гібридизації за суворих умов можуть виглядати таким чином: 50 % формаміду, 5×SSC (стандартний цитратний фізіологічний розчин) та 1 % SDS (додецилсульфат натрію), інкубування при температурі 42 °C, або 5×SSC, 1 % SDS, інкубування при температурі 65 °C, з промиванням у 0,2×SSC та 0,1 % SDS при температурі 65 °C. Тривалість таких промивань може становити 5 хв, 15 хв, 30 хв, 60 хв, 120 хв або більше.

[181] Термін "еукаріот", який вживають у цьому описі, означає організми, які належать до філогенетичного домену Eucarya, такі як тварини (у тому числі, але без обмеження, ссавці, комахи, плазуни, птахи тощо), війчасті, рослини (у тому числі, але без обмеження, однодольні, дводольні, водорості тощо), гриби, дріжджі, джгутиконосні, мікроспоридії, протисти тощо.

[182] Термін "неукаріот", який вживають у цьому описі, означає нееукаріотні організми. Наприклад, нееукаріотні організми можуть належати до філогенетичного домену Eubacteria (у тому числі, але без обмеження, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* тощо) або до філогенетичного домену Archaea (у тому числі, але без обмеження, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такі як *Haloferax volcanii* та *Halobacterium* spp NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryopyrum pernix* тощо).

[183] Термін "суб'єкт", який вживають у цьому описі, означає тварину, в деяких варіантах здійснення цього винаходу ссавця, а у інших варіантах здійснення цього винаходу людину, яка є об'єктом лікування, спостереження або експерименту. Твариною може бути свійська тварина (наприклад, собаки, кішки тощо), сільськогосподарська тварина (наприклад, корови, вівці, свині, коні тощо) або лабораторна тварина (наприклад, пацюки, миші, морські свинки тощо).

[184] Словосполучення "ефективна кількість", який вживають у цьому описі, означає таку кількість модифікованого поліпептиду зі штучними амінокислотами, яка при введенні деякою мірою полегшить один або декілька симптомів захворювання, стану або розладу, яке(який) піддають лікуванню. Композиції, які містять модифікований поліпептид зі штучними амінокислотами, опис яких наведено, можуть вводитись з метою профілактичного, посилювального та/або терапевтичного лікування.

[185] Терміни "посилювати" або "посилення" означають підвищення або подовження ефективності або тривалості бажаної дії. Таким чином, стосовно посилення ефекту терапевтичних агентів, термін "посилення" означає здатність підвищувати або подовжувати, за ефективністю або тривалістю, дію інших терапевтичних агентів у системі. Словосполучення "ефективно-посилююча кількість", яке вживають у цьому описі, означає кількість, адекватну для посилення дії іншого терапевтичного агента у бажаній системі. У разі застосування на тварині, кількості, ефективні для такого застосування, будуть залежати від тяжкості симптомів та перебігу захворювання, розладу або стану, попереднього лікування, стану здоров'я тварини та реакції на лікарські препарати, а також оцінки ветеринарного лікаря, який займається лікуванням.

[186] Термін "модифікований", який вживають у цьому описі, означає будь-які зміни, яких зазнав даний поліпептид, такі як зміни довжини поліпептиду, амінокислотної послідовності, хімічної структури, котрансляційну модифікацію або посттрансляційну модифікацію поліпептиду.

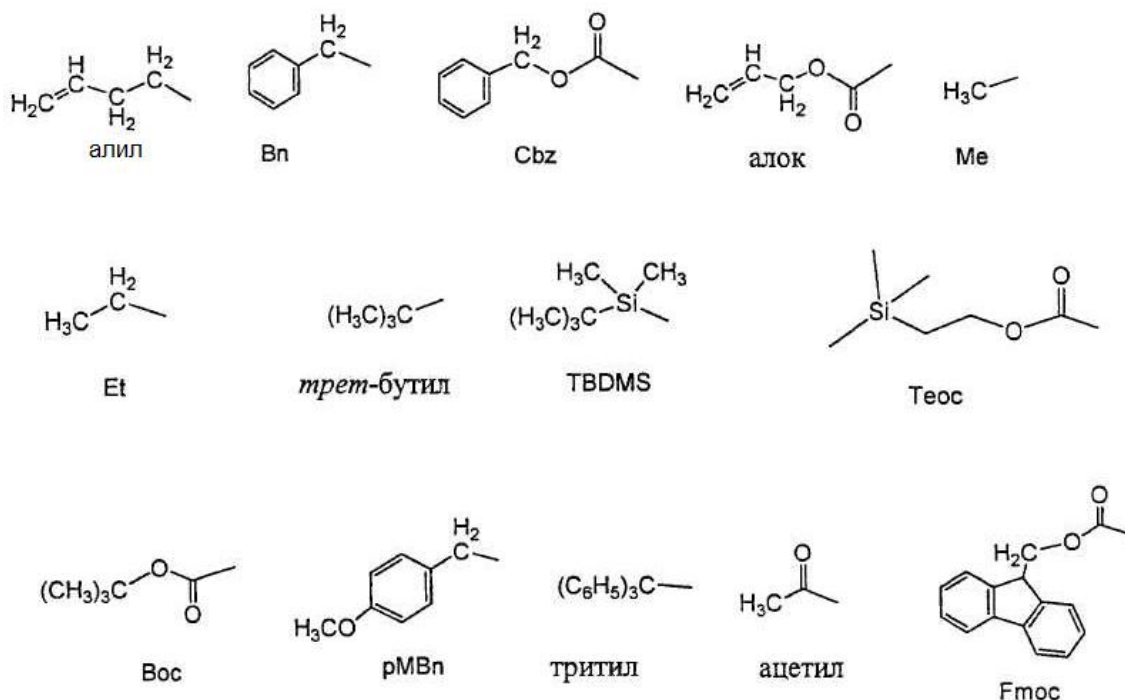
Цей термін, наведений у формі "(модифікований)", означає, що обговорювані поліпептиди зазнають факультативної модифікації, тобто обговорювані поліпептиди можуть бути модифікованими або немодифікованими.

[187] Термін "посттрансляційно модифікований" означає будь-яку модифікацію природної або штучної амінокислоти, якої така амінокислота зазнала після введення до поліпептидного ланцюга. Цей термін охоплює, лише як приклад, котрансляційні *in vivo* модифікації, котрансляційні *in vitro* модифікації (наприклад, у безклітинній трансляційній системі), посттрансляційні *in vivo* модифікації та посттрансляційні *in vitro* модифікації.

[188] У разі профілактичного застосування, композиції, які містять поліпептид bG-CSF, вводять тварині, сприйнятливій або такій, що, за якихось обставин, ризикує захворіти на конкретну хворобу, розлад або стан. Така кількість визначається як "профілактично ефективна кількість". У разі такого застосування, точні кількості також залежать від стану здоров'я тварини, маси тощо. Вважають, що визначення таких профілактично ефективних кількостей шляхом повсякденного експериментування (наприклад, клінічне випробування з підвищенням дози) знаходиться у межах можливостей галузі, до якої належить винахід.

[189] Термін "захисний" означає присутність "захисної групи" або складової, яка запобігає реакції хімічно активної функціональної групи за певних реакційних умов. Така захисна група буде змінюватись у залежності від типу хімічно активної групи, яка захищається. Наприклад, якщо хімічно активною групою є амін або гідрозид, захисну групу можна вибрати з групи, яку складають трет-бутилоксикарбоніл (t-Boc) та 9-флуоренілметоксикарбоніл (Fmoc). Якщо хімічно активною групою є тіол, захисною групою може бути ортопіридилсульфід. Якщо хімічно активною групою є карбонова кислота, така як бутанова або пропіонова кислота чи гідроксильна група, захисною групою може бути бензильна або алкільна група, така як метил, етил або трет-бутил. Інші захисні групи, відомі у цій галузі, можуть також застосовуватись у або за методами та композиціями, опис яких наведений у цій заявці, у тому числі фотолабільні групи, такі як Nvoc та MeNvoc. Інші захисні групи, відомі у цій галузі, можуть також застосовуватись у або за методами та композиціями, опис яких наведений у цій заявці.

[190] Лише як приклад, блокувальні/захисні групи можуть бути вибрані з:



[191] Інші захисні групи описані у монографії Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, яка у повному обсязі включена до цього опису шляхом посилання.

[192] У разі терапевтичного застосування композиції, які містять модифіковані поліпептиди із штучними амінокислотами, вводять тварині, яка вже страждає на захворювання, стан або розлад, у кількості, достатній для лікування або принаймні часткового призупинення симптомів

захворювання, розладу або стану. Така кількість визначається як "терапевтично ефективна кількість" і буде залежати від тяжкості симптомів та перебігу захворювання, розладу або стану, попереднього лікування, стану здоров'я тварини та реакції на лікарські препарати, а також оцінки ветеринарного лікаря, який займається лікуванням. Вважають, що визначення таких профілактично ефективних кількостей шляхом повсякденного експериментування (наприклад, клінічне випробування з підвищенням дози) знаходиться у межах можливостей галузі, до якої належить винахід.

[193] Термін "лікування" означає профілактичне та/або терапевтичне лікування.

[194] Поліпептиди із штучно закодованими амінокислотами, представлені у цьому описі, можуть включати мічені радіоактивними ізотопами сполуки з одним або декількома атомами, заміненими атомом, який має атомну масу або масове число, яке відрізняється від природної атомної маси або природного масового числа. До прикладів ізотопів, які можуть бути введені до представлених сполук, належать ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фтору та хлору, наприклад,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , відповідно. Певні мічені ізотопами сполуки, опис яких наведено у цій заявці, наприклад, сполуки, до яких введені такі радіоактивні ізотопи, як, наприклад,  $^3\text{H}$  та  $^{14}\text{C}$ , можуть застосовуватись у аналізах лікарських засобів та/або аналізах розподілу у субстратній тканині. Окрім того, заміна на ізотопи, такі як дейтерій, тобто  $^2\text{H}$ , може надати певні терапевтичні переваги, які є результатом більшої метаболічної стабільності, наприклад, підвищення періоду напіввиведення *in vivo* або зменшення необхідної дози.

[195] Усі ізомери, у тому числі, але без обмеження, діастереомери, енантіомери та їх суміші, розглядаються як складова частина композицій, опис яких наведений у цій заявці. У інших варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди із штучно закодованими амінокислотами метаболізуються при введенні до організму з продукуванням метаболіту, який у подальшому застосовується для справляння необхідної дії, у тому числі необхідної терапевтичної дії. У інших варіантах здійснення цього винаходу згадані метаболіти є активними метаболітами поліпептидів із штучно закодованими амінокислотами.

[196] У деяких ситуаціях поліпептиди із штучно закодованими амінокислотами можуть існувати як таутомери. На додаток до цього, поліпептиди із штучно закодованими амінокислотами, опис яких наведений у цій заявці, можуть існувати у несольватованій, а також у сольватованій формах із фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода, етанол тощо. Сольватовані форми також розглядаються як розкриті у цьому описі. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що деякі сполуки, опис яких наведено у цій заявці, можуть існувати у декількох таутомерних формах. Усі такі таутомерні форми розглядаються як складова частина композицій, опис яких наведений у цій заявці.

[197] Якщо не вказується інше, застосовуються традиційні для цієї галузі методи мас-спектроскопії, ЯМР, РХВЕ, хімії білків, біохімії, рекомбінантних ДНК та фармакології.

Докладний опис

I. Вступ

[198] Цей винахід пропонує молекули b-GCSF, які містять щонайменше одну штучну амінокислоту. У певних варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF із щонайменше однією штучною амінокислотою містить щонайменше одну посттрансляційну модифікацію. У одному з варіантів здійснення цього винаходу щонайменше одна посттрансляційна модифікація являє собою приєднання молекули, у тому числі, але без обмеження, гідроксіалкілкрохмалю (HAS), гідроксіетилкрохмалю (HES), мітки, барвника, полімеру, водорозчинного полімеру, похідної поліетиленгліколю, фотозшивального агента, радіонукліда, цитотоксичної сполуки, лікарської речовини, афінної мітки, фотоафінної мітки, реакційноздатної сполуки, смоли, другого білка або поліпептиду чи аналога поліпептиду, антитіла або фрагмента антитіла, металохелату, кофактора, жирної кислоти, вуглеводу, полінуклеотиду, ДНК, РНК, антисмислового полінуклеотиду, сахариду, водорозчинного дендримера, циклодекстрину, інгібувальної рибонуклеїнової кислоти, біоматеріалу, наночастинки, спінової мітки, флуорофору, металовмісної складової, радіоактивної складової, нової функціональної групи, групи, яка ковалентно або нековалентно взаємодіє з іншими молекулами, фотореактивної складової, групи, яка збуджується фотохімічноактивним випромінюванням, складової, здатної до фотоізомеризації, біотину, похідної біотину, аналога біотину, складової, яка містить важкий атом, хімічно розщеплюваної групи, фоторозщеплюваної групи, подовженого бічного ланцюга, цукру, приєданого до атома вуглецю, окиснювально-відновлювального засобу, тіоамінокислоти, токсичної складової, складової, міченої радіоактивною міткою, біофізичного зонда, фосфоресцентної групи, хемілюмінесцентної групи, групи з високою електронною густиною, магнітної групи, інтеркаляційної групи, хромофору, енергопередавального засобу, біологічно активного засобу, виявної мітки, невеликої молекули,

квантової точки, нанопередавача, радіонуклеотиду, радіопередавача, нейтронзахватної речовини або будь-якої комбінації вищенаведеного або будь-якої іншої необхідної сполуки або речовини, у тому числі другої реакційноздатної групи до щонайменше однієї штучної амінокислоти, яка містить першу реакційноздатну групу, за допомогою хімічних методів, відомих фахівцю у цій галузі як прийнятні для конкретних реакційноздатних груп. Наприклад, першою реакційноздатною групою є алкінільна складова (у тому числі, але без обмеження, у штучній амінокислоті, п-азидо-L-фенілаланін, де пропаргільну групу подеколи називають також ацетиленовою складовою), а другою реакційноздатною групою є азидна складова, і застосовують такий хімічний метод як реакція [3+2]-циклоприєднання. За іншим прикладом, першою реакційноздатною групою є азидна складова (у тому числі, але без обмеження, у штучній амінокислоті, п-азидо-L-фенілаланін), а другою реакційноздатною групою є алкінільна складова. За певними варіантами здійснення модифікованого поліпептиду b-GCSF за цим винаходом застосовують щонайменше одну штучну амінокислоту (у тому числі, але без обмеження, штучну амінокислоту, яка містить функціональну кетогрупу), яка містить щонайменше одну посттрансляційну модифікацію, де щонайменше одна посттрансляційна модифікація містить сахаридну складову. У певних варіантах здійснення цього винаходу посттрансляційну модифікацію здійснюють *in vivo* в еукаріотній або в нееукаріотній клітині. Згадана молекула до поліпептиду може приєднуватись за допомогою сполучного агента, полімеру, водорозчинного полімеру або іншої молекули. Згадана молекула може приєднуватись безпосередньо до поліпептиду.

[199] У певних варіантах здійснення цього винаходу білок містить щонайменше одну посттрансляційну модифікацію, яку здійснюють *in vivo* однією клітиною-хазяїном, де згадану посттрансляційну модифікацію, як правило, клітиною-хазяїном іншого типу не здійснюють. У певних варіантах здійснення цього винаходу білок містить щонайменше одну посттрансляційну модифікацію, яку здійснюють *in vivo* еукаріотною клітиною, де згадану посттрансляційну модифікацію, як правило, нееукаріотною клітиною не здійснюють. До прикладів посттрансляційних модифікацій належать, але без обмеження ними, глікозилювання, ацетилювання, ацилювання, ліпідна модифікація, пальмітоїлювання, приєднання пальмітату, фосфорилювання, модифікація шляхом зв'язування гліколіпідів тощо.

[200] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька штучно закодованих амінокислот для глікозилювання, ацетилювання, ацилювання, ліпідної модифікації, пальмітоїлювання, приєднання пальмітату, фосфорилювання або модифікації поліпептиду шляхом зв'язування гліколіпідів. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька штучно закодованих амінокислот для глікозилювання поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька природних амінокислот для глікозилювання, ацетилювання, ацилювання, ліпідної модифікації, пальмітоїлювання, приєднання пальмітату, фосфорилювання або модифікації поліпептиду шляхом зв'язування гліколіпідів. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька природних амінокислот для глікозилювання поліпептиду.

[201] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька делецій, які посилюють глікозилювання поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання на іншій амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одну або декілька делецій, які посилюють глікозилювання на іншій амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання на штучно закодованій амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання на природній амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін природних амінокислот, які посилюють глікозилювання на іншій амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання на природній амінокислоті поліпептиду. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид b-GCSF містить одне або декілька додань та/або замін штучно закодованих амінокислот, які посилюють глікозилювання на штучно закодованій амінокислоті поліпептиду.

[202] У одному з варіантів здійснення цього винаходу посттрансляційна модифікація являє собою приєднання олігосахариду до аспарагіну за допомогою зв'язку GlcNAc-аспарагін (у тому числі, але без обмеження, коли олігосахарид містить (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc тощо). В іншому варіанті здійснення цього винаходу посттрансляційна модифікація являє собою приєднання олігосахариду (у тому числі, але без обмеження, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc тощо) до серину або треоніну за допомогою зв'язку GalNAc-серин, GalNAc-треонін, GlcNAc-серин або GlcNAc-треонін. У певних варіантах здійснення цього винаходу білок або поліпептид за цим винаходом може містити секреторну або локалізаційну послідовність, мітку антигенної детермінанти, мітку FLAG, полігістидинову мітку, гібрид GST та/або подібні складові. До прикладів секреторних сигнальних послідовностей належать, але без обмеження ними, прокаріотна секреторна сигнальна послідовність, еукаріотна секреторна сигнальна послідовність, еукаріотна секреторна сигнальна послідовність, 5'-оптимізована для бактеріальної експресії, нова секреторна сигнальна послідовність, пектатліазна секреторна сигнальна послідовність, Omp A секреторна сигнальна послідовність та фагова секреторна сигнальна послідовність. До прикладів секреторних сигнальних послідовностей належать, але без обмеження ними, STII (прокаріотна), Fd GIII та M13 (фагова), Bgl2 (дріжджова) та сигнальна послідовність bla, яку одержують із транспозону. Будь-яку з таких послідовностей можна модифікувати для забезпечення бажаного результату з поліпептидом, у тому числі, але без обмеження, шляхом заміни однієї сигнальної послідовності іншою сигнальною послідовністю, заміни лідерної послідовності іншою лідерною послідовністю тощо.

[203] Білок або поліпептид, який становить інтерес, може містити щонайменше одну, щонайменше дві, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше шість, щонайменше сім, щонайменше вісім, щонайменше дев'ять або десять чи більше штучних амінокислот. Згадані штучні амінокислоти можуть бути однаковими або різними, наприклад, білок може мати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше різних сайтів, які містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше різних штучних амінокислот. У певних варіантах здійснення цього винаходу щонайменше одну (але менше, ніж усі) конкретну амінокислоту, присутню у природному варіанті білка, замінюють на штучну амінокислоту.

[204] Цей винахід пропонує способи та композиції на основі b-GCSF, які містять щонайменше одну штучно закодовану амінокислоту. Введення щонайменше однієї штучно закодованої амінокислоти до складу b-GCSF можна здійснювати за допомогою методів кон'югації, які включають специфічні хімічні реакції, у тому числі, але без обмеження, з однією або декількома штучно закодованими амінокислотами, проте без реагування із 20 звичними амінокислотами. В деяких варіантах здійснення цього винаходу b-GCSF, що містить штучно закодовану амінокислоту, приєднаний до водорозчинного полімеру, такого як поліетиленгліколь (PEG), через бічний ланцюг штучно закодованої амінокислоти. Цей винахід пропонує високоєфективний метод селективної модифікації білків похідними PEG, який включає селективне введення негенетично закодованих амінокислот, у тому числі, але без обмеження, тих амінокислот, які містять функціональні групи або замісники, відсутні у 20 природним чином введених амінокислот, у тому числі, але без обмеження, кетонуву, азидну або ацетиленову складову, до складу білків у відповідь на селекторний кодон та подальшу модифікацію цих амінокислот відповідною реакційноздатною похідною PEG. Після введення бічні ланцюги амінокислот можна модифікувати із застосуванням хімічних методів, відомих фахівцям у цій галузі як такі, що є прийнятними для конкретних функціональних груп або замісників, присутніх у штучно закодованій амінокислоті. Найрізноманітніші відомі хімічні методи є прийнятними для застосування за цим винаходом для введення водорозчинного полімеру до складу білка. Такі методи включають, але без обмеження ними, реакцію [3+2]-циклоприєднання Хьюсгена (дивись, наприклад, Padwa A. in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost B.M., Pergamon, Oxford, стор. 1069-1109; та Huisgen R. у *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa A., Wiley, New York, стор. 1-176) з включенням, але без обмеження ними, ацетиленових або азидних похідних, відповідно.

[205] Оскільки метод [3+2]-циклоприєднання Хьюсгена включає реакцію циклоприєднання, а не нуклеофільного заміщення, білки можна модифікувати з надзвичайно високою селективністю. Згадану реакцію можна здійснювати при кімнатній температурі у водних умовах із надзвичайно високою регіоселективністю (1,4>1,5) шляхом додання до реакційної суміші каталітичних кількостей солей Cu(I). Дивись, наприклад, Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; та Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; та WO 03/101972. Молекула, яка може бути приєднана до білка за цим винаходом шляхом реакції [3+2]-циклоприєднання, включає фактично будь-яку молекулу з відповідною функціональною групою або замісником, у тому числі, але без обмеження, азидопохідну або ацетиленову похідну. Ці

молекули можна додавати до штучної амінокислоти з ацетиленовою групою, у тому числі, але без обмеження, п-пропаргілоксифенілаланіном, або азидною групою, у тому числі, але без обмеження, п-азидофенілаланіном, відповідно.

[206] П'ятичленний цикл, який є результатом реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена, як правило, не є оборотним у відновних середовищах і є стійким проти гідролізу впродовж тривалих періодів часу у водних середовищах. Унаслідок цього, за допомогою активних похідних поліетиленгліколю за цим винаходом, за необхідних водних умов можуть бути модифіковані фізичні та хімічні характеристики найрізноманітніших речовин. Ще більш важливим є те, що, оскільки азидні та ацетиленові складові є специфічними одна до одної (і не реагують, наприклад, із жодною з 20 звичайних генетично закодованих амінокислот), білки можна модифікувати на одному або декількох специфічних сайтах із надзвичайно високою селективністю.

[207] Цей винахід пропонує також водорозчинні та гідролітично стабільні похідні похідних поліетиленгліколю та споріднених гідрофільних полімерів, які мають одну або декілька ацетиленових або азидних складових. Похідні полімеру поліетиленгліколю, які містять ацетиленові складові, є високоселективними для сполучення з азидними складовими, які були селективно введені до білків у відповідь на селекторний кодон. Подібним чином, похідні полімеру поліетиленгліколю, які містять азидні складові, є високоселективними для сполучення з ацетиленовими складовими, які були селективно введені до білків у відповідь на селекторний кодон.

[208] Конкретніше, до азидних складових належать, але без обмеження ними, алкілазиди, арилазиди та похідні цих азидів. Похідні алкіл- та арилазидів можуть включати інші замісники доти, доки зберігається ацетилен-специфічна реакційна здатність. Ацетиленові складові включають алкіл- та арилацетилені і похідні кожного з них. Похідні алкіл- та арилацетиленів можуть включати інші замісники доти, доки зберігається азид-специфічна реакційна здатність.

[209] Цей винахід пропонує кон'югати речовин, які мають цілий ряд функціональних груп, замісників або складових, з іншими речовинами, у тому числі, але без обмеження, гідроксіалілкрохмалем (HAS), гідроксіетилкрохмалем (HES), міткою, барвником, полімером, водорозчинним полімером, похідною поліетиленгліколю, фотозшивальним агентом, радіонуклідом, цитотоксичною сполукою, лікарською речовиною, афінною міткою, фотоафінною міткою, реакційноздатною сполукою, смолою, другим білком або поліпептидом чи аналогом поліпептиду, антитілом або фрагментом антитіла, металохелатом, кофактором, жирною кислотою, вуглеводом, полінуклеотидом, ДНК, РНК, антисмисловим полінуклеотидом, сахаридом, водорозчинним дендримером, циклодекстрином, інгібувальною рибонуклеїною кислотою, біоматеріалом, наночастинкою, спіноюю міткою, флуорофором, металовмісною складовою, радіоактивною складовою, новою функціональною групою, групою, яка ковалентно або нековалентно взаємодіє з іншими молекулами, фотореактивною складовою, групою, яка збуджується фотохімічноактивним випроміненням, складовою, здатною до фотоізомеризації, біотином, похідною біотину, аналогом біотину, складовою, яка містить важкий атом, хімічно розщеплюваною групою, фоторозщеплюваною групою, подовженим бічним ланцюгом, цукром, приєднаним до атома вуглецю, окиснювально-відновлювальним засобом, тіоамінокислотою, токсичною складовою, складовою, міченою радіоактивною міткою, біофізичним зондом, фосфоресцентною групою, хемілюмінесцентною групою, групою з високою електронною густиною, магнітною групою, інтеркаляційною групою, хромофором, енергопередавальним засобом, біологічно активним засобом, виявною міткою, невеликою молекулою, квантовою точкою, нанопередавачем, радіонуклеотидом, радіопередавачем, нейтронзахватною речовиною або будь-якою комбінацією вищенаведеного або будь-якої іншою необхідною сполукою або речовиною. Цей винахід також включає кон'югати речовин, які мають азидні або ацетиленові складові з похідними полімеру PEG, які мають відповідні ацетиленові або азидні складові. Наприклад, полімер поліетилену, який містить азидну складову, можна сполучати з біологічно активною молекулою у положенні білка, який містить негенетично закодовану амінокислоту, яка несе ацетиленову функціональну групу. Зв'язок, за допомогою якого сполучаються поліетиленгліколь та біологічно активна молекула, включає (але без обмеження ним) продукт реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена.

[210] У цій галузі добре відомо, що поліетиленгліколь можна застосовувати для модифікування поверхонь біоматеріалів (дивись, наприклад, патент США № 6,610,281; Mehvar R., J. Pharm. Pharm. Sci., 3(1):125-136 (2000), які включені до цього опису шляхом посилання). Цей винахід також включає біоматеріали, які мають поверхню, на якій знаходиться одна або декілька реакційноздатних азидних або ацетиленових ділянок та один або декілька азид- або ацетиленвмісних полімерів за цим винаходом, сполучених із поверхнею за допомогою

зв'язку, який одержали в результаті реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена. Біоматеріали та інші речовини можуть також зв'язуватись з азид- або ацетиленактивованими похідними полімеру за допомогою іншого зв'язку, аніж азидний або ацетиленовий зв'язок, наприклад, за допомогою зв'язку, який містить карбоновокислотну, аміно-, спиртову або тіолову групу, залишаючи азидну або ацетиленову складову доступною для подальших реакцій.

[211] Цей винахід включає спосіб синтезування азид- або ацетиленвмісних полімерів за цим винаходом. У разі азидвмісної похідної поліетиленгліколю, азид може зв'язуватись безпосередньо з атомом вуглецю згаданого полімеру. Альтернативно азидвмісну похідну поліетиленгліколю можна одержати шляхом приєднання сполучного агента, яка має азидну складову на одному кінці, до традиційно активованого полімеру, так що одержаний в результаті полімер має азидну складову на своєму кінці. У разі ацетиленвмісної похідної поліетиленгліколю, ацетилен може зв'язуватись безпосередньо з атомом вуглецю згаданого полімеру. Альтернативно ацетиленвмісну похідну поліетиленгліколю можна одержати шляхом приєднання сполучного агента, який має ацетиленову складову на одному кінці, до традиційно активованого полімеру, так що одержаний в результаті полімер має ацетиленову складову на своєму кінці.

[212] Конкретніше, у разі азидвмісної похідної поліетиленгліколю, водорозчинний полімер, який має щонайменше одну активну гідроксильну складову, піддають реакції з одержанням заміщеного полімеру, який має у своєму складі більш реакційноздатну складову, таку як мезилатна, трезилатна, тозилатна або галогенова відщеплювана група. Фахівцям у цій галузі є відомими способи одержання та застосування похідних поліетиленгліколю, які містять галогенангідриди сульфокислоти, атоми галогену та інші відщеплювані групи. У подальшому, одержаний заміщений полімер піддають реакції із заміщення азидної складової на кінці полімеру на більш реакційноздатну складову. Альтернативно водорозчинний полімер, який має щонайменше одну активну нуклеофільну або електрофільну складову, піддають реакції із сполучним агентом, який має азид на одному кінці, завдяки чому ковалентний зв'язок утворюється між полімером поліетиленгліколю та сполучним агентом, і азидна складова розміщується на кінці полімеру. Фахівцям у цій галузі відомі нуклеофільні та електрофільні складові, у тому числі аміни, тіоли, гідразиди, гідразини, спирти, карбоксилати, альдегіди, кетони, складні тіоефіри тощо.

[213] Конкретніше, у разі ацетиленвмісної похідної поліетиленгліколю, водорозчинний полімер, який має щонайменше одну активну гідроксильну складову, піддають реакції із заміщення галогену або іншої активованої відщеплюваної групи у попереднику, який містить ацетиленову складову. Альтернативно водорозчинний полімер, який має щонайменше одну активну нуклеофільну або електрофільну складову, піддають реакції зі сполучним агентом, який має ацетилен на одному кінці, так що ковалентний зв'язок утворюється між полімером поліетиленгліколю та сполучним агентом, і ацетиленова складова розміщується на кінці полімеру. Фахівцям у цій галузі добре відомо застосування галогенових складових, активованої відщеплюваної групи, нуклеофільних та електрофільних складових у контексті органічного синтезу та одержання і застосування похідних поліетиленгліколю.

[214] Цей винахід також пропонує спосіб селективної модифікації білків шляхом приєднання інших речовин до модифікованого білка, у тому числі, але без обмеження, водорозчинних полімерів, таких як поліетилен та похідні поліетилену, які містять азидну або ацетиленову складову. Азид- та ацетиленвмісні похідні поліетиленгліколю можуть застосовуватись для модифікування властивостей поверхонь та молекул, де важливим фактором є біосумісність, стабільність, розчинність та відсутність імуногенності, з одночасним забезпеченням більш селективних засобів приєднання похідних поліетиленгліколю до білків, аніж ті, які були раніше відомими у цій галузі.

## II. Бичачий GCSF

[215] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можуть застосовуватись для зменшення інтенсивності симптомів або запобігання інфекцій у тварин. Фахівцю у цій галузі відомі біологічні активності, а також аналізи для визначення характеристик біологічних активностей бичачого та людського G-CSF. Фахівцю у цій галузі відомі аналізи з визначення кількості нейтрофілів та їх функції.

## III Загальні методи рекомбінантних нуклеїнових кислот для застосування за цим винаходом

[216] У численних варіантах здійснення цього винаходу нуклеїнові кислоти, які кодуєть поліпептид bG-CSF, який становить інтерес, будуть ізолюватись, клонуватись і часто змінюватись із застосуванням методів рекомбінантних ДНК. Такі варіанти здійснення застосовують, у тому числі, але без обмеження, для експресії білків або під час одержання варіантів, похідних, полігенних експресійних кластерів або інших послідовностей, які одержують



із поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу послідовності, які кодують поліпептиди за цим винаходом, є функціонально зв'язаними з гетерологічним промотором. Ізоляція hG-CSF та продукування G-CSF у клітинах-хазяях описані, наприклад, у патентах США № 4,810,643; № 4,999,291; № 5,580,755 та № 6,716,606, які включені до цього опису шляхом посилання.

[217] Нуклеотидна послідовність, яка кодує поліпептид bG-CSF, що містить штучно закодовану амінокислоту, може бути синтезована на основі амінокислотної послідовності вихідного поліпептиду, у тому числі, але без обмеження, такого, який має амінокислотну послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 1, 2, з подальшою зміною нуклеотидної послідовності, щоб здійснити введення (тобто інкорпорацію або заміну) чи видалення (тобто делецію або заміну) відповідного(-их) амінокислотного(-их) залишку(-ів). Згадана нуклеотидна послідовність може бути відповідним чином модифікована шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за традиційними методами. Альтернативно нуклеотидну послідовність можна одержати шляхом хімічного синтезу, у тому числі, але без обмеження, із застосуванням синтезатора олігонуклеотидів, де олігонуклеотиди конструюють на основі амінокислотної послідовності необхідного поліпептиду, і за варіантом, якому віддається перевага, з вибиранням тих кодонів, які є прийнятними для клітина-хазяїна, у якій буде продукуватись рекомбінантний поліпептид. Наприклад, декілька невеликих олігонуклеотидів, які кодують частини бажаного поліпептиду, можуть бути синтезовані та складені за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, шляхом лігування або за допомогою лігазної ланцюгової реакції. Дивись, наприклад, Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); патент США № 6,521,427, які включені до цього опису шляхом посилання.

[218] Цей винахід застосовує загальноприйняті методи у галузі рекомбінантних генетичних структур. До основних текстів, які розкривають загальні методи, що застосовуються у цьому винаході, належать Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); та *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)).

[219] До загальних текстів, які описують методи молекулярної біології, належать Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 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") та *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) ("Ausubel")*). Ці тексти описують мутагенез, застосування векторів, промоторів та багато інших відповідних тем, які стосуються цієї проблеми, у тому числі, але без обмеження, одержання генів полінуклеотидів, які містять селекторні кодони для продукування білків, які включають штучні амінокислоти, ортогональні tРНК, ортогональні синтетази та їх пари.

[220] Мутагенез різних типів застосовують у цьому винаході з різними цілями, у тому числі, але без обмеження, для продукування нових синтетаз або tРНК, мутування молекул tРНК, мутування полінуклеотидів, які кодують синтетази, для продукування бібліотек tРНК, для продукування бібліотек синтетаз, для продукування селекторних кодонів, для введення селекторних кодонів, які кодують штучні амінокислоти, до білка або поліпептиду, який становить інтерес. Мутагенез різних типів включає, але ними не обмежується, сайт-спрямований мутагенез, неспецифічний мутагенез, гомологічну рекомбінацію, перемішування ДНК або інші методи рекурсивного мутагенезу, конструювання химер, мутагенез із застосуванням матриць, які містять урацил, олігонуклеотид-спрямований мутагенез, мутагенез ДНК, модифікованих фосфоротіоатом, мутагенез із застосуванням "розірваної" дволанцюгової ДНК тощо, РСТ-опосередкований мутагенез або будь-яку їх комбінацію. Додаткові відповідні методи включають репарацію помилково спарованих основ, мутагенез із застосуванням штамів-хазяїв із недостатністю репараційного синтезу ДНК, рестрикцію-добір і рестрикцію-очищення, делеційний мутагенез, мутагенез методом повного синтезу генів, репарацію дволанцюгового розриву тощо. Методи мутагенезу, у тому числі, але без обмеження, такі, які включають химерні генно-інженерні конструкції, також охоплені цим винаходом. У одному з варіантів здійснення цього винаходу при здійсненні мутагенезу можна керуватись відомою інформацією про природну молекулу або змінену чи мутовану природну молекулу, у тому числі, але без обмеження, послідовність, порівняння послідовностей, фізичні властивості, вторинну, третинну або четвертинну структуру, кристалічну структуру тощо.

[221] Наведені у цьому описі тексти та приклади описують ці процедури. Додаткову інформацію можна знайти у наведених нижче публікаціях та посиланнях, які цитуються у: 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 synthesis 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); Grundström 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); та I.A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-3068 (1995). Додаткові подробиці стосовно багатьох із вищенаведених методів можна знайти у *Methods in Enzymology Volume 154*, де також описані корисні контролі для виявлення проблем, пов'язаних із різними методами мутагенезу.

[222] Олігонуклеотиди, наприклад, для застосування у методах мутагенезу за цим винаходом, наприклад, для мутування бібліотек синтетаз або зміни тРНК, синтезують, як правило, хімічним шляхом у реакції із фосфорамідитом з одержанням складного триєфіру за схемою твердофазного синтезу, описаною Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981), наприклад, із застосуванням автоматизованого синтезатора як описано у Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168 (1984).

[223] Цей винахід також стосується еукаріотних клітин-хазяїв, нееукаріотних клітин-хазяїв та організмів для in vivo введення штучної амінокислоти за допомогою пар ортогональна тРНК/RS. Клітини-хазяї генетично конструюють (у тому числі, але без обмеження, трансформують, трансдукують або трансфікують) з полінуклеотидами за цим винаходом або генно-інженерними

конструкціями, які містять полінуклеотид за цим винаходом, у тому числі, але без обмеження, вектор за цим винаходом, який може бути, наприклад, клонувальним вектором або експресійним вектором. Наприклад, кодувальні ділянки для ортогональної тРНК, ортогональної тРНК-синтази та білка, який підлягає дериватизації, є функціонально зв'язаними з

5 контрольними елементами експресії гена, які функціонують у необхідній клітині-хазяїні. Згаданий вектор може бути, наприклад, у формі плазміди, косміди, фага, бактерії, вірусу, "голого" полінуклеотиду або кон'югованого полінуклеотиду. Згадані вектори вводять до клітин та/або мікроорганізмів стандартними методами, у тому числі шляхом електропорації (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)), інфікування векторами на основі вірусного

10 геному, високошвидкісного балістичного проникнення дрібних частинок із нуклеїновою кислотою у межах матриці з невеликих кульок чи частинок або на поверхні (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)) та/або подібними методами. До методів, прийнятних для перенесення нуклеїнової кислоти до клітин *in vitro* належать застосування ліпосом, мікроін'єкції, злиття клітин, DEAE (діетиламіноетил)-декстран, метод фракціонування фосфатом кальцію тощо. До *in vivo* методів

15 перенесення генів належать, але без обмеження ними, трансфекція векторами на основі вірусного геному (як правило, ретровірусного) та опосередкована ліпосомами трансфекція білком вірусної оболонки [Dzau et al., Trends in Biotechnology 11:205-210 (1993)]. У деяких випадках може виникнути необхідність надання джерела нуклеїнових кислот з агентом, який спрямовується на клітини-мішені, таким як антитіло, специфічне для поверхневого білка

20 клітинної мембрани або клітини-мішені, ліганд для рецептора на клітині-мішені тощо. У разі застосування ліпосом, білки, які зв'язуються з поверхневим білком клітинної мембрани, яка асоціюється з ендоцитозом, можуть застосовуватись для спрямованого досягнення та/або полегшення захоплення, наприклад, капсидні білки або їх фрагменти, тропні до клітин конкретного типу, антитіла проти білків, які зазнають інтерналізації під час мітотичного циклу,

25 білки, які спрямовуються на внутрішньоклітинну локалізацію та підвищують напівперіод внутрішньоклітинного існування.

[224] Сконструйовані клітини-хазяї можна культивувати у традиційних живильних середовищах, відповідним чином модифікованих для таких активностей, як, наприклад, стадії

30 скринінгу, активація промоторів або добір трансформантів. Ці клітини факультативно можна культивувати у трансгенних організмах. Іншими корисними літературними джерелами, у тому числі, але без обмеження, для ізоляції та культивування клітин (наприклад, для подальшої ізоляції нуклеїнових кислот) є Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York та посилання, які наводяться у цій роботі; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY;

35 Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) та Atlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

[225] Доступними є декілька добре відомих методів введення цільових нуклеїнових кислот до клітин; будь-який з них може бути застосованим у цьому винаході. До цих методів належать:

40 злиття клітин-реципієнтів із бактеріальними протопластами, які містять ДНК, електропорація, "бомбардування" частинками та інфікування векторами на основі вірусного геному (подальше обговорення нижче) тощо. Бактеріальні клітини можуть застосовуватись для ампліфікації кількості плазмід, які містять генно-інженерні конструкції (векторну ДНК, яка несе клоновані послідовності необхідного гена) за цим винаходом. Бактерії культивують до досягнення log-

45 фази (стадія експоненційного накопичення), і плазміди, які знаходяться у бактеріях, можна ізолювати різноманітними методами, відомими у цій галузі (дивись, наприклад, Sambrook). Крім того, наявними на ринку є набори для очищення плазмід із бактерій (дивись, наприклад, EasyPrep™, FlexiPrep™, обидва від компанії Pharmacia Biotech; StrataClean™ від компанії Stratagene; та QIAprep™ від компанії Qiagen). Ізольовані та очищені плазміди зазнають

50 подальшого маніпулювання з одержанням інших плазмід, які застосовують для трансфікування клітин або введення до відповідних векторів для інфікування організмів. Типові вектори містять термінатори транскрипції та трансляції, послідовності, які ініціюють транскрипцію та трансляцію, та промотори, придатні для регулювання експресії конкретної цільової нуклеїнової кислоти. Вектори факультативно містять характерні для даного роду полігенні експресійні кластери, які

55 містять щонайменше один термінатор, послідовності, які надають можливість реплікації кластеру у еукаріотах чи прокаріотах або у обох (у тому числі, але без обмеження, "човникові" вектори) та селекційні маркери як для прокаріотних, так і для еукаріотних систем. Вектори є придатними для реплікації та інтеграції до прокаріот, еукаріот або обох. Дивись, 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 (всі згадані вище). Каталог бактерій та

60

бактеріофагів, придатних для клонування, надається, наприклад, ATCC (Американська колекція типових культур), наприклад, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds), опублікований ATCC. Додаткові основні процедури секвенування, клонування, інформацію з інших аспектів молекулярної біології та першопричинні теоретичні міркування можна також знайти у Watson et al. (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. Крім того, по суті будь-яка нуклеїнова кислота (і фактично будь-яка мічена нуклеїнова кислота, стандартна чи нестандартна) може бути замовлена за індивідуальним замовленням або стандартним шляхом у будь-якому з цілого ряду комерційних джерел, наприклад, у компанії Midland Certified Reagent Company (Midland, штат Техас, адреса інтернет-сайту: mcrc.com), компанії The Great American Gene Company (Ramona, штат Каліфорнія, адреса інтернет-сайту: genco.com), компанії ExpressGen Inc. (Chicago, штат Іллінойс, адреса інтернет-сайту: expressgen.com), компанії Operon Technologies Inc. (Alameda, штат Каліфорнія) та багатьох інших.

#### Селекторні кодони

[226] Селекторні кодони за цим винаходом розширюють рамки генетичних кодонів механізму біосинтезу білків. Наприклад, селекторний кодон включає, але ними не обмежується, унікальний триосновний кодон, нонсенс кодон, такий як стоп-кодон, у тому числі, але без обмеження, амбер-кодон (UAG), охра-кодон або опал-кодон (UGA), штучний кодон, чотири- або більше основний кодон, рідкісний кодон тощо. Фахівцям у цій галузі очевидним є існування численних селекторних кодонів, які можуть бути введені до необхідного гена або полінуклеотиду, у тому числі, але без обмеження, один або більше, два або більше, три або більше, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше, до одного полінуклеотиду, який кодує принаймні частину поліпептиду bG-CSF.

[227] У одному з варіантів здійснення цього винаходу згадані способи включають застосування селекторного кодону, який являє собою стоп-кодон, для введення однієї або декількох штучних амінокислот *in vivo*. Наприклад, продукують О-тРНК, який розпізнає стоп-кодон, у тому числі, але без обмеження, UAG, і аміноацилюють за допомогою О-RS бажаною штучною амінокислотою. Ця О-тРНК не розпізнається природними аміноацил-тРНК-синтетазами хазяїна. Традиційний сайт-спрямований мутагенез можна застосовувати для введення стоп-кодону, у тому числі, але без обмеження, TAG, на ділянку, яка становить інтерес, у поліпептид, який становить інтерес. Дивись, наприклад, Sayers J.R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 16:791-802. Коли О-RS, О-тРНК та нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид, який становить інтерес, об'єднують *in vivo*, штучну амінокислоту вводять у відповідь на кодон UAG з одержанням поліпептиду, який містить штучну амінокислоту у визначеному положенні.

[228] Введення штучних амінокислот *in vivo* можна здійснювати без значного збурювання еукаріотної клітини-хазяїна. Наприклад, оскільки ефективність супресії кодону UAG залежить від конкуренції між О-тРНК, у тому числі, але без обмеження, амбер-супресором (супресорна тРНК, яка пригнічує амбермутацію) та еукаріотним релізінг-фактором (у тому числі, але без обмеження, eRF) (який зв'язується із стоп-кодоном та ініціює виділення гормону росту з рибосоми), ефективність супресії можна модулювати, у тому числі, але без обмеження, підвищенням рівня експресії О-тРНК та/або супресорної тРНК.

[229] Штучні амінокислоти можна також кодувати рідкісними кодонами. Наприклад, у разі, коли концентрація аргініну у процесі реакції синтезу білка *in vitro* знижується, виявилось, що рідкісний кодон аргініну, AGG, ефективно забезпечує введення Ala за допомогою синтетичної тРНК, ацилованої аланіном. Дивись, наприклад, Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993). У цьому випадку синтетична тРНК конкурує з природною тРНКArg, яка існує як мінорний різновид у *Escherichia coli*. Деякі організми не використовують усі триплетні кодони. Невизначений кодон AGA у *Micrococcus luteus* застосовували для введення амінокислот у *in vitro* транскрипційному/трансляційному екстракті. Дивись, наприклад, Kowal and Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997). Для застосування цих рідкісних кодонів *in vivo* можна продукувати складові частини цього винаходу.

[230] Селекторні кодони включають також подовжені кодони, у тому числі, але без обмеження, чотири- або більше основні кодони, наприклад, чотири-, п'яти-, шести- або більше основні кодони. До прикладів чотириосновних кодонів належать, але без обмеження ними, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU тощо. До прикладів п'ятиосновних кодонів належать, але без обмеження ними, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC тощо. Відмітною ознакою цього винаходу є застосування подовжених кодонів на основі супресії зсуву рамки. Чотири- або більше основні кодони можуть вводити, у тому числі, але без обмеження, одну або більше штучних амінокислот у той самий білок. Наприклад, у присутності мутованих О-тРНК, у тому числі, але без обмеження, спеціальних супресорних тРНК зсуву рамки, з антикодоновими

петлями, наприклад, з антикодоновими петлями щонайменше з 8-10 нуклеотидних залишків, чотири- або більше основний кодон зчитується як одна амінокислота. У інших варіантах здійснення цього винаходу антикодонові петлі можуть декодувати, у тому числі, але без обмеження, щонайменше чотириосновний кодон, щонайменше п'ятиосновний кодон або щонайменше шестиосновний кодон або більше. Оскільки існує 256 можливих чотириосновних кодонів, численні штучні амінокислоти можуть бути закодовані в одній клітині із застосуванням чотири- або більше основного кодону. Дивись, Anderson et al., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the 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.

[231] Наприклад, чотириосновні кодони застосовували для введення штучних амінокислот до білків із застосуванням *in vitro* біосинтетичних методів. Дивись, наприклад, Ma et al., (1993) Biochemistry, 32:7939; та Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34. CGGG та AGGU застосовували для одночасного введення 2-нафтилаланіну та NBD (нітробензоксадіазол) похідної лізину до стрептавідину *in vitro* з двома хімічно ацилованими супресорними tPHK зсуву рамки. Дивись, Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194. При проведенні дослідження *in vivo*, Moore et al. перевірили здатність похідних tRNA<sup>Leu</sup> з антикодонами NCUA до супресії кодонів UAGN (N може бути U, A, G або C) і встановили, що квадруплет UAGA може бути декодованим tPHK<sup>Leu</sup> з антикодоном UCUA з ефективністю від 13 % до 26 % з незначним декодуванням у рамці 0 або -1. Дивись, Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195. У одному з варіантів здійснення цього винаходу можна застосовувати подовжені кодони на основі рідкісних кодонів або нонсенс кодонів, які можуть зменшити прочитування міссенс-мутацій та супресію зсуву рамки на інших небажаних сайтах.

[232] Для певної системи, селекторний кодон може також включати один із природних триосновних кодонів, де ендегенна система не застосовує (або рідко застосовує) кодон із природними основами. Наприклад, цей винахід охоплює систему, якій бракує tPHK, яка розпізнає природний триосновний кодон та/або систему, в якій триосновний кодон є рідкісним кодоном.

[233] Селекторні кодони факультативно включають штучні пари нуклеотидів. Ці штучні пари додатково розширюють існуючий генетичний алфавіт. Одна зайва пара нуклеотидів збільшує кількість триплетних кодонів з 64 до 125. Властивості триосновних пар включають стабільне та селективне парування основ, ефективне ферментативне включення до ДНК із високою надійністю за допомогою полімерази та ефективне подовження праймера після синтезу утвореної штучної пари нуклеотидів. Опис штучних пар нуклеотидів, які можуть бути адаптовані для методів та композицій за цим винаходом, дивись, наприклад, у Hirao, et al., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182. Дивись також Wu Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630. Перелік інших публікацій, які стосуються цієї проблеми, дивись нижче.

[234] Для застосування *in vivo*, штучний нуклеозид є мембранопроникним і фосфорилується з одержанням відповідного трифосфату. Крім того, збільшена генетична інформація є стабільною і не руйнується клітинними ферментами. При проведенні попередніх досліджень, Benner та інші спробували використати перевагу інших схем водневих зв'язків, які відрізняються від зв'язків у канонічних парах Уотсона-Крика. Найбільш примітним прикладом стала пара ізо-С:ізо-Г. Дивись, наприклад, Switzer et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322; та Piccirilli et al., (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602. Ці основи, взагалі, до певної міри помилково паруються з природними основами і не можуть реплікуватись ферментативним шляхом. Kool та співробітники продемонстрували, що взаємодії між основами при гідрофобному пакуванні можуть замінити водневі зв'язки для стимулювання утворення пар нуклеотидів. Дивись Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602; та Guckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825. У спробі створення штучної пари основ, яка б задовольняла усі вищенаведені вимоги, Schultz, Romesberg та співробітники систематично синтезували та досліджували ряд штучних гідрофобних основ. Було встановлено, що аутопара PICS:PICS є більш стабільною, ніж природні пари основ, і може ефективно вводиться до ДНК за допомогою фрагмента Кленова ДНК-полімерази I Escherichia coli (KF). Дивись, наприклад, McMinin et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-11586; та Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274. Аутопару 3MN:3MN можна синтезувати за допомогою KF з ефективністю та селективністю, достатньою для біологічного функціонування. Дивись, наприклад, Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803. Обидві основи, однак, відіграють роль термінатора ланцюга для подальшої реплікації. Нещодавно була створена мутантна ДНК, яку можна застосовувати для реплікування аутопари PICS. Окрім того, можна реплікувати аутопару 7AI. Дивись, наприклад,

Tae et al., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439. Була розроблена також нова пара металовмісних основ, Dіpic:Py, яка утворює стабільну пару при зв'язуванні Cu(II). Дивись Meggers et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714. Оскільки характерною особливістю подовжених кодонів та штучних кодонів є ортогональність стосовно природних кодонів, цією перевагою можна скористатись у способах за цим винаходом для одержання для них ортогональних tРНК.

[235] Для введення штучної амінокислоти до бажаного поліпептиду можна вдались також до альтернативної системи трансляції. У альтернативній системі трансляції велика послідовність до гена вводиться, але у білок вона не транскрибується. Згадана послідовність містить структуру, яка відіграє роль репліки, за якою рибосома переплигує послідовність і відновлює трансляцію у низхідному напрямку відносно інсерційного сегменту.

[236] У певних варіантах здійснення цього винаходу білок або поліпептид, який становить інтерес (або його частина), за методами та/або композиціями за цим винаходом, кодується нуклеїновою кислотою. За типовим варіантом нуклеїнова кислота містить щонайменше один селекторний кодон, щонайменше два селекторні кодони, щонайменше три селекторні кодони, щонайменше чотири селекторні кодони, щонайменше п'ять селекторних кодонів, щонайменше шість селекторних кодонів, щонайменше сім селекторних кодонів, щонайменше вісім селекторних кодонів, щонайменше дев'ять селекторних кодонів, десять або більше селекторних кодонів.

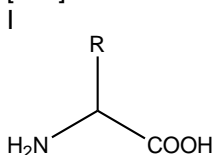
[237] Гени, що кодують білки або поліпептиди, які становлять інтерес, можуть піддаватись мутагенезу за допомогою методів, відомих фахівцю у цій галузі і описаних у цьому винаході, з включенням, наприклад, одного або декількох селекторних кодонів для введення штучної амінокислоти. Наприклад, нуклеїнова кислота для білка, який становить інтерес, зазнає мутагенезу з включенням одного або декількох селекторних кодонів із забезпеченням введення однієї або декількох штучних амінокислот. Цей винахід охоплює будь-який з таких варіантів, у тому числі, але без обмеження, мутант, варіанти будь-якого білка, наприклад, з включенням щонайменше однієї штучної амінокислоти. Подібним чином, цей винахід також охоплює відповідні нуклеїнові кислоти, тобто будь-яку нуклеїнову кислоту з одним або декількома селекторними кодонами, яка кодує одну або більше штучних амінокислот.

[238] Нуклеїновокислотні молекули, які кодують білок, який становить інтерес, такий як поліпептид bG-CSF, можна з легкістю піддавати мутації з введенням цистеїну у будь-яке бажане положення поліпептиду. Цистеїн широко застосовують для введення хімічно активних молекул, водорозчинних полімерів, білків або цілого ряду інших молекул до білка, який становить інтерес. Методи, прийнятні для введення цистеїну до бажаного положення поліпептиду, є відовими фахівцям у цій галузі, наприклад, методи, описані у патенті США № 6,608,183, включеному до цього опису шляхом посилання, та стандартні методи мутагенезу.

#### IV. Штучно закодовані амінокислоти

[239] Дуже велика кількість штучно закодованих амінокислот є придатною для застосування за цим винаходом. До поліпептиду bG-CSF може бути введена будь-яка кількість штучно закодованих амінокислот. Взагалі, введені штучно закодовані амінокислоти є по суті хімічно інертними по відношенню до 20 звичайних генетично закодованих амінокислот (тобто аланіну, аргініну, аспарагіну, аспарагінової кислоти, цистеїну, глутаміну, глутамінової кислоти, гліцину, гістидину, ізолейцину, лейцину, лізину, метіоніну, фенілаланіну, проліну, серину, треоніну, триптофану, тирозину та валіну). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодовані амінокислоти містять функціональні групи бічних ланцюгів, які ефективно та селективно реагують із функціональними групами, відсутніми у 20 звичайних амінокислот (у тому числі, але без обмеження, азидна, кетонна, альдегідна та амінооксигрупи) з утворенням стабільних кон'югатів. Наприклад, поліпептид bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, яка містить азидну функціональну групу, може реагувати з полімером (у тому числі, але без обмеження, з полі(етиленгліколем), або альтернативно з другим поліпептидом, який містить алкінову складову) з утворенням стабільного кон'югату, що є результатом селективної реакції азидної та алкінової функціональних груп з одержанням продукту реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена.

[240] Загальна структура альфа-амінокислоти ілюструється таким чином (Формула I):



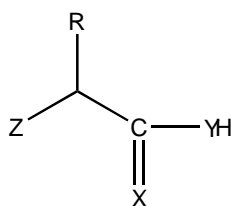
[241] Штучно закодованою амінокислотою є, як правило, будь-яка структура, яка має вищенаведену формулу, де R групою є будь-який замісник, окрім того, що застосовується у

двадцяти природних амінокислот, прийнята для застосування за цим винаходом. Оскільки штучно закодовані амінокислоти за цим винаходом, як правило, відрізняються від природних амінокислот лише за структурою бічного ланцюга, штучно закодовані амінокислоти утворюють амідні зв'язки з іншими амінокислотами, у тому числі, але без обмеження, природними або штучними, таким самим чином, яким вони утворюються у природних поліпептидів. Однак штучно закодовані амінокислоти мають групи бічного ланцюга, які відрізняють їх від природних амінокислот. Наприклад, R факультативно містить алкільну, арильну, ацильну, кето-, азидну, гідроксильну, гіdraзину, ціано-, гало-, гідразидну, алкенільну, алкінільну, ефірну, тіолову, селенову, сульфонільну, боратну, боронатну, фосфо-, фосфоно-, фосфінову, гетероциклічну, енонову, імінову, альдегідну, складноефірну, тіокислотну, гідроксиламінову, аміногрупу тощо або будь-яку їх комбінацію. До інших штучних амінокислот, які становлять інтерес, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, амінокислоти, які містять фотоактивований агент зшивання, амінокислоти, які містять спінову мітку, флуоресцентні амінокислоти, металозв'язувальні амінокислоти, металовмісні амінокислоти, радіоактивні амінокислоти, амінокислоти з новими функціональними групами, амінокислоти, які ковалентно або нековалентно взаємодіють з іншими молекулами, фотореактивні та/або фотоізомеризовані амінокислоти, амінокислоти, які містять біотин або аналог біотину, глікозиловані амінокислоти, такі як серин, заміщений на цукор, інші амінокислоти, модифіковані вуглеводами, кетовмісні амінокислоти, амінокислоти, які містять поліетиленгліколь або поліефір, амінокислоти із заміщеними важкими атомами, хімічно розщеплювані та/або фоторозщеплювані амінокислоти, амінокислоти з подовженими бічними ланцюгами, порівняно з природними амінокислотами, у тому числі, але без обмеження, поліефірами або довголанцюговими вуглеводнями, у тому числі, але без обмеження, більшими за приблизно 5 атомів вуглецю або більшими за приблизно 10 атомів вуглецю, зв'язані вуглецем цукровмісні амінокислоти, відновноактивні амінокислоти, амінокислоти, які містять тіоамінокислоти, та амінокислоти, які містять одну або декілька токсичних складових.

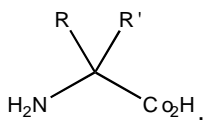
[242] До прикладів штучно закодованих амінокислот, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом і які є прийнятними для реагування з водорозчинними полімерами, належать, але без обмеження ними, амінокислоти з карбонільними, аміноокси-, гіdraзиновими, гіdraзидними, семікарбазидними, азидними та алкіновими реакційноздатними групами. В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодовані амінокислоти містять сахаридну складову. До прикладів таких амінокислот належать N-ацетил-L-глюкозамініл-L-серин, N-ацетил-L-галактозамініл-L-серин, N-ацетил-L-глюкозамініл-L-треонін, N-ацетил-L-глюкозамініл-L-аспарагін та O-манозамініл-L-серин. До прикладів таких амінокислот також належать приклади, де природний N- або O-зв'язок між амінокислотою та сахаридом замінюють на ковалентний зв'язок, який рідко зустрічається за природних умов – у тому числі, але без обмеження, алкен, оксим, тіоефір, амід тощо. До прикладів таких амінокислот також належать сахариди, що рідко зустрічається у природних білків, такі як 2-дезоксигалактоза тощо.

[243] Багато зі штучно закодованих кислот, наведених у цьому описі, є комерційно доступними, наприклад, від компанії Sigma-Aldrich (St. Louis, штат Міссурі, США), від компанії Novabiochem (підрозділ компанії EMD Biosciences, Darmstadt, Германія) або від компанії Peptech (Burlington, штат Массачусетс, США). Комерційно недоступні амінокислоти факультативно можна синтезувати як зазначено у цьому описі або із застосуванням стандартних способів, відомих фахівцям у цій галузі. Методи органічного синтезу дивись, наприклад, у 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); та Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Дивись також патенти США № 7,045,337 та № 7,083,970, включені до цього опису шляхом посилання. Окрім штучних амінокислот, які містять нові бічні ланцюги, штучні амінокислоти, що можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, факультативно також містять модифіковані каркасні структури, у тому числі, але без обмеження, ілюстровані структурами Формули II та Формули III:

II



III



де Z, як правило, містить OH, NH<sub>2</sub>, SH, NH-R' або S-R'; X та Y, які можуть бути однаковими або різними, як правило, містять S або O, та R і R', які факультативно є однаковими або різними, як правило, вибирають з того самого переліку складових для R групи, наведеного вище для штучних амінокислот, які мають Формулу I, з включенням водню. Наприклад, штучні амінокислоти за цим винаходом факультативно містять заміни у аміногрупі або карбоксильній групі, як показано Формулами II та III. До штучних амінокислот цього типу належать, але без обмеження ними, α-оксикислоти, α-тіокислоти, α-амінотіокарбоксилати, у тому числі, але без обмеження, з бічними ланцюгами, які відповідають двадцяти звичайним природним амінокислотам або бічним ланцюгам штучних амінокислот. На додаток до цього, до заміни на α-вуглеці факультативно належать, але без обмеження ними, L, D, або α-α-дизаміщені амінокислоти, такі як D-глутамат, D-аланін, D-метил-О-тирозин, аміномасляну кислоту тощо. До інших структурних альтернативних варіантів належать циклічні амінокислоти, такі як аналоги проліну, а також 3-, 4-, 6-, 7-, 8- та 9-членні циклічні аналоги проліну, β- та γ-амінокислоти, такі як заміщений β-аланін та γ-аміномасляна кислота.

[244] Основу багатьох штучних амінокислот становлять природні амінокислоти, такі як тирозин, глутамін, фенілаланін тощо, і вони є прийнятними для застосування за цим винаходом. До аналогів тирозину належать, але без обмеження ними, пара-заміщені тирозини, орто-заміщені тирозини та мета-заміщені тирозини, де заміщений тирозин містить, у тому числі, але без обмеження, кетогрупу (у тому числі, але без обмеження, ацетильну групу), бензоїльну групу, аміногрупу, гідразин, гідроксіамін, тіолову групу, карбоксильну групу, ізопропілову групу, метильну групу, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-вуглеводень із прямим або розгалуженим ланцюгом, насичений або ненасичений вуглеводень, О-метильну групу, полієфірну групу, нітрогрупу, алкінільну групу тощо. Крім того, передбачаються також мультизаміщені арильні цикли. До аналогів глутаміну, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, α-гідроксильні похідні, γ-заміщені похідні, циклічні похідні та амідозаміщені похідні глутаміну. До прикладів аналогів фенілаланіну, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, пара-заміщені фенілаланіни, орто-заміщені фенілаланіни та мета-заміщені фенілаланіни, де замісник містить, у тому числі, але без обмеження, гідроксильну групу, метоксильну групу, метильну групу, алільну групу, альдегід, азидо-, йодо-, бром-, кетогрупу (у тому числі, але без обмеження, ацетильну групу), бензоїльну групу, алкінільну групу тощо. До конкретних прикладів штучних амінокислот, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, п-ацетил-L-фенілаланін, О-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланін, 3-метил-фенілаланін, О-4-аліл-L-тирозин, 4-пропіл-L-тирозин, три-О-ацетил-GlcNAcβ-серин, L-ДОФА, фторований фенілаланін, ізопропіл-L-фенілаланін, п-азидо-L-фенілаланін, п-ацил-L-фенілаланін, п-бензоіл-L-фенілаланін, L-фосфосерин, фосфосерин, фосфотирозин, п-йодо-фенілаланін, п-бромфенілаланін, п-аміно-L-фенілаланін, ізопропіл-L-фенілаланін та п-пропаргілоксифенілаланін тощо. Приклади структур ряду штучних амінокислот, які можуть бути прийнятними для застосування за цим винаходом, наведені, наприклад, у WO 2002/085923, що має назву "In vivo incorporation of unnatural amino acids". Додаткові аналоги метіоніну дивись також у публікації Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, включений до цього опису шляхом посилання. У PCT/US06/47822, що має назву "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides", яка включена до цього опису



шляхом посилання, описане гідроалкілювання ароматичних амінових складових, у тому числі, але без обмеження, п-амінофенілаланін, та гідроамінування.

[245] У одному з варіантів здійснення цього винаходу пропонуються композиції на основі поліпептиду bG-CSF, що містить штучну амінокислоту (наприклад, п-(пропаргілокси)фенілаланін). Пропонуються також різні композиції, які містять п-(пропаргілокси)фенілаланін, та білки та/або клітини, але без обмеження ними. За одним з аспектів, композиція, яка містить штучну амінокислоту, п-(пропаргілокси)фенілаланін, додатково містить ортогональну tРНК. Згадана штучна амінокислота може зв'язуватись (у тому числі, але без обмеження, ковалентно) з ортогональною tРНК, у тому числі, але без обмеження, ковалентно зв'язуватись з ортогональною tРНК за допомогою аміноацильного зв'язку, ковалентно зв'язуватись з 3'ОН або 2'ОН кінцевої цукрової групи, рибози, ортогональної tРНК тощо.

[246] Хімічні складові зі штучними амінокислотами, які можна вводити до складу білків, надають різноманітні переваги і можливості маніпулювання білками. Наприклад, унікальна реакційна здатність функціональної кетогрупи надає можливість селективного модифікування білків за допомогою будь-якого з цілого ряду гідразин- або гідроксиламіновмісних реактивів *in vitro* та *in vivo*. Штучну амінокислоту, яка містить важкий атом, можна, наприклад, застосовувати для фазування рентгеноструктурних даних. Сайт-специфічне введення важких атомів за допомогою штучних амінокислот також забезпечує селективність та гнучкість при виборі положень для важких атомів. Наприклад, фотореактивні штучні амінокислоти (у тому числі, але без обмеження, амінокислоти з бензофеноновими та арилазидними (у тому числі, але без обмеження, фенілазидними) бічними ланцюгами) надають можливість ефективного *in vivo* та *in vitro* фотозшивання білка. До прикладів фотореактивних штучних амінокислот належать, але без обмеження ними, п-азидофенілаланін та п-бензоілфенілаланін. Білок із фотореактивними штучними амінокислотами можна зшивати довільно шляхом збудження фотореактивної групи, яка забезпечує часовий контроль. За одним із прикладів, метильна група штучної амінокислоти може бути заміщена ізотопно міченою групою, у тому числі, але без обмеження, метильною групою, як зондом місцевої структури та динаміки, у тому числі, але без обмеження, у разі застосування ядерного магнітного резонансу або вібраційної спектроскопії. Алкінільна або азидна функціональні групи, наприклад, забезпечують можливість селективної модифікації білків із молекулами через реакцію [3+2]-циклоприєднання.

[247] Штучна амінокислота, введена до складу поліпептиду на амінокінці, може містити R групу, яка являє собою будь-який замісник, окрім того, який застосовується у двадцяти звичайних амінокислот, та другу реакційноздатну групу, яка відрізняється від NH<sub>2</sub> групи, яка, за нормальних умов, входить до складу α-амінокислот (дивись Формулу I). Подібну штучну амінокислоту можна вводити на карбоксильному кінці з другою реакційноздатною групою, яка відрізняється від COOH групи, яка, за нормальних умов, входить до складу α-амінокислот (дивись Формулу I).

[248] Штучні амінокислоти за цим винаходом можна вибирати або конструювати так, щоб забезпечувати додаткові характеристики, яких не мають двадцять звичайних амінокислот. Наприклад, штучну амінокислоту можна факультативно конструювати або вибирати так, щоб модифікувати біологічні властивості, наприклад, білка, до якого вона введена. Наприклад, наведені нижче властивості можуть факультативно модифікувати шляхом включення штучної амінокислоти до складу білка: токсичність, біологічний розподіл, розчинність, стабільність, наприклад, термічна, гідролітична, оксидативна, стійкість до ферментативного розкладу тощо, легкість очищення та обробки, структурні властивості, спектроскопічні властивості, хімічні та/або фотохімічні властивості, каталітична активність, відновний потенціал, період напіввиведення, здатність реагувати з іншими молекулами, наприклад, ковалентно або нековалентно тощо.

Структура та синтез штучних амінокислот: карбонільні, карбонільноподібні, замасковані карбонільні, захищені карбонільні групи та гідроксиламіногрупи

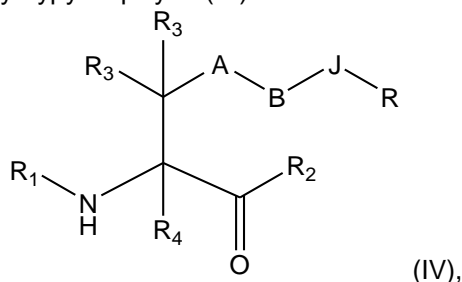
[249] В деяких варіантах здійснення цього винаходу запропонований bG-CSF, приєднаний до водорозчинного полімеру, наприклад, поліетиленгліколю, за допомогою оксимового зв'язку.

[250] Штучно закодовані амінокислоти багатьох типів є прийнятними для утворення оксимових зв'язків. До них належать, але без обмеження ними, штучно закодовані амінокислоти, які містять карбонільну, дикарбонільну або гідроксиламінову групу. Такі амінокислоти описані у патентних публікаціях США № 2006/0194256, № 2006/0217532 та № 2006/0217289 і WO 2006/069246, що має назву "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", які у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання. Опис штучно закодованих амінокислот наведений також у патенті

США № 7,083,970 та патенті США № 7,045,337, які у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання.

[251] В деяких варіантах здійснення цього винаходу застосовують поліпептиди bG-CSF, одне або декілька положень яких є заміненими на параацетилфенілаланінову амінокислоту. Синтез п-ацетил-(+/-)-фенілаланіну та м-ацетил-(+/-)-фенілаланіну описується у роботі Zhang Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), яку включено до цього опису шляхом посилання. Інші карбоніл- або дикарбонільні амінокислоти можуть бути подібним чином одержані фахівцем у цій галузі. Окрім того, необмежувальні приклади способів синтезу штучних амінокислот, що є включеними до цього опису, представлені на Фіг. 4, Фіг. 24-34 та Фіг. 36-39 патенту США № 7,083,970, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання.

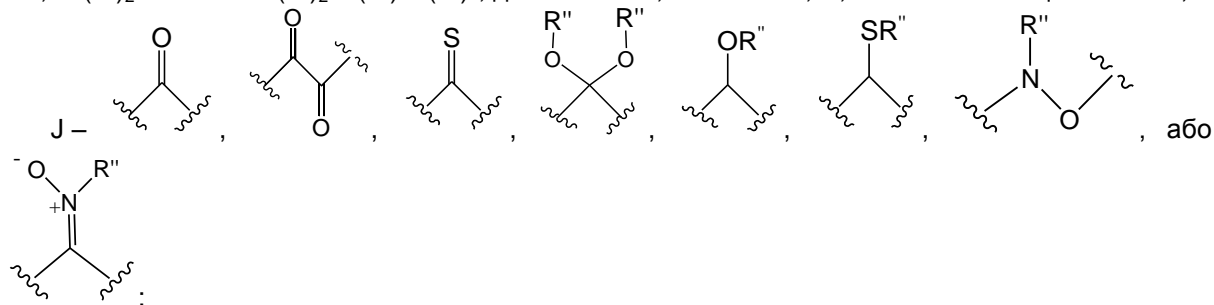
[252] Амінокислоти з електрофільними реакційноздатними групами дозволяють через ряд реакцій зв'язати молекули, за допомогою реакцій нуклеофільного приєднання, з іншими молекулами. Такі електрофільні реакційноздатні групи включають карбонільну групу (у тому числі, але без обмеження, кетогрупу та дикарбонільну групу), карбонільноподібну групу (реакційна здатність якої є подібною до реакційної здатності карбонільної групи (у тому числі, але без обмеження, кетогрупи та дикарбонільної групи) і яка структурно є подібною до карбонільної групи), замасковану карбонільну групу (яка може легко перетворюватись на карбонільну групу (у тому числі, але без обмеження, кетогрупу або дикарбонільну групу)) чи захищену карбонільну групу (реакційна здатність якої, у разі відщеплення захисної групи, є подібною до реакційної здатності карбонільної групи (у тому числі, але без обмеження, кетогрупи та дикарбонільної групи)). До таких амінокислот належать амінокислоти, які мають структуру Формули (IV):



де:

A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

B є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R', незалежно, H, алкіл або заміщений алкіл;



кожен з R" незалежно один від одного – H, алкіл, заміщений алкіл або захисна група; або, у разі присутності більше однієї R" групи, дві R" факультативно утворюють гетероциклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

5 R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

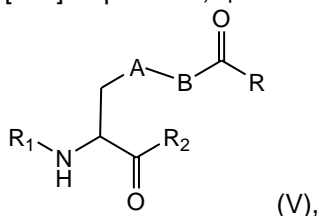
кожен з R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> незалежно один від одного являють собою H, галоген, нижчий алкіл або заміщений нижчий алкіл, чи R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> або дві R<sub>3</sub> групи факультативно утворюють циклоалкіл або гетероциклоалкіл;

10 або -A-B-J-R групи разом утворюють біциклічний або трициклічний циклоалкіл або гетероциклоалкіл, який містить щонайменше одну карбонільну групу, у тому числі дикарбонільну групу, захищену карбонільну групу, у тому числі захищену дикарбонільну групу, або замасковану карбонільну групу, у тому числі замасковану дикарбонільну групу;

15 або -J-R групи разом утворюють моноциклічний або біциклічний циклоалкіл чи гетероциклоалкіл, який містить щонайменше одну карбонільну групу, у тому числі дикарбонільну групу, захищену карбонільну групу, у тому числі захищену дикарбонільну групу, або замасковану карбонільну групу, у тому числі замасковану дикарбонільну групу;

20 за умови, що якщо A – фенілен, а кожен з R<sub>3</sub> – H, то B є присутнім; і якщо A – -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, а кожен з R<sub>3</sub> – H, то B не є -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; та якщо A та B відсутні, а кожен з R<sub>3</sub> – H, то R не є метилом.

[253] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (V):



де:

25 A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

30 B є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

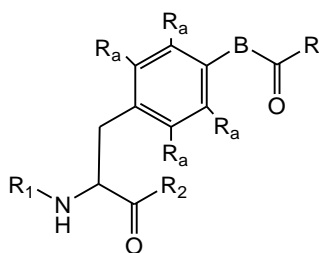
40 R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

45 R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

за умови, що якщо A – фенілен, то B є присутнім; і якщо A – -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, то B не є -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; та якщо A та B відсутні, то R не є метилом.

[254] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (VI):



(VI),

де:

В являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

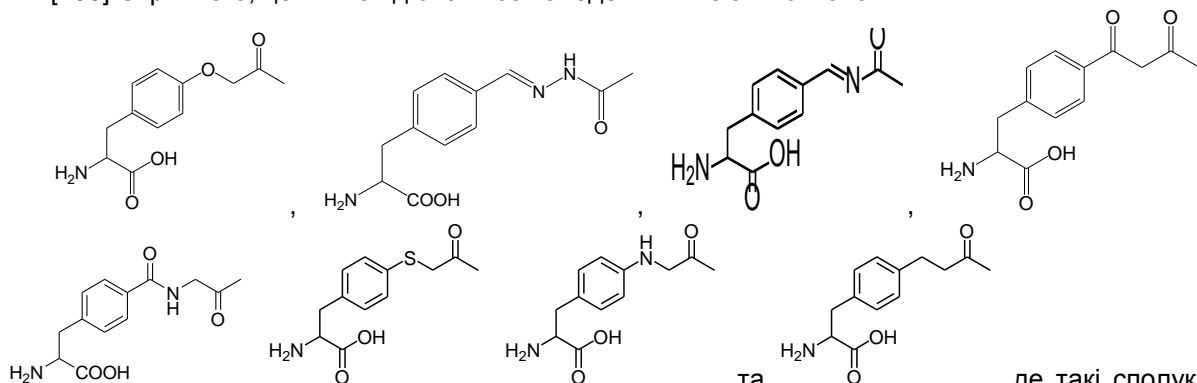
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

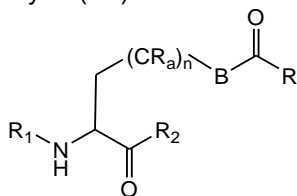
кожен з R<sub>a</sub> незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', де k – 1, 2 або 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR', and -S(O)<sub>k</sub>R', де кожен з R' незалежно являє собою H, алкіл або заміщений алкіл.

[255] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



де такі сполуки факультативно є амінозахищеними, карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот може бути включена до складу поліпептиду, яка містить штучну амінокислоту.

[256] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (VII):



(VII),

де:

В є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або

заміщений алкілен)-,  $-N(R')CO-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')C(O)N(R')$ ,  $-N(R')C(S)N(R')$ ,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N-$ ,  $-C(R')=N-N(R')$ ,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N-$  та  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ , де кожен з  $R'$  незалежно один від одного –  $H$ , алкіл або заміщений алкіл;

5  $R - H$ , алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

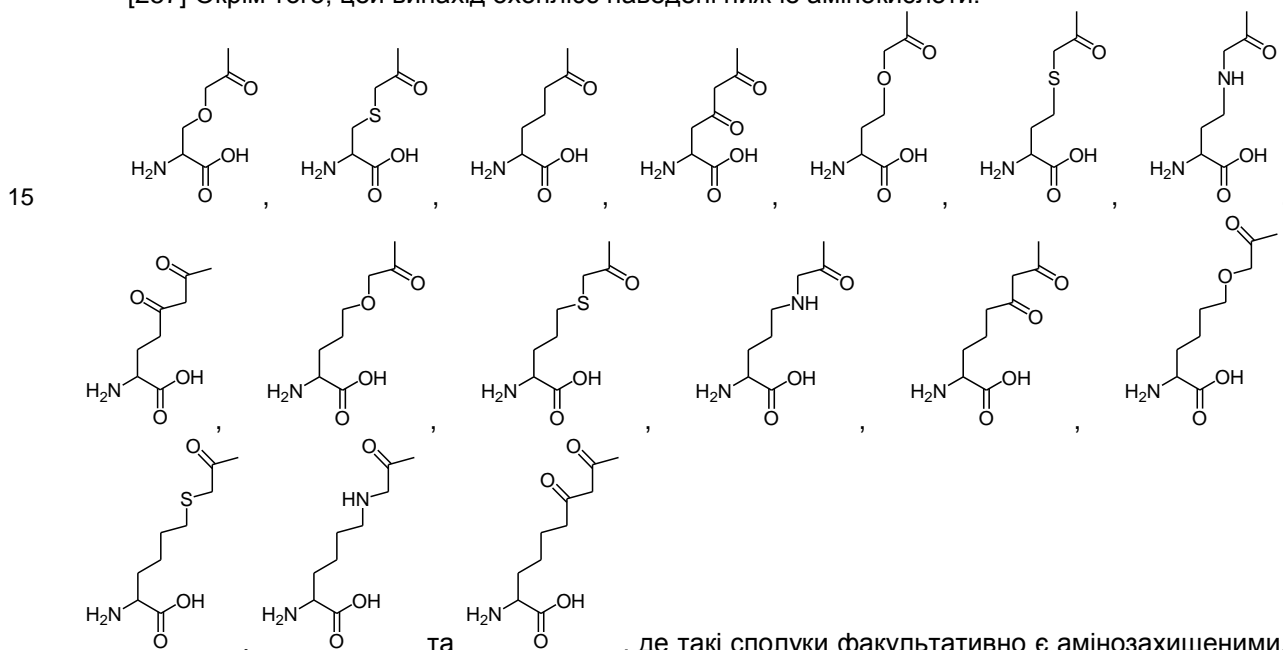
$R_1$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою  $H$ , амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

$R_2$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою  $OH$ , складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

10 кожен  $R_a$  незалежно вибраний з групи, яку складають  $H$ , галоген, алкіл, заміщений алкіл,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , де  $k - 1, 2$  або  $3$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  та  $-S(O)_kR'$ , де кожен  $R'$  незалежно один від одного –  $H$ , алкіл або заміщений алкіл; і  $n - \text{від } 0 \text{ до } 8$ ;

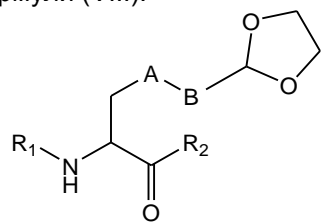
за умови, що якщо  $A - (CH_2)_4-$ , то  $B$  не є  $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ .

[257] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



20 де такі сполуки факультативно є амінозахищеними, факультативно карбоксилзахищеними, факультативно амінозахищеними та карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, ці штучні амінокислоти та будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот можуть бути включені до складу поліпептиду, який містить штучну амінокислоту.

[258] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (VIII):



(VIII),

25 де  $A$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

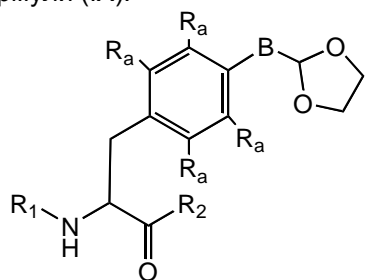
30  $B$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен,  $-O-$ ,  $-O-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-S-$ ,  $-S-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-S(O)_k-$ , де  $k - 1, 2$  або  $3$ ,  $-S(O)_k(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-N(R')$ ,  $-NR'-(\text{алкілен або заміщений алкілен})-$ ,  $-$

$C(O)N(R')$ -,  $-CON(R')$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-CSN(R')$ -,  $-CSN(R')$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-N(R')CO$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-N(R')C(O)O$ -,  $-S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')C(O)N(R')$ -,  $-N(R')C(S)N(R')$ -,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N$ -,  $-C(R')=N-N(R')$ -,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N$ - та  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, де кожен з  $R'$  незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

$R_1$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

$R_2$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид.

[259] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (IX):



(IX),

$B$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен,  $-O$ -,  $-O$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-S$ -,  $-S$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-S(O)_k$ -, де  $k$  – 1, 2 або 3,  $-S(O)_k$ (алкілен або заміщений алкілен)-,  $-C(O)$ -,  $-C(O)$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-C(S)$ -,  $-C(S)$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-N(R')$ -,  $-NR'$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-C(O)N(R')$ -,  $-CON(R')$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-CSN(R')$ -,  $-CSN(R')$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-N(R')CO$ -(алкілен або заміщений алкілен)-,  $-N(R')C(O)O$ -,  $-S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')C(O)N(R')$ -,  $-N(R')C(S)N(R')$ -,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ -,  $-N(R')-N=$ ,  $-C(R')=N$ -,  $-C(R')=N-N(R')$ -,  $-C(R')=N-N=$ ,  $-C(R')_2-N=N$ - та  $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, де кожен з  $R'$  незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

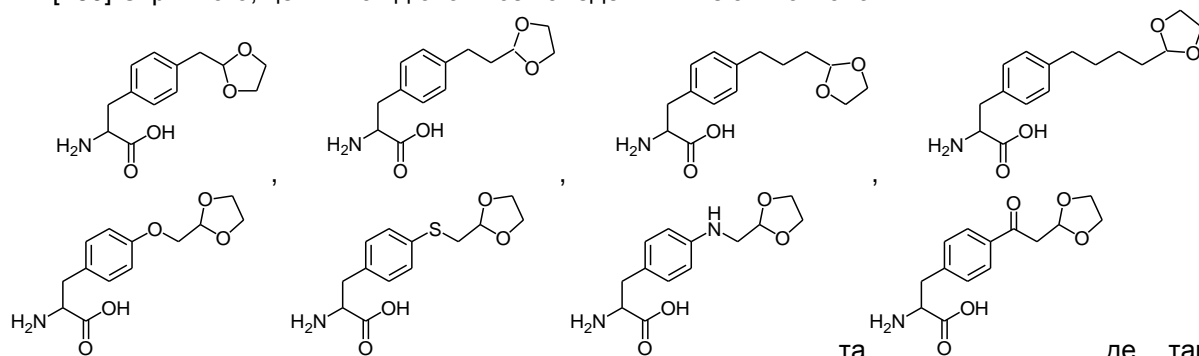
$R$  – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

$R_1$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

$R_2$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

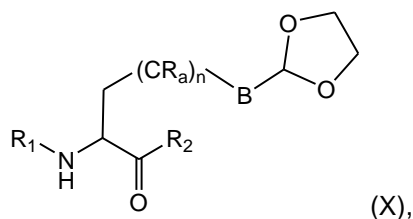
де кожен  $R_a$  незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , де  $k$  – 1, 2 або 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  та  $-S(O)_kR'$ , де кожен  $R'$  незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл.

[260] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



сполуки факультативно є амінозахищеними, факультативно карбоксилзахищеними, факультативно амінозахищеними та карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, ці штучні амінокислоти та будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот можуть бути включеними до складу поліпептиду, який містить штучну амінокислоту.

[261] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (X):



де:

В є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

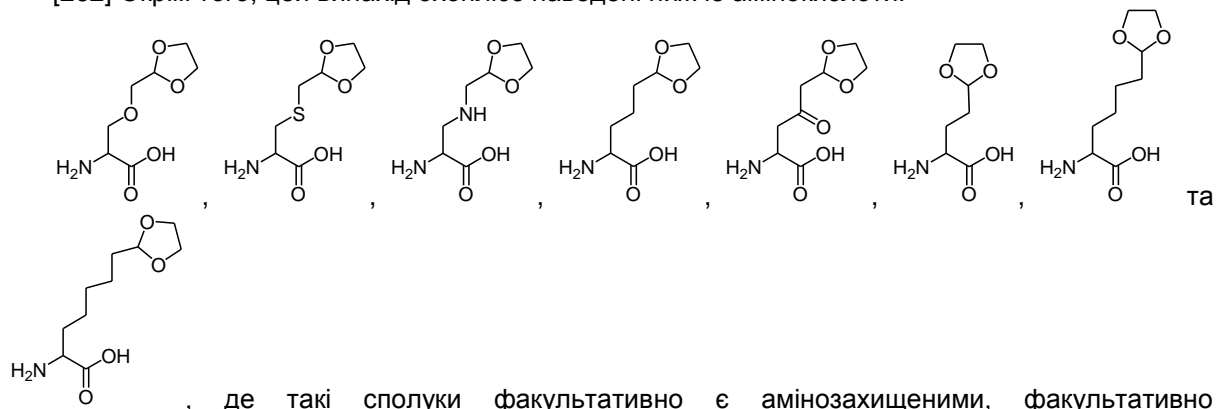
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

кожен R<sub>a</sub> незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', де k – 1, 2 або 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' та -S(O)<sub>k</sub>R', де кожен R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл; і n – від 0 до 8.

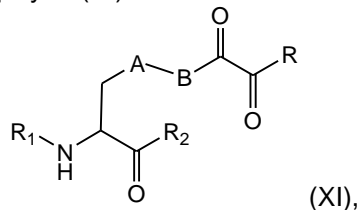
[262] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



, де такі сполуки факультативно є амінозахищеними, факультативно карбоксилзахищеними, факультативно амінозахищеними та карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, ці штучні амінокислоти та будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот можуть бути включені до складу поліпептиду, який містить штучну амінокислоту.

[263] Окрім монокарбонільних структур, штучні амінокислоти, опис яких наведений у цій заявці, можуть містити такі групи, наприклад, як дикарбонільні, дикарбонілоподібні, замасковані дикарбонільні та захищені дикарбонільні групи.

[264] Наприклад, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XI):



де А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен,

гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

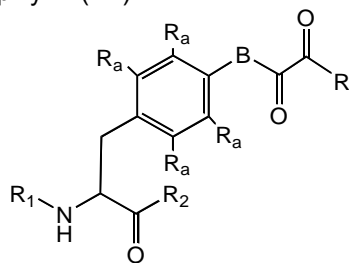
В є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид.

[265] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XII):



(XII),

В є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

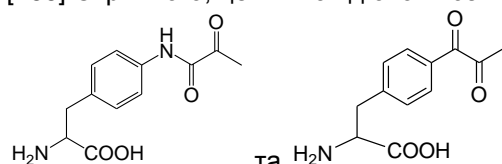
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

кожен R<sub>a</sub> незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', де k – 1, 2 або 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' та -S(O)<sub>k</sub>R', де кожен R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл.

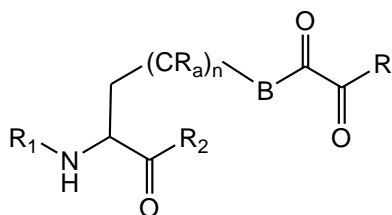
[266] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



де такі сполуки є факультативно амінозахищеними, факультативно карбоксилзахищеними, факультативно амінозахищеними та карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, ці штучні амінокислоти та будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот можуть бути включені до складу поліпептиду, який містить штучну амінокислоту.

[267] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XIII):





(XIII),

де В є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою сполучний агент, вибраний з групи, яку складають нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, нижчий гетероалкілен, заміщений нижчий гетероалкілен, -O-, -O- (алкілен або заміщений алкілен)-, -S-, -S-(алкілен або заміщений алкілен)-, -S(O)<sub>k</sub>-, де k – 1, 2 або 3, -S(O)<sub>k</sub>(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')-, -NR'-(алкілен або заміщений алкілен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкілен або заміщений алкілен)-, -N(R')CO-(алкілен або заміщений алкілен)-, -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- та -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, де кожен з R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл;

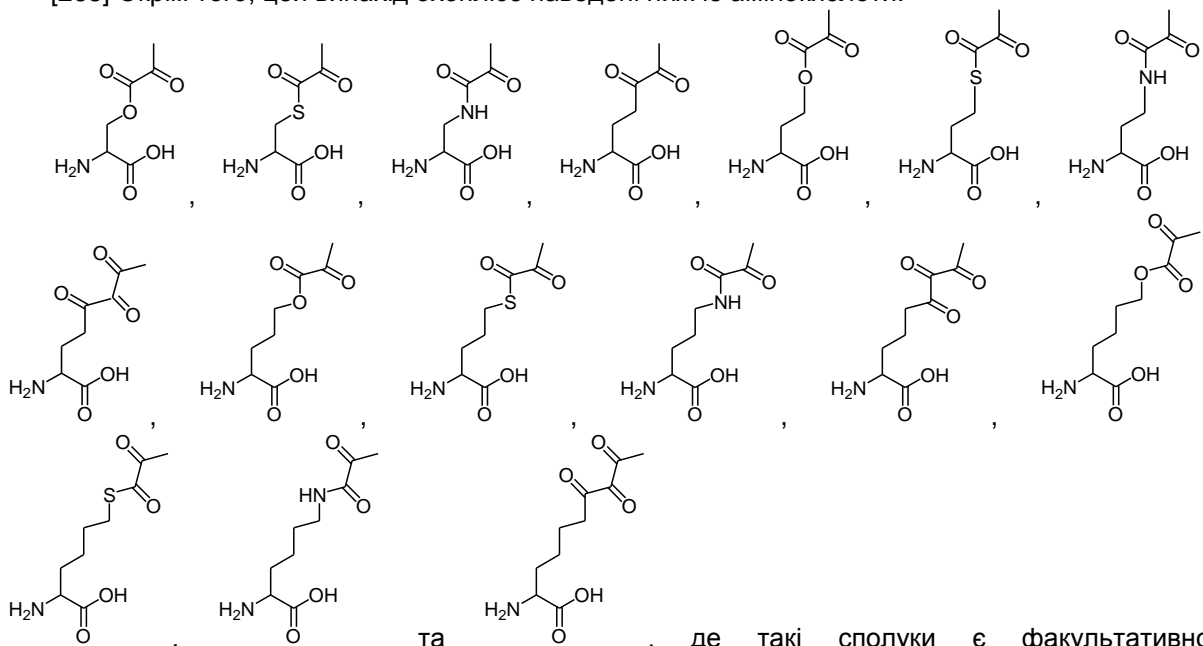
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

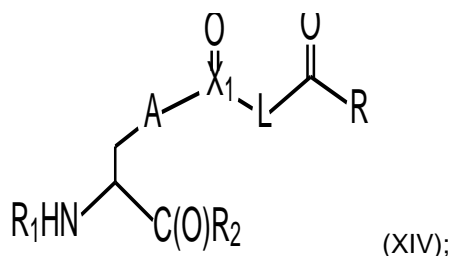
кожен R<sub>a</sub> незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R', де k – 1, 2 або 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' та -S(O)<sub>k</sub>R', де кожен R' незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл; і n – від 0 до 8.

[268] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти:



та де такі сполуки є факультативно амінозахищеними, факультативно карбоксилзахищеними, факультативно амінозахищеними та карбоксилзахищеними або їх сіллю. На додаток до цього, ці штучні амінокислоти та будь-яка з наведених нижче штучних амінокислот можуть бути включені до складу поліпептиду, який містить штучну амінокислоту.

[269] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XIV):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

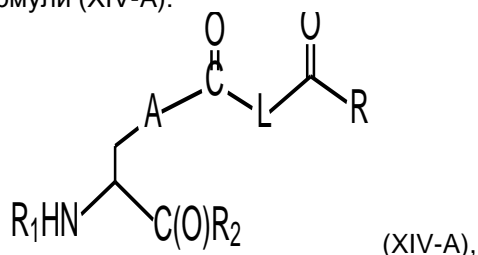
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

X<sub>1</sub> – C, S або S(O); і L – алкілен, заміщений алкілен, N(R')(алкілен) або N(R')(заміщений алкілен), де R' – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[270] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XIV-A):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

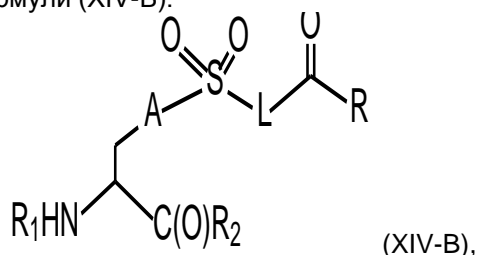
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

L – алкілен, заміщений алкілен, N(R')(алкілен) або N(R')(заміщений алкілен), де R' – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[271] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XIV-B):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен,

нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

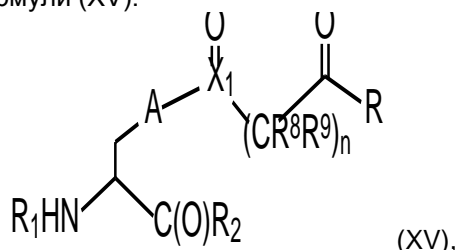
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

5 R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

10 L – алкілен, заміщений алкілен, N(R')(алкілен) або N(R')(заміщений алкілен), де R' – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[272] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XV):



де:

15 A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або

20 заміщений аралкілен;

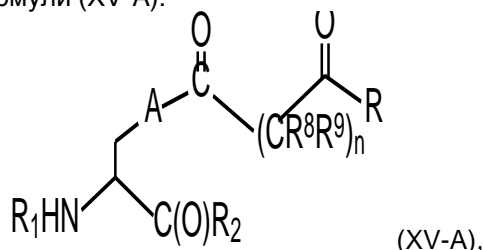
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

25 R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

X<sub>1</sub> – C, S або S(O); i n – 0, 1, 2, 3, 4 або 5; i кожний R<sup>8</sup> та R<sup>9</sup> на кожній CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> групі, незалежно один від одного, вибраний з групи, яку складають H, алкоксигрупа, алкіламін, галоген, алкіл, арил, або будь-який з R<sup>8</sup> та R<sup>9</sup> може разом утворити =O або циклоалкіл, або будь-які з прилеглих до R<sup>8</sup> груп можуть разом утворити циклоалкіл.

30 [273] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XV-A):



де:

35 A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

40 R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

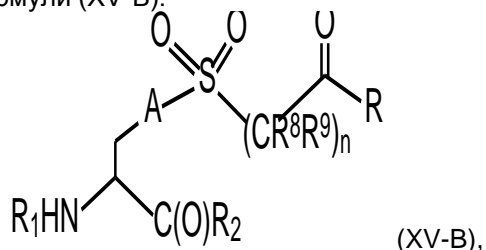
R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

45 n – 0, 1, 2, 3, 4 або 5; i кожний R<sup>8</sup> та R<sup>9</sup> на кожній CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> групі, незалежно один від одного, вибраний з групи, яку складають H, алкоксигрупа, алкіламін, галоген, алкіл, арил, або будь-який

з  $R^8$  та  $R^9$  може разом утворити  $=O$  або циклоалкіл, або будь-які з прилеглих до  $R^8$  груп можуть разом утворити циклоалкіл.

[274] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XV-B):



де:

A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

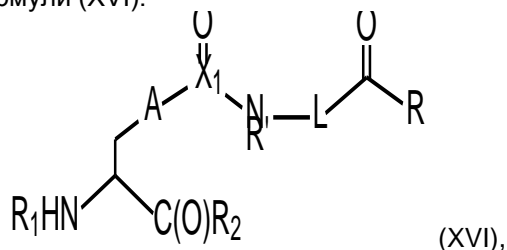
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

$R_1$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

$R_2$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

$n = 0, 1, 2, 3, 4$  або  $5$ ; і кожний  $R^8$  та  $R^9$  на кожній  $\text{CR}^8\text{R}^9$  групі, незалежно один від одного, вибраний з групи, яку складають H, алкоксигрупа, алкіламін, галоген, алкіл, арил, або будь-який з  $R^8$  та  $R^9$  може разом утворити  $=O$  або циклоалкіл, або будь-які з прилеглих до  $R^8$  груп можуть разом утворити циклоалкіл.

[275] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XVI):



де:

A є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

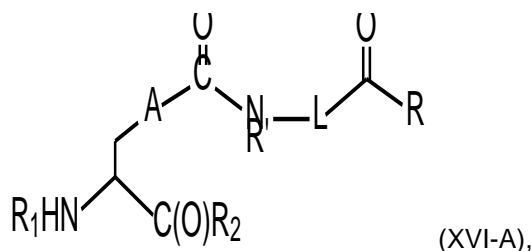
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

$R_1$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

$R_2$  є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

$\text{X}_1 = \text{C}, \text{S}$  або  $\text{S}(\text{O})$ ; і L – алкілен, заміщений алкілен,  $\text{N}(\text{R}')$ (алкілен) або  $\text{N}(\text{R}')$ (заміщений алкілен), де  $\text{R}' = \text{H}$ , алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[276] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XVI-A):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

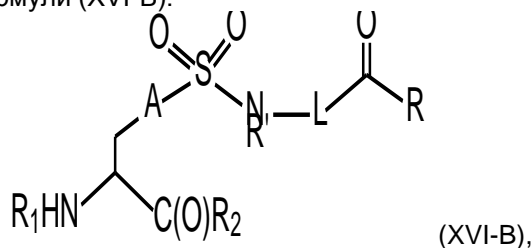
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

L – алкілен, заміщений алкілен, N(R')(алкілен) або N(R')(заміщений алкілен), де R' – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[277] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структуру Формули (XVI-B):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен, нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарилен, заміщений алкарилен, аралкілен або заміщений аралкілен;

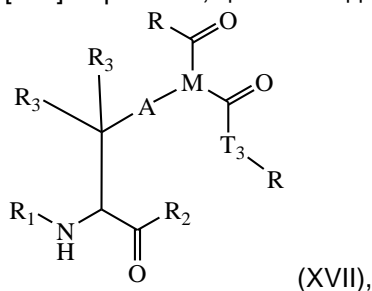
R – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою H, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою OH, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

L – алкілен, заміщений алкілен, N(R')(алкілен) або N(R')(заміщений алкілен), де R' – H, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

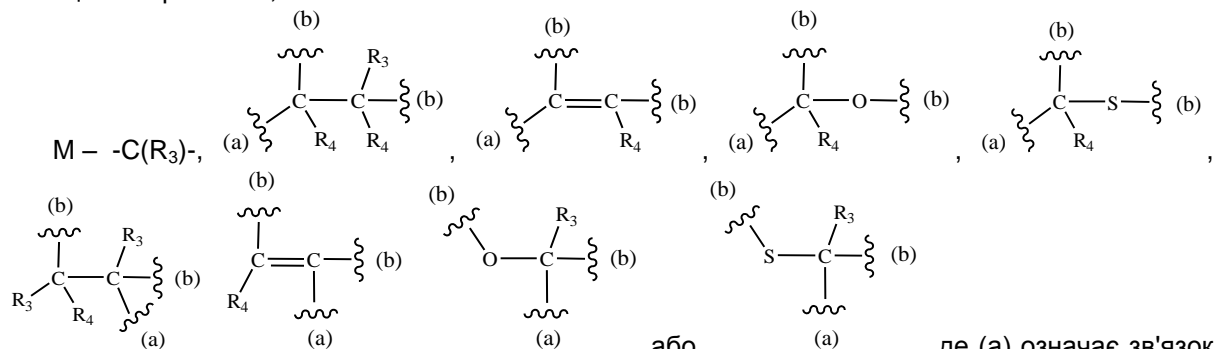
[278] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (XVII):



де:

А є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою нижчий алкілен, заміщений нижчий алкілен, нижчий циклоалкілен, заміщений нижчий циклоалкілен, нижчий алкенілен, заміщений нижчий алкенілен, алкінілен, нижчий гетероалкілен, заміщений гетероалкілен,

нижчий гетероциклоалкілен, заміщений нижчий гетероциклоалкілен, арилен, заміщений арилен, гетероарилен, заміщений гетероарилен, алкарілен, заміщений алкарілен, аралкілен або заміщений аралкілен;



5 де (a) означає зв'язок з А групою, а (b) означає зв'язок з відповідними карбонільними групами, R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> незалежно один від одного вибрані з-посеред Н, галогену, алкілу, заміщеного алкілу, циклоалкілу або заміщеного циклоалкілу, або R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> чи дві R<sub>3</sub> групи або дві R<sub>4</sub> групи факультативно утворюють циклоалкіл або гетероциклоалкіл;

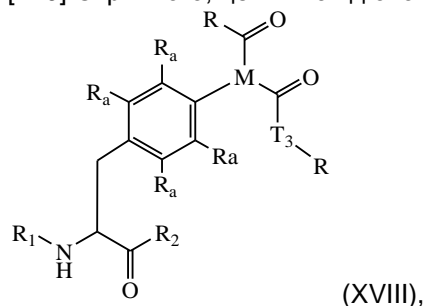
10 R – Н, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

T<sub>3</sub> – зв'язок, C(R)(R), О або S, а R – Н, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

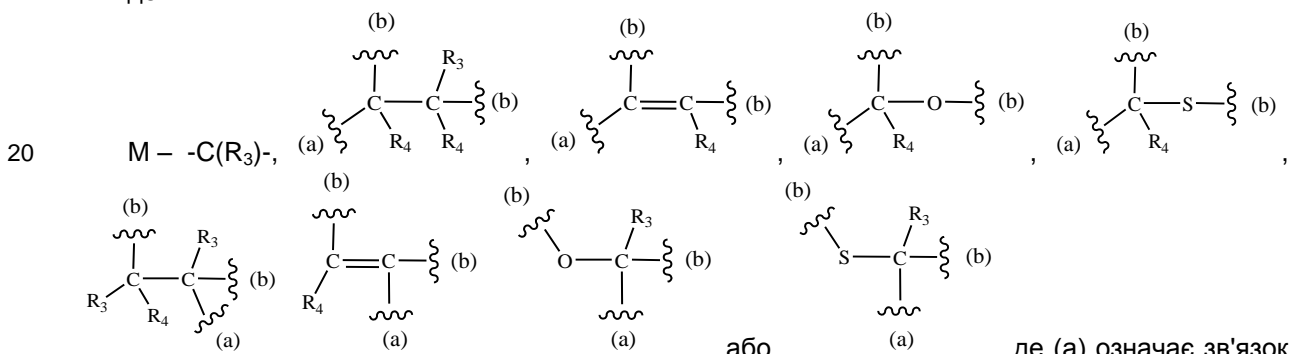
R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою Н, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

15 R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою ОН, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид.

[279] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (XVIII):



де:



20 де (a) означає зв'язок з А групою, а (b) означає зв'язок з відповідними карбонільними групами, R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> незалежно один від одного вибрані з-посеред Н, галогену, алкілу, заміщеного алкілу, циклоалкілу або заміщеного циклоалкілу, або R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> чи дві R<sub>3</sub> групи або дві R<sub>4</sub> групи факультативно утворюють циклоалкіл або гетероциклоалкіл;

25 R – Н, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

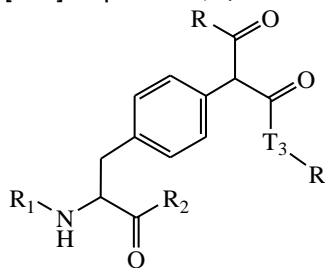
T<sub>3</sub> – зв'язок, C(R)(R), О або S, а R – Н, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл;

30 R<sub>1</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою Н, амінозахисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид; та

R<sub>2</sub> є факультативною групою і, у разі присутності, являє собою ОН, складноефірну захисну групу, смолу, амінокислоту, поліпептид або полінуклеотид;

кожен  $R_a$  незалежно вибраний з групи, яку складають H, галоген, алкіл, заміщений алкіл,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$ , де  $k = 1, 2$  або  $3$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  та  $-S(O)_kR'$ , де кожен  $R'$  незалежно один від одного – H, алкіл або заміщений алкіл.

[280] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (XIX):



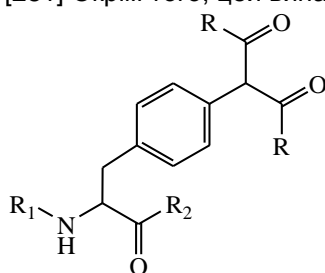
(XIX),

де:

$R$  – H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл; та

$T_3$  – O або S.

[281] Окрім того, цей винахід охоплює амінокислоти, які мають структуру Формули (XX):

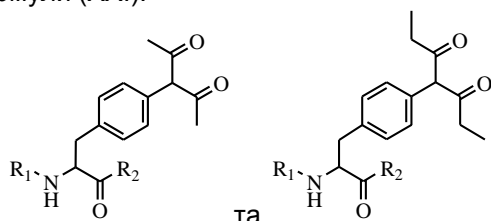


(XX),

де:

$R$  – H, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл або заміщений циклоалкіл.

[282] Окрім того, цей винахід охоплює наведені нижче амінокислоти, які мають структури Формули (XXI):



та

[283] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид, який містить штучну амінокислоту, піддають хімічній модифікації з одержанням реакційноздатної карбонільної або дикарбонільної функціональної групи. Наприклад, альдегідну функціональну групу, прийнятну для реакцій кон'югування, можна одержати з функціональної групи, яка має прилеглі аміно- та гідроксильну групи. У разі, коли біологічно активною молекулою є поліпептид, наприклад, N-кінцевий серин або треонін (які можуть бути присутніми за нормальних умов або можуть бути відкриті шляхом хімічного або ферментативного розщеплення), можна застосовувати для одержання альдегідної функціональної групи за умов м'якого окисативного розщеплення за допомогою періодату. Дивись, наприклад, 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). Однак методи, відомі у цій галузі, обмежуються амінокислотою на N-кінці пептиду або білка.

[284] За цим винаходом штучну амінокислоту, яка несе прилеглі гідроксильну групу та аміногрупу, можна вводити до поліпептиду як "замасковану" альдегідну функціональну групу. Наприклад, 5-гідроксилізін несе гідроксильну групу, прилеглу до епсилон-аміну. Реакційні умови для одержання альдегіду, як правило, включають додання мольного надлишку метаперіодату натрію за м'яких умов для запобігання окиснення на інших ділянках у межах поліпептиду. рН реакції окиснення становить, як правило, приблизно 7,0. Типова реакція включає додання приблизно 1,5 мольного надлишку метаперіодату натрію до забуференого розчину поліпептиду, з подальшим інкубуванням впродовж приблизно 10 хв у темряві. Дивись, наприклад, патент США № 6,423,685.

[285] Карбонільна або дикарбонільна функціональна група може селективно реагувати з гідроксиламіновмісним реактивом за м'яких умов у водному розчині з одержанням відповідного

оксимоного зв'язку, який зберігає стабільність за фізіологічних умов. Дивись, наприклад, Jencks W.P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao J. and Tam J.P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Більше того, унікальна реакційна здатність карбонільної або дикарбонільної групи надає можливість селективного модифікування у присутності бічних ланцюгів інших амінокислот. Дивись, наприклад, Cornish V.W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan K.F. & Stroth J.G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal L.K., et al., Science 276:1125-1128 (1997).

Структура та синтез штучних амінокислот: гідроксиламіновмісні амінокислоти

[286] Попередня заявка на патент США № 60/638,418 включена до цього опису у повному обсязі шляхом посилання. Таким чином, зміст Розділу V (який має назву "Non-natural Amino Acids"), Частина B (яка має назву "Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids") попередньої заявки на патент США № 60/638,418 є повністю застосовним до способів, композицій (в тому числі Формули I-XXXV), методів та стратегій одержання, очищення, визначення характеристик та застосування штучних амінокислот, поліпептидів, які містять штучні амінокислоти, та модифікованих поліпептидів, які містять штучні амінокислоти, опис яких наведений у цій заявці, такою самою мірою, якби їх зміст був повністю присутнім у цьому описі. Патентні публікації США № 2006/0194256, № 2006/0217532 та № 2006/0217289, а також WO 2006/069246, що має назву "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", також у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання.

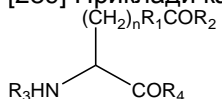
Хімічний синтез штучних амінокислот

[287] Багато зі штучних амінокислот, прийнятних для застосування за цим винаходом, є комерційно доступними, наприклад, від компанії Sigma (США) або від компанії Aldrich (Milwaukee, штат Вісконсін, США). Комерційно недоступні штучні амінокислоти факультативно синтезують як зазначено у цьому описі або у різних публікаціях чи за допомогою стандартних методів, відомих фахівцю у цій галузі. Методи органічного синтезу дивись, наприклад, у 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); та Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). До інших публікацій, які описують синтез штучних амінокислот, належать, наприклад, WO 2002/085923, що має назву "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., Vilmon M. & Frappier F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-205; Koskinen A.M.P. & Rapoport H. (1989) Synthesis 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 Phecolates 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; та 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. Дивись також патентну публікацію США № 2004/0198637, яка має назву "Protein Arrays", яку включено до цього опису шляхом посилання.

А. Карбонільні реакційноздатні групи

[288] Амінокислоти з карбонільною реакційноздатною групою надають можливість здійснення цілого ряду реакцій зі сполучення молекул (у тому числі, але без обмеження, поліетиленгліколю або інших водорозчинних молекул) шляхом реакцій нуклеофільного приєднання або альдольної конденсації, разом з іншими.

[289] Приклади карбонільвмісних амінокислот можуть бути представлені такою структурою:



де  $n = 0-10$ ;  $\text{R}_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил;  $\text{R}_2$  – H, алкіл, арил, заміщений алкіл та заміщений арил;  $\text{R}_3$  – H, амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-



модифікатор, та  $R_4$  – Н, амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n - 1$ ,  $R_1$  – феніл і  $R_2$  – простий алкіл (тобто метил, етил або пропіл), а кетонна складова знаходиться у пара-положенні відносно бічного ланцюга алкілу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n - 1$ ,  $R_1$  – феніл і  $R_2$  – простий алкіл (тобто метил, етил або пропіл), а кетонна складова знаходиться у мета-положенні відносно бічного ланцюга алкілу.

[290] Синтез п-ацетил-(+/-)-фенілаланіна та м-ацетил-(+/-)-фенілаланіну описаний у публікації Zhang Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003), яку включено до цього опису шляхом посилання. Фахівець у цій галузі аналогічним чином може одержати інші карбонільвмісні амінокислоти.

[291] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид, який містить штучну амінокислоту, піддають хімічній модифікації з одержанням реакційноздатної карбонільної функціональної групи. Наприклад, альдегідну функціональну групу, придатну для реакцій кон'югування, можна одержати з функціональної групи, яка має прилеглі аміногрупу та гідроксильну групу. Якщо біологічно активною молекулою є поліпептид, наприклад, N-кінцевий серин або треонін (які можуть бути присутніми за нормальних умов або можуть бути відкриті шляхом хімічного або ферментативного розщеплення) можуть застосовуватись для одержання альдегідної функціональної групи за умов м'якого оксидативного розщеплення із застосуванням перйодату. Дивись, наприклад, 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). Однак методи, відомі у цій галузі, обмежуються амінокислотою на N-кінці пептиду або білка.

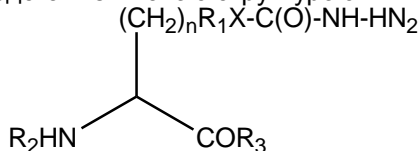
[292] За цим винаходом, штучну амінокислоту, яка несе прилеглі гідроксильну та аміногрупи, можна вводити до поліпептиду як "замасковану" альдегідну функціональну групу. Наприклад, 5-гідроксилізін несе гідроксильну групу, прилеглу до епсилон-аміну. Реакційні умови для одержання альдегіду, як правило, включають додання мольного надлишку метаперйодату натрію за м'яких умов для запобігання окиснення на інших ділянках у межах поліпептиду. рН реакції окиснення становить, як правило, приблизно 7,0. Типова реакція включає додання приблизно 1,5 мольного надлишку метаперйодату натрію до забуференого розчину поліпептиду, з подальшим інкубуванням впродовж приблизно 10 хв у темряві. Дивись, наприклад, патент США № 6,423,685.

[293] Карбонільна функціональна група може селективно реагувати з гідразин-, гідразид-, гідроксиламін- або семікарбазидвмісним реактивом за м'яких умов у водному розчині з одержанням відповідного гідразонового, оксимового або семікарбазонового зв'язків, відповідно, які зберігають стабільність за фізіологічних умов. Дивись, наприклад, Jencks W.P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao J. and Tam J.P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Більше того, унікальна реакційна здатність карбонільної групи надає можливість селективного модифікування у присутності бічних ланцюгів інших амінокислот. Дивись, наприклад, 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. Гідразинові, гідразидні або семікарбазидні реакційноздатні групи

[294] Штучно закодовані амінокислоти, які містять нуклеофільну групу, такі як гідразинова, гідразидна або семікарбазидна, надають можливість здійснення цілого ряду реакцій з електрофільними групами з утворенням кон'югатів (у тому числі, але без обмеження, з поліетиленгліколем або іншими водорозчинними полімерами).

[295] Приклади гідразин-, гідразид- або семікарбазидвмісних амінокислот можуть бути представлені такою структурою:



де  $n = 0-10$ ;  $R_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил чи не представлений; змінна  $X = \text{O}$ ,  $\text{N}$  або  $\text{S}$  чи не представлена;  $R_2$  – Н, амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, та  $R_3$  – Н, амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор.

[296] В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 4$ ,  $R_1$  – не представлений, а  $X = \text{N}$ . В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 2$ ,  $R_1$  – не представлений, змінна  $X$  – не представлена. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  – феніл,  $X = \text{O}$ , а атом кисню знаходиться у пара-положенні відносно аліфатичної групи на арильному циклі.

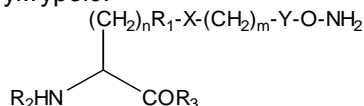
[297] Гідразид-, гідразин- та семікарбазидвмісні амінокислоти є доступними з комерційних джерел. Наприклад, L-глутамат-γ-гідразид є доступним від компанії Sigma Chemical (St. Louis, штат Міссурі). Інші комерційно недоступні амінокислоти можуть бути одержані фахівцем у цій галузі. Дивись, наприклад, патент США № 6,281,211, включений до цього опису шляхом посилання.

[298] Поліпептиди, які містять штучно закодовані амінокислоти, що несуть гідразидні, гідразинові або семікарбазидні функціональні групи, можуть ефективно та селективно реагувати з різноманітними молекулами, які містять альдегіди або інші функціональні групи з подібною хімічною реакційною здатністю. Дивись, наприклад, Shao J. and Tam J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Унікальна реакційна здатність гідразидних, гідразинових та семікарбазидних функціональних груп робить їх значно більш реакційноздатними по відношенню до альдегідів, кетонів та інших електрофільних груп, порівняно з нуклеофільними групами, присутніми у 20 звичайних амінокислот (у тому числі, але без обмеження, гідроксильна група серину або треоніну чи аміногрупи лізину та N-кінця).

C. Амінооксидвмісні амінокислоти

[299] Штучно закодовані амінокислоти, які містять амінооксигрупу (яку також називають гідроксиламіновою групою), надають можливість реагування з різноманітними електрофільними групами з одержанням кон'югатів (у тому числі, але без обмеження, з поліетиленгліколем або іншими водорозчинними полімерами). Подібно до гідразинів, гідразидів та семікарбазидів, підвищена нуклеофільність амінооксигрупи надає можливість ефективного та селективного реагування із цілим рядом молекул, які містять альдегіди або інші функціональні групи з подібною хімічною реакційною здатністю. Дивись, наприклад, Shao J. and Tam J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H Hang and C Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001). У той час як результатом реакції з гідразиновою групою є відповідний гідразон, оксим, однак, як правило, є результатом реакції амінооксигрупи з карбонільвмісною групою, такою як кетон.

[300] Приклади амінокислот, які містять амінооксигрупи, можуть бути представлені такою структурою:



де  $n = 0-10$ ;  $\text{R}_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил чи не представлений; змінна  $\text{X} = \text{O, N, S}$  або не представлена;  $m = 0-10$ ; змінна  $\text{Y} = \text{C(O)}$  або не представлена;  $\text{R}_2 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, та  $\text{R}_3 = \text{H}$ , амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ;  $\text{R}_1$  – фенол,  $\text{X} = \text{O}$ ,  $m = 1$ , змінна  $\text{Y}$  не представлена. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 2$ ;  $\text{R}_1$  та змінна  $\text{X}$  не представлені,  $m = 0$ , змінна  $\text{Y}$  не представлена.

[301] Амінооксидвмісні амінокислоти можна одержати з легкодоступних попередників амінокислот (гомосерин, серин та треонін). Дивись, наприклад, M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Певні амінооксидвмісні амінокислоти, наприклад, L-2-аміно-4-(аміноокси)масляна кислота, були ізольовані з природних джерел (Rosenthal G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). Інші амінооксидвмісні амінокислоти можуть бути одержані фахівцем у цій галузі.

D. Азидні та алкінові реакційноздатні групи

[302] Унікальна реакційна здатність азидних та алкінових функціональних груп робить їх надзвичайно прийнятними для селективної модифікації поліпептидів та інших біологічних молекул. Органічні азиди, зокрема, аліфатичні азиди та алкіни є, як правило, стабільними за звичайних умов здійснення хімічних реакцій. Зокрема, як азидні, так і алкінові функціональні групи є інертними по відношенню до бічних ланцюгів (тобто R груп) 20 звичайних амінокислот, які знаходяться у природних поліпептидах. У разі зведення до тісної близькості, однак, дається взнаки "підпружинена" природа азидних та алкінових груп, і вони селективно та ефективно реагують у реакції [3+2]-циклоприсєднання Хьюсена з одержанням відповідного триазолу. Дивись, наприклад, Chin J., et al., Science 301:964-967 (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).

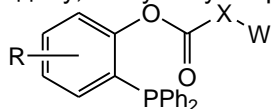
[303] Оскільки реакція циклоприсєднання Хьюсена включає скоріше реакцію селективного циклоприсєднання (дивись, наприклад, Padwa A., в Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (ed. Trost B.M., 1991), стор. 1069-1109; Huisgen R. в 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa A., 1984), стор. 1-176), аніж нуклеофільного заміщення, введення штучно закодованих амінокислот, які несуть азид- та алкінвмісні бічні ланцюги, забезпечує можливість здійснення модифікації одержаних у результаті поліпептидів у положенні штучно закодованої амінокислоти.

Реакцію циклоприєднання, яка включає азид- або алкінвмісний поліпептид bG-CSF, можна здійснювати при кімнатній температурі у водному середовищі шляхом додання Cu(II) (у тому числі, але без обмеження, у формі каталітичної кількості CuSO<sub>4</sub>) у присутності відновника для відновлення Cu(II) до Cu(I), *in situ*, у каталітичній кількості. Дивись, наприклад, Wang Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe C.W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). До прикладів відновників належать, але без обмеження, аскорбат, маталічну мідь, хінін, гідрохінон, вітамін К, глутатіон, цистеїн, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> та прикладений електричний потенціал.

[304] У деяких випадках, у разі необхідності проведення реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсгена між азидом та алкіном, поліпептид bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту, яка містить алкінову складову, а водорозчинний полімер, призначений для приєднання до амінокислоти, містить азидну складову. Альтернативно можна здійснювати також зворотну реакцію (тобто з азидною складовою на амінокислоті та алкіною складовою, присутньою на водорозчинному полімері).

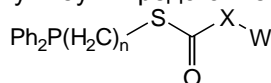
[305] Азидна функціональна група може також селективно реагувати з водорозчинним полімером, який містить ариловий складний ефір, та відповідно функціоналізованою арилфосфіною складовою, з одержанням амідного зв'язку. Арилфосфінова група відновлює азид *in situ*, після чого одержаний амін ефективно реагує з проксимальним складноефірним зв'язком з одержанням відповідного аміду. Дивись, наприклад, E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000). Азидвмісна амінокислота може бути або алкілазидом (у тому числі, але без обмеження, 2-аміно-6-азидо-1-гексановою кислотою), або арилазидом (п-азидофенілаланін).

[306] Приклади водорозчинних полімерів, які містять ариловий складний ефір та фосфінову складову, можуть бути представлені такою структурою:



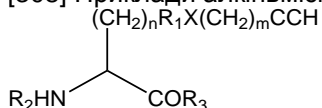
де змінна X може бути O, N, S або не представлена, Ph – феніл, W – водорозчинний полімер, і R може бути H, алкільними, арильними, заміщеними алкільними та заміщеними арильними групами. До прикладів R групи належать, але без обмеження ними, -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -галоген, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN та -NO<sub>2</sub>. Кожен з R', R'', R''' та R''', незалежно від інших, означає водень, заміщений або незаміщений гетероалкіл, заміщений або незаміщений арил, у тому числі, але без обмеження, арил, заміщений 1-3 атомами галогену, заміщеними або незаміщеними алкільними, алкоксильними або тіоалкоксильними групами або ариалкільними групами. Якщо сполука за цим винаходом включає більше однієї R групи, наприклад, кожен з R груп вибирають незалежно, так само, як і кожен з R', R'', R''' та R'''' груп, у разі, коли присутньо є більше однієї з цих груп. У разі, коли R' та R'' приєднуються до того самого атому азоту, вони можуть комбінуватись зі згаданим атомом азоту з утворенням 5-, 6- або 7-членного циклу. Наприклад, -NR'R'' включає, але не обмежується ними, 1-піролідиніл та 4-морфолініл. Виходячи з наведеного вище обговорення замісників, фахівцю у цій галузі зрозуміло, що термін "алкіл" охоплює групи, у тому числі атоми вуглецю, приєднані дорупами, окрім водневих груп, наприклад, галогеналкіл (у тому числі, але без обмеження, -CF<sub>3</sub> та -H<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) та ацил (у тому числі, але без обмеження, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> тощо).

[307] Азидна функціональна група може також селективно реагувати з водорозчинним полімером, який містить складний тіоефір, та відповідно функціоналізованою арилфосфіною складовою, з одержанням амідного зв'язку. Арилфосфінова група відновлює азид *in situ*, після чого одержаний амін ефективно реагує з тіоефірним зв'язком з одержанням відповідного аміду. Приклади водорозчинних полімерів, які містять складний тіоефір та фосфінову складову, можуть бути представлені такою структурою:



де n – 1-10; змінна X може бути O, N, S або не представлена, Ph – феніл, а W – водорозчинний полімер.

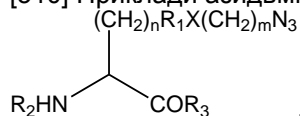
[308] Приклади алкінвмісних амінокислот можуть бути представлені такою структурою:



де  $n = 0-10$ ;  $R_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил чи не представлений; змінна  $X = O, N, S$  або не представлена;  $m = 0-10$ ;  $R_2 = H$ , амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, та  $R_3 = H$ , амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  – феніл, змінна  $X$  не представлена,  $m = 0$ , а ацетиленова складова знаходиться у пара-положенні відносно бічного ланцюга алкілу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  – феніл, змінна  $X = O$ ,  $m = 1$ , а пропаргілоксигрупа знаходиться у пара-положенні відносно бічного ланцюга алкілу (тобто О-пропаргілтирозину). В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  та змінна  $X$  не представлені,  $m = 0$  (тобто пропаргілгліцин).

[309] Алкінвмісні амінокислоти є комерційно доступними. Наприклад, пропаргілгліцин є комерційно доступним від компанії Peptech (Burlington, штат Массачусетс). Альтернативно алкінвмісні амінокислоти можна одержати за стандартними методами. Наприклад, п-пропаргілоксифенілаланін можна синтезувати, наприклад, як описано у Deiters A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), а 4-алкініл-L-фенілаланін можна синтезувати як описано у Kayser B., et al., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Інші алкінвмісні амінокислоти можуть бути одержані фахівцем у цій галузі.

[310] Приклади азидвмісних амінокислот можуть бути представлені такою структурою:



де  $n = 0-10$ ;  $R_1$  – алкіл, арил, заміщений алкіл або заміщений арил чи не представлений; змінна  $X = O, N, S$  або не представлена;  $m = 0-10$ ;  $R_2 = H$ , амінокислота, поліпептид або амінокінцева група-модифікатор, та  $R_3 = H$ , амінокислота, поліпептид або карбоксикінцева група-модифікатор. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  – феніл, змінна  $X$  не представлена,  $m = 0$ , а азидна складова знаходиться у пара-положенні відносно бічного ланцюга алкілу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 0-4$ ,  $R_1$  та змінна  $X$  не представлені,  $m = 0$ . В деяких варіантах здійснення цього винаходу  $n = 1$ ,  $R_1$  – феніл, змінна  $X = O$ ,  $m = 2$ , а  $\beta$ -азидоетоксильна складова знаходиться у пара-положенні відносно бічного ланцюга алкілу.

[311] Азидовмісні амінокислоти є доступними з комерційних джерел. Наприклад, 4-азидофенілаланін можна одержати від компанії Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, штат Іллінойс). Для комерційно недоступних азидовмісних амінокислот азидну групу можна порівняно легко одержати за стандартними методами, відомими фахівцям у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом заміщення відповідної відщеплюваної групи (у тому числі, але без обмеження, галогеніду, мезилату, тозилату) або шляхом відкриття відповідно захищеного лактону. Дивись, наприклад, Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

#### Е. Амінотіолові реакційноздатні групи

[312] Унікальна реакційна здатність бета-заміщених амінотіолових функціональних груп робить їх надзвичайно прийнятними для селективної модифікації поліпептидів та інших біологічних молекул, які містять альдегідні групи, завдяки утворенню тiazолідину. Дивись, наприклад, J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. В деяких варіантах здійснення цього винаходу бета-заміщені амінотіолові амінокислоти можна вводити до поліпептидів bG-CSF з подальшим реагуванням з водорозчинними полімерами, які містять альдегідну функціональну групу. В деяких варіантах здійснення цього винаходу водорозчинний полімер, кон'югат лікарської речовини або іншу корисну речовину можна сполучати з поліпептидом bG-CSF, який містить бета-заміщену амінотіолову амінокислоту, завдяки утворенню тiazолідину.

#### Ф. Додаткові реакційноздатні групи

[313] Додаткові реакційноздатні групи та штучно закодовані амінокислоти, у тому числі, але без обмеження, пара-амінофенілаланін, які можуть бути введені до поліпептидів bG-CSF за цим винаходом, описані у наведених нижче заявках на патент, усі з яких у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання: патентна публікація США № 2006/0194256, патентна публікація США № 2006/0217532, патентна публікація США № 2006/0217289, попередня заявка на патент США № 60/755,338; попередня заявка на патент США № 60/755,711; попередня заявка на патент США № 60/755,018; міжнародна заявка PCT/US06/49397; WO 2006/069246; попередня заявка на патент США № 60/743,041; попередня заявка на патент США № 60/743,040; міжнародна заявка PCT/US06/47822; попередня заявка на патент США № 60/882,819; попередня заявка на патент США № 60/882,500; і попередня заявка на патент США № 60/870,594. Ці заявки також обговорюють реакційноздатні групи, які можуть бути

присутніми на поліетиленгліколі або інших полімерах, у тому числі, але без обмеження, гідроксиламінові (аміноокси) групи для кон'югації.

Поглинання штучних амінокислот клітинами

[314] Поглинання штучної амінокислоти клітиною є однією з проблем, яку, як правило, розглядають у разі конструювання та вибору штучних амінокислот, у тому числі, але без обмеження, для введення у білок. Наприклад, висока густина заряду  $\alpha$ -амінокислот дозволяє висунути припущення про те, що ці сполуки навряд чи є клітинопроникними. Природні амінокислоти поглинаються еукаріотними клітинами шляхом збирання транспортних систем на білковій основі. Може бути здійснена швидка перевірка, яка визначить, які штучні амінокислоти, якщо це має місце, поглинаються клітинами. Дивись, наприклад, випробування на токсичність, наприклад, у патентній публікації США № 2004/0198637 під назвою "Protein Arrays", яку включено до цього опису шляхом посилання; та 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. Надання біосинтетичних шляхів утворення амінокислот *in vivo* є альтернативою конструюванню штучних амінокислот, які є доступними для шляхів поглинання клітинами, незважаючи на те, що поглинання легко визначити за допомогою різних випробувань.

Біосинтез штучних амінокислот

[315] У клітинах вже існує багато біосинтетичних шляхів для продукування амінокислот та їхніх сполук. Оскільки у природі, у тому числі, але без обмеження, у клітині, може не існувати способу біологічного синтезу конкретної штучної амінокислоти, цей винахід пропонує такі способи. Наприклад, шляхи біосинтезу штучних амінокислот факультативно утворюються у клітині-хазяїні завдяки доданню нових ферментів або модифікуванню існуючих шляхів клітини-хазяїни. Додатковими новими ферментами факультативно є природні ферменти або штучно створені ферменти. Наприклад, біосинтез *p*-амінофенілаланіну (як представлено у прикладі у WO 2002/085923 під заголовком "In vivo incorporation of unnatural amino acids") полягає у доданні комбінації відомих ферментів від інших організмів. Гени цих ферментів можна вводити до еукаріотної клітини шляхом її трансформування плазмідом, яка містить згадані гени. Гени, у разі експресії у клітині, забезпечують ферментативний шлях для синтезування необхідної сполуки. Приклади типів ферментів, які факультативно додаються, наведені у описаних нижче прикладах. Послідовності додаткових ферментів знаходяться, наприклад, у GenBank. Штучно створені ферменти також факультативно додають у клітину подібним чином. Таким чином, механізми та ресурси клітини використовують для продукування штучних амінокислот.

[316] Доступними є різноманітні способи продукування нових ферментів для застосування у біосинтетичних шляхах або для розвитку існуючих шляхів. Наприклад, спосіб рекурсивної рекомбінації, у тому числі, але без обмеження, спосіб, розроблений компанією Maхugen, Inc. (є доступним у мережі Інтернету за адресою: [maxugen.com](http://maxugen.com)), факультативно застосовують для розробки нових ферментів та шляхів. Дивись, наприклад, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391; та Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-10751. Подібним же чином, DesignPath™, розроблений компанією Genencor (є доступним у мережі Інтернет за адресою: [genencor.com](http://genencor.com)), факультативно застосовують для конструювання метаболічних шляхів, у тому числі, але без обмеження, для конструювання шляхів створення О-метил-L-тирозину у клітині. Ця технологія реконструює існуючі шляхи у організмах-хазяях шляхом застосування комбінації нових генів, у тому числі, але без обмеження, генів, які були ідентифіковані за допомогою функціональної геноміки, методами молекулярної біології та генно-інженерного конструювання. Компанія Diversa Corporation (є доступною у мережі Інтернет за адресою: [diversa.com](http://diversa.com)) також пропонує технологію швидкого скринінгу бібліотек генів або генних шляхів, у тому числі, але без обмеження, зі створенням нових шляхів.

[317] Як правило, штучна амінокислота, продукована генно-інженерним біосинтетичним шляхом за цим винаходом, продукується у концентрації, достатній для ефективного біосинтезу білка, у тому числі, але без обмеження, у природній клітинній кількості, але не до такого ступеня, щоб негативно впливати на концентрацію інших амінокислот або вичерпувати клітинні ресурси. Типові концентрації, які продукуються *in vivo* подібним чином, становлять від приблизно 10 мМ до приблизно 0,05 мМ. Після завершення трансформування клітини плазмідом, яка містить гени, які застосовуються для продукування ферментів, необхідних для специфічного шляху і одержання штучної амінокислоти, для додаткової оптимізації продукування штучних амінокислот (як для синтезу білка рибосомами, так і для росту клітин) факультативно застосовують методи селекції *in vivo*.

Поліпептиди, які містять штучні амінокислоти

[318] Введення штучної амінокислоти можна здійснювати з різними цілями, у тому числі, але без обмеження, для запланованих змін структури та/або функції білка, зміни розміру, кислотності, нуклеофільності, водневого зв'язування, гідрофобності, доступності протеазних сайтів-мішеней, цілеспрямованого на складову (у тому числі, але без обмеження, для сукупності білків), приєднання біологічно активної молекули, приєднання полімеру, приєднання радіонукліду, модулювання періоду напіввиведення з плазми, модулювання тканинної проникності (наприклад, пухлин), модулювання активного транспорту, модулювання тканинної, клітинної або органної специфічності або розподілу, модулювання імунотоксичності, модулювання стійкості до протеаз тощо. Білки, які містять штучну амінокислоту, можуть мати посилені або навіть зовсім нові каталітичні або біофізичні властивості. Наприклад, у разі введення штучної амінокислоти до складу білка факультативно модифікують такі властивості: токсичність, біорозподіл, структурні властивості, спектроскопічні властивості, хімічні та/або фотохімічні властивості, каталітична здатність, період напіввиведення (у тому числі, але без обмеження, період напіввиведення з плазми), здатність до реагування з іншими молекулами, у тому числі, але без обмеження, ковалентно або нековалентно тощо. Композиції, до складу яких входять білки, які містять щонайменше одну штучну амінокислоту, є прийнятними для, у тому числі, але без обмеження, нових терапевтичних препаратів, діагностичних препаратів, каталітичних ферментів, промислових ферментів, зв'язувальних білків (у тому числі, але без обмеження, антитіл), а також, у тому числі, але без обмеження, для дослідження структури та функції білків. Дивись, наприклад, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

[319] За одним з аспектів цього винаходу композиція містить щонайменше один білок із щонайменше однією, у тому числі, але без обмеження, щонайменше двома, щонайменше трьома, щонайменше чотирма, щонайменше п'ятьма, щонайменше шістьма, щонайменше сімома, щонайменше вісьмома, щонайменше дев'ятьма або щонайменше десятьма або більше штучними амінокислотами. Згадані штучні амінокислоти можуть бути однаковими або різними, у тому числі, але без обмеження, згаданий білок може мати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше різних сайтів, що містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше різних штучних амінокислот. За іншим аспектом цього винаходу композиція містить білок, у якого щонайменше одна (але менше ніж усі) конкретна амінокислота, яка входить до його складу, замінена штучною амінокислотою. Для певного білка з більше ніж однією штучною амінокислотою, згадані штучні амінокислоти можуть бути однаковими або різними (у тому числі, але без обмеження, згаданий білок може містити штучні амінокислоти двох або більше різних типів чи може містити дві однакові штучні амінокислоти). Для певного білка з більше ніж двома штучними амінокислотами згадані штучні амінокислоти можуть бути однаковими, різними або комбінацією численних штучних амінокислот одного виду із щонайменше однією іншою штучною амінокислотою.

[320] Білки або поліпептиди, які становлять інтерес, із щонайменше однією штучною амінокислотою є відмінною ознакою цього винаходу. Цей винахід також охоплює поліпептиди або білки із щонайменше однією штучною амінокислотою, продукуювану із застосуванням композицій та способів за цим винаходом. Зі згаданим білком може також бути присутня допоміжна речовина (у тому числі, але без обмеження, фармацевтично прийнятна допоміжна речовина).

[321] У разі продукування білків або поліпептидів, які становлять інтерес, із щонайменше однією штучною амінокислотою в еукаріотних клітинах, білки або поліпептиди будуть, як правило, включати еукаріотні посттрансляційні модифікації. У певних варіантах здійснення цього винаходу білок містить щонайменше одну штучну амінокислоту та щонайменше одну посттрансляційну модифікацію, яка здійснюється *in vivo* еукаріотною клітиною, де ця посттрансляційна модифікація не здійснюється прокаріотною клітиною. Наприклад, згадана посттрансляційна модифікація включає, у тому числі, але без обмеження, ацетилювання, ацилювання, ліпідну модифікацію, пальмітоїлювання, приєднання пальмітату, фосфорилювання, модифікацію гліколіпідного зв'язування, глікозилювання тощо. За одним з аспектів цього винаходу посттрансляційна модифікація включає приєднання олігосахариду (у тому числі, але без обмеження, (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc)) до аспарагіну зв'язком GlcNAc-аспарагін. Дивись Таблицю 1, у якій наведені деякі приклади N-зв'язаних олігосахаридів еукаріотних білків (можуть також бути присутніми додаткові залишки, які не показані). За іншим аспектом цього винаходу посттрансляційна модифікація включає приєднання олігосахариду (у тому числі, але без обмеження, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc тощо) до серину або треоніну зв'язком GalNAc-серин або GalNAc-треонін чи зв'язком GlcNAc-серин або GlcNAc-треонін.

ТАБЛИЦЯ 1

## ПРИКЛАДИ ОЛІГОСАХАРИДІВ, ПРИЄДНАНИХ ЧЕРЕЗ GlcNAc

Тип	Основна структура
Високомо- лекулярна маноза	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1-6 \\  \text{Man}\alpha 1-3  \end{array}  \begin{array}{c}  \diagup \\  \diagdown  \end{array}  \text{Man}\alpha 1-6  \begin{array}{c}  \diagup \\  \diagdown  \end{array}  \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}  $
Гібрид	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1-6 \\  \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ — } \text{Man}\alpha 1-3  \end{array}  \begin{array}{c}  \diagup \\  \diagdown  \end{array}  \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}  $
Комплекс	$  \begin{array}{c}  \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ — } \text{Man}\alpha 1-6 \\  \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ — } \text{Man}\alpha 1-3  \end{array}  \begin{array}{c}  \diagup \\  \diagdown  \end{array}  \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}  $
Ксилоза	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1-6 \\  \text{Xyl}\beta 1-2  \end{array}  \begin{array}{c}  \diagup \\  \diagdown  \end{array}  \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}  $

[322] За іншим аспектом цього винаходу посттрансляційна модифікація включає протеолітичний процесинг попередників (у тому числі, але без обмеження, попередника кальцитоніну, попередника пептиду, утворюваного кальцитоніном, препропаратиреоїдного гормону, препроінсуліну, проінсуліну, препроопіомеланокортину, проопіомеланокортину тощо), складання з одержанням мультисубодиничного білка або макромолекулярне складання, перенесення до іншої ділянки у клітині (у тому числі, але без обмеження, до органел, таких як ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, ядра, лізосоми, пероксисоми, мітохондрії, хлоропласти, вакуолі тощо або через секреторний шлях). У певних варіантах здійснення цього винаходу білок містить секреторну або локалізаційну послідовність, мітку антигенної детермінанти, мітку FLAG, полігістидинову мітку, мітку злиття з GST тощо.

[323] Одна з переваг штучної амінокислоти полягає у тому, що вона надає додаткові хімічні складові, які можна застосовувати для приєднання додаткових молекул. Ці модифікації можна здійснювати *in vivo* в еукаріотній або нееукаріотній клітині чи *in vitro*. Таким чином, у певних варіантах здійснення цього винаходу посттрансляційна модифікація відбувається через штучну амінокислоту. Наприклад, посттрансляційна модифікація може відбуватись через нуклеофільну-електрофільну реакцію. Більшість реакцій, які на сучасному етапі застосовують для селективної модифікації білків, включають утворення ковалентних зв'язків між партнерами нуклеофільної та електрофільної реакції, у тому числі, але без обмеження, реакцію  $\alpha$ -галогенкетонів із бічними ланцюгами гістидину або цистеїну. Селективність у цих випадках визначається кількістю та доступністю нуклеофільних залишків у білка. У разі білків за цим винаходом можна застосовувати інші більш селективні реакції, такі як реакція штучної кето-амінокислоти з гідрازیдами або амінооксисполуками, *in vitro* та *in vivo*. Дивись, наприклад, 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; та Chin, et al., (2003) Science, 301:964-967, усі з яких включені до цього опису шляхом посилання. Це надає можливість селективного мічення фактично будь-якого білка численними реагентами, у тому числі флуорофорами, агентами для зшивання, похідними сахаридів та цитотоксичними молекулами. Дивись також патент США № 6,927,042 під назвою "Glycoprotein synthesis," включений до цього опису шляхом посилання. Посттрансляційні модифікації, у тому числі, але без обмеження, через амінокислоти, які містять азидогрупу, можна здійснювати шляхом реакції лігування Штаудингера (у тому числі, але без обмеження, з триарилфосфіновими реагентами). Дивись, наприклад, Kiick et al., (2002)

Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

[324] Цей винахід пропонує інший високоефективний метод селективної модифікації білків, який включає генетичне введення штучних амінокислот, у тому числі, але без обмеження, амінокислот, які містять азидну або алкінільну складову, до білків у відповідь на селекторний кодон. Бічні ланцюги цих амінокислот можна у подальшому модифікувати, у тому числі, але без обмеження, реакцією [3+2]-циклоприєднання Хьюсена (дивись, наприклад, Padwa A. у Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost B.M., Pergamon, Oxford, стр. 1069-1109; та Huisgen R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa A., Wiley, New York, стр. 1-176), у тому числі, але без обмеження, з алкінільними або азидними похідними, відповідно. Оскільки цей метод включає циклоприєднання, а не нуклеофільне заміщення, білки можна модифікувати з надзвичайно високою селективністю. Цю реакцію можна проводити при кімнатній температурі у водному середовищі з дуже доброю регіоселективністю (1,4>1,5) завдяки доданню до реакційної суміші каталітичних кількостей солей Cu(I). Дивись, наприклад, Tornøe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; та Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599. Іншим методом, який можна застосувати, є обмін ліганду на подвійній сполуці арсену на тетрацистеїновий мотив, дивись, наприклад, Griffin, et al., (1998) Science 281:269-272.

[325] Молекулою, яку можна додавати до білка за цим винаходом шляхом [3+2]-циклоприєднання, може бути фактично будь-яка молекула з азидною або алкінільною похідною. До цих молекул належать, але без обмеження ними, барвники, флуорофори, агенти для зшивання, похідні сахаридів, полімери (у тому числі, але без обмеження, похідні поліетиленгліколю), фотозшивальні агенти, цитотоксичні сполуки, афінні мітки, похідні біотину, смоли, гранули, другий білок або поліпептид (або декілька), полінуклеотид(-и) (у тому числі, але без обмеження, ДНК, РНК тощо), металохелати, кофактори, жирні кислоти, вуглеводи тощо. Ці молекули можна додавати до штучної амінокислоти з алкінільною групою, у тому числі, але без обмеження, п-пропаргілоксибенілаланіном або азидогрупою, у тому числі, але без обмеження, п-азидофенілаланіном, відповідно.

V. In vivo продукування поліпептидів bG-CSF, які містять штучно закодовані амінокислоти

[326] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна продукувати in vivo із застосуванням модифікованої тРНК та тРНК-синтетази для додання або заміни амінокислот, які не кодуються у природних системах.

[327] Способи продукування тРНК та тРНК-синтетази, в яких застосовують амінокислоти, які не кодуються природними системами, описані, наприклад, у патентах США № 7,045,337 та № 7,083,970, включених до цього опису шляхом посилання. Ці способи включають створення трансляційного механізму, який функціонує незалежно від синтетаз та тРНК, ендегенних для трансляційної системи (і які, унаслідок цього, подеколи називають "ортогональними"). Як правило, трансляційна система містить ортогональну тРНК (O-tRNA) та ортогональну аміноацил-тРНК-синтетазу (O-RS). Як правило, O-RS переважно аміноацилює O-tRNA щонайменше однією штучною амінокислотою у трансляційній системі, і O-tRNA розпізнає щонайменше один селекторний кодон, який не розпізнається іншими тРНК у системі. Трансляційна система, таким чином, вводить штучно закодовану амінокислоту до білка, який продукується у системі, у відповідь на закодований селекторний кодон, із "заміною", тим самим, амінокислоти у положенні у закодованому поліпептиді.

[328] Різноманітні ортогональні тРНК та аміноацил-тРНК-синтетази є відомими у цій галузі як прийнятні для введення конкретних синтетичних амінокислот до поліпептидів, які, у цілому, є прийнятними для застосування за цим винаходом. Наприклад, кетоспецифічні O-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетази описані у Wang L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003) та Zhang Z. et al., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003). Типові O-RS або їх фрагменти кодуються полінуклеотидними послідовностями і включають амінокислотні послідовності, описані у патентах США № 7,045,337 та № 7,083,970, кожен з яких включено до цього опису шляхом посилання. Відповідні молекули O-тРНК для застосування з O-RSs також описані у патентах США № 7,045,337 та № 7,083,970, які включені до цього опису шляхом посилання. Інші приклади пар O-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетази описані у WO 2005/007870, WO 2005/007624 та WO 2005/019415.

[329] Приклад азидоспецифічної O-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетази системи описаний у Chin J.W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002). До прикладів послідовностей O-RS для п-азидо-L-Phe належать, але без обмеження ними, нуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 14-16 та 29-32 і амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 46-48 та 61-64, описані у патенті США № 7,083,970, включеному до цього опису шляхом посилання. До прикладів послідовностей O-тРНК, придатних для застосування за цим винаходом, належать, але без обмеження ними,



нуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 1-3, описані у патенті США № 7,083,970, включеному до цього опису шляхом посилання. Інші приклади пар О-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетаза, специфічних для конкретних штучно закодованих амінокислот, описані у патенті США № 7,045,337, включеному до цього опису шляхом посилання. О-RS та О-тРНК, які вводять як

5 кето- так і азидовмісні амінокислоти до *S. cerevisiae*, описані у Chin J.W., et al., Science 301:964-967 (2003).

[330] Було повідомлено про декілька інших ортогональних пар. Були описані глутамінільна (дивись, наприклад, Liu D.R., and Schultz P.G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785), аспартильна (дивись, наприклад, Pastrnak M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286) та тирозильна (дивись, наприклад, Ohno S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; та Kowal A.K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) системи, які походять з тРНК та синтетаз *S. cerevisiae*, для потенційного введення штучних амінокислот до *E. coli*. Були описані системи, які походять із глутамінільної (дивись, наприклад, Kowal A.K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:2268-2273) та тирозильної (дивись, наприклад, Edwards H., and Schimmel P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) синтетаз *E. coli*, для застосування з

10 *S. cerevisiae*. Тирозильна система *E. coli* була застосована для введення 3-йодо-L-тироzinу in vivo до клітин ссавців. Дивись, Sakamoto K., et al., (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699.

[331] Застосування О-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетаз включає вибір специфічного кодону, який кодує штучно закодовану амінокислоту. Незважаючи на те, що можна застосовувати будь-який кодон, бажано, взагалі, вибирати кодон, який рідко або ніколи не застосовується у клітині, у якій експресується О-тРНК/аміноацил-тРНК-синтетаза. Наприклад, до прикладів кодонів належать нонсенс-кодон, такий як стоп-кодони (амбер, охра та опал), чотири- або декілька основних кодонів та інші природні трьохосновні кодони, які застосовуються рідко або не застосовуються зовсім.

25 [332] Специфічний(-і) селекторний(-і) кодон(-и) можна вводити у відповідні положення у кодувальній послідовності полінуклеотиду bG-CSF із застосуванням методів мутагенезу, відомих у цій галузі (у тому числі, але без обмеження, сайт-специфічного мутагенезу, кластерного мутагенезу, рестрикційно-селекційного мутагенезу тощо).

[333] Способи одержання компонентів біосинтетичного механізму білків, таких як О-RS, О-тРНК, та ортогональних пар О-тРНК/О-RS, які можна застосовувати для введення штучно закодованої амінокислоти, описані у 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). Способи та композиції для in vivo введення штучно закодованих амінокислот описані у патенті США № 7,045,337, включеному до цього опису шляхом посилання. Способи селекції ортогональних пар тРНК-тРНК-синтетаза для застосування у in vivo трансляційній системі організму також описані у патентах США № 7,045,337 та № 7,083,970, включених до цього опису шляхом посилання. У WO 04/035743 під назвою "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins", яка у повному обсязі включена до цього опису шляхом посилання, описані ортогональні пари RS та тРНК для введення кетоамінокислот. У WO 04/094593 під назвою "Expanding the Eukaryotic Genetic Code", яка у повному обсязі включена до цього опису шляхом посилання, описані ортогональні пари RS та тРНК для введення штучно закодованих амінокислот до еукаріотних клітин-хазяїв.

40 [334] Методи продукування щонайменше однієї рекомбінантної ортогональної аміноацил-тРНК-синтетази (О-RS) включають: (а) створення бібліотеки (факультативно мутантних) RS, які походять від щонайменше однієї аміноацил-тРНК-синтетази (RS) першого організму, у тому числі, але без обмеження, прокаріотного організму, такого як *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. Thermophilus* тощо, або еукаріотного організму; (b) селекцію (та/або скринінг) бібліотеки RS (факультативно мутантних RS) для виявлення членів, які аміноацилюють ортогональну тРНК (О-тРНК) у присутності штучно закодованої амінокислоти та природної амінокислоти, з одержанням, таким чином, пулу активних (факультативно мутантних) RS; та/або (c) селекцію (факультативно шляхом негативної селекції) пулу для визначення активних RS (у тому числі, але без обмеження, мутантних RS), які переважно аміноацилюють О-тРНК за відсутності штучно закодованої амінокислоти, із одержанням, таким чином, щонайменше однієї рекомбінантної О-RS; де щонайменше одна рекомбінантна О-RS переважно аміноацилює О-тРНК штучно закодованою амінокислотою.

50 [335] За одним із варіантів здійснення цього винаходу згаданою RS є інертна RS. Інертну RS можна одержати шляхом мутації активної RS. Наприклад, інертну RS можна одержати шляхом мутації із заміною щонайменше приблизно 1, щонайменше приблизно 2, щонайменше приблизно 3, щонайменше приблизно 4, щонайменше приблизно 5, щонайменше приблизно 6

або щонайменше приблизно 10 чи більше амінокислот на інші амінокислоти, у тому числі, але без обмеження, аланін.

[336] Бібліотеки мутантних RS можна одержати із застосуванням різних методів, відомих у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом раціонального конструювання на основі тривимірної структури білка RS або мутагенезу нуклеотидів RS за методом неспецифічного або раціонального конструювання. Наприклад, мутантні RS можна одержати шляхом сайт-специфічних мутацій, неспецифічних мутацій, рекомбінантних мутацій з одержанням різноманітності, химерних генно-інженерних конструкцій, раціонального конструювання та із застосуванням інших методів, описаних у цьому винаході або відомих у цій галузі.

[337] У одному з варіантів здійснення цього винаходу селекція (та/або скринінг) бібліотеки RS (факультативно мутантних RS) для виявлення членів, які є активними, у тому числі, але без обмеження, які аміноацилюють ортогональну tPHK (O-tPHK) у присутності штучно закодованої амінокислоти та природної амінокислоти, включає: введення позитивного маркера селекції або скринінгового маркера, у тому числі, але без обмеження, гена стійкості до антибіотиків, і подібних маркерів, та бібліотеки (факультативно мутантних) RS до множини клітин, де згаданий позитивний маркер селекції та/або скринінговий маркер містить щонайменше один селекторний кодон, у тому числі, але без обмеження, амбер-, охра- або опал-кодон; культивування множини клітин у присутності селекційного агента; ідентифікування клітин, які вижили (або демонструють специфічну реакцію) у присутності селекційного та/або скринінгового агента шляхом супресії щонайменше одного селекторного кодону у позитивного маркера селекції або скринінгового маркера, з одержанням, таким чином, субпопуляції позитивно селектованих клітин, яка містить пул активних (факультативно мутантних) RS. Факультативно концентрація селекційного та/або скринінгового агента може змінюватись.

[338] За одним з аспектів цього винаходу позитивним маркером селекції є ген хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT), а селекторним кодоном є амбер стоп-кодон у гені CAT. Факультативно позитивним маркером селекції є ген  $\beta$ -лактамази, а селекторним кодоном є амбер стоп-кодон у гені  $\beta$ -лактамази. За іншим аспектом цього винаходу позитивний скринінговий маркер являє собою флуоресцентний або люмінесцентний скринінговий маркер або афінний скринінговий маркер (у тому числі, але без обмеження, клітинно-поверхневий маркер).

[339] У одному з варіантів здійснення цього винаходу негативна селекція або скринінг пулу для виявлення активних RS (факультативно мутантів), які переважно аміноацилюють O-tPHK за відсутності штучно закодованих амінокислот, включає: введення негативного маркера селекції або скринінгового маркера з пулом активних (факультативно мутантних) RS з етапу позитивної селекції або скринінгу до множини клітин другого організму, де негативний маркер селекції або скринінговий маркер містить щонайменше один селекторний кодон (у тому числі, але без обмеження, ген стійкості до антибіотиків, у тому числі, але без обмеження, ген хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT)); та ідентифікування клітин, які вижили або демонструють специфічну скринінгову реакцію у першому середовищі, доповненому штучно закодованою амінокислотою та скринінговим або селекційним агентом, але не змогли вижити або продемонструвати специфічної реакції у другому середовищі, не доповненому штучно закодованою амінокислотою та селекційним або скринінговим агентом, з одержанням, таким чином, клітин, які вижили або відібраних клітин із щонайменше однією рекомбінантною O-RS. Наприклад, методика ідентифікування CAT факультативно відіграє роль позитивної селекції та/або негативного скринінгу при визначенні відповідних рекомбінантів O-RS. Наприклад, пул клонів факультативно реплікується на культуральних планшетах, які містять CAT (що містить щонайменше один селекторний кодон) з або без однієї або декількох штучно закодованих амінокислот. Клони, які ростуть виключно на планшетах, які містять штучно закодовані амінокислоти, таким чином, вважаються за такі, які містять рекомбінантну O-RS. За одним з аспектів цього винаходу концентрація селекційного (та/або скринінгового) агента змінюється. За деякими аспектами цього винаходу перший та другий організм є різними. Так, перший та/або другий організм факультативно являє собою прокариот, еукариот, ссавця, *Escherichia coli*, гриби, дріжджі, архебактерію, еубактерію, рослину, комаху, протист тощо. У інших варіантах здійснення цього винаходу скринінговий маркер являє собою флуоресцентний або люмінесцентний скринінговий маркер чи афінний скринінговий маркер.

[340] В іншому варіанті здійснення цього винаходу скринінг або селекція пулу (у тому числі, але без обмеження, негативна селекція) пулу для віднаходження активних (факультативно мутантних) RS включає: ізоляцію пулу активних мутантних RS з етапу позитивної селекції (b); введення негативного маркера селекції або скринінгового маркера, де негативний маркер селекції або скринінговий маркер містить щонайменше один селекторний кодон (у тому числі,

але без обмеження, ген-маркер токсичності, у тому числі, але без обмеження, ген бактеріальної рибонуклеази (барнази), який містить щонайменше один селекторний кодон), та пулу активних (факультативно мутантних) RS до множини клітин другого організму; та ідентифікування клітин, які вижили або демонструють специфічну скринінгову реакцію у першому середовищі, не доповненому штучно закодованою амінокислотою, але не змогли вижити або продемонструвати специфічної скринінгової реакції у другому середовищі, доповненому штучно закодованою амінокислотою, з одержанням, таким чином, клітин, які вижили, або відібраних клітин із щонайменше однією рекомбінантною O-RS, де щонайменше одна рекомбінантна O-RS є специфічною для штучно закодованої амінокислоти. За одним з аспектів цього винаходу згаданий щонайменше один селекторний кодон являє собою приблизно два або більше селекторних кодонів. Такі варіанти здійснення цього винаходу факультативно можуть включати варіанти, де щонайменше один селекторний кодон являє собою два або більше селекторних кодонів, і де перший та другий організм є різними (у тому числі, але без обмеження, кожний організм є факультативно прокаріотом, еукаріотом, ссавцем, *Escherichia coli*, грибами, дріжджами, археобактерією, еубактерією, рослиною, комахою, протистом тощо). Окрім того, деякі аспекти включають варіанти, де маркер негативної селекції являє собою ген бактеріальної рибонуклеази (барнази) (який являє собою щонайменше один селекторний кодон). Інші аспекти включають варіанти, де скринінговий маркер факультативно являє собою флуоресцентний або люмінесцентний скринінговий маркер чи афінний скринінговий маркер. У одному з варіантів здійснення цього винаходу, наведеним у цьому описі, процедури скринінгу або селекції факультативно включають зміну суворості умов скринінгу та/або селекції.

[341] У одному з варіантів здійснення цього винаходу методи продукування щонайменше однієї рекомбінантної ортогональної аміноацил-тРНК-синтетази (O-RS) можуть також включати: (d) ізоляцію щонайменше однієї рекомбінантної O-RS; (e) одержання другого набору O-RS (факультативно мутованої) із щонайменше однією рекомбінантною O-RS; та (f) повторення етапів (b) та (c) до одержання мутованої O-RS, здатної до переважного аміноацилювання O-тРНК. Факультативно стадії (d)-(f) повторюють, у тому числі, але без обмеження, щонайменше приблизно двічі. За одним з аспектів цього винаходу другий набір O-RS із щонайменше однієї рекомбінантної O-RS можна одержати шляхом мутагенезу, у тому числі, але без обмеження, неспецифічного мутагенезу, сайт-специфічного мутагенезу, рекомбінаційного або їх комбінації.

[342] Суворість умов етапів селекції/скринінгу, у тому числі, але без обмеження, етапу (b) позитивної селекції/скринінгу, етапу (c) негативної селекції/скринінгу або обох етапів (b) та (c) позитивної та негативної селекції/скринінгу, у вищеописаних методах факультативно включає зміну суворості умов селекції/скринінгу. В іншому варіанті здійснення цього винаходу етап (b) позитивної селекції/скринінгу, етап (c) негативної селекції/скринінгу або обидва етапи (b) та (c) позитивної та негативної селекції/скринінгу включають застосування репортера, де згаданий репортер виявляють за допомогою клітинного сортера зі збудженням флуоресценції (FACS) або де згаданий репортер виявляють за допомогою люмінесценції. Факультативно репортер проявляють на клітинній поверхні, фаговим дисплеєм або подібним способом, і вибирають на основі спорідненості або каталітичної активності із застосуванням штучно закодованої амінокислоти або аналога. У одному з варіантів здійснення цього винаходу мутовану синтетазу проявляють на клітинній поверхні, фаговим дисплеєм або подібним способом.

[343] Способи продукування рекомбінантної ортогональної тРНК (O-тРНК) включають: (a) одержання бібліотеки мутантних тРНК із щонайменше однієї тРНК, у тому числі, але без обмеження, супресорної тРНК, з першого організму; (b) селекцію (у тому числі, але без обмеження, негативну селекцію) або скринінг бібліотеки для виявлення (факультативно мутованих) тРНК, які аміноацилюються аміноацил-тРНК-синтетазою (RS) з другого організму за відсутності RS з першого організму, з одержанням, таким чином, пулу тРНК (факультативно мутованих); та (c) селекція або скринінг пулу тРНК (факультативно мутованих) для виявлення членів, які аміноацилюються введеною ортогональною RS (O-RS), з одержанням, таким чином, щонайменше однієї рекомбінантної O-тРНК; де щонайменше одна рекомбінантна O-тРНК розпізнає селекторний кодон і неефективно розпізнається RS з другого організму й переважно аміноацилюється O-RS. В деяких варіантах здійснення цього винаходу згадана щонайменше одна тРНК є супресорною тРНК та/або містить унікальний трьохосновний кодон із природних та/або штучних основ або є нонсенс-кодоном, рідкісним кодоном, штучним кодоном, кодоном, який містить щонайменше 4 основи, амбер-кодоном, охра-кодоном або опал стоп-кодоном. У одному з варіантів здійснення цього винаходу рекомбінантна O-tRNA має поліпшену ортогональність. Слід мати на увазі, що в деяких варіантах здійснення цього винаходу O-тРНК факультативно імпортують до першого організму з другого організму без необхідності модифікування. За різними варіантами здійснення цього винаходу перший та другий організми є

або однаковими або різними і факультативно вибраними з групи, до складу якої входять, у тому числі, але без обмеження, прокаріоти (у тому числі, але без обмеження, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium* тощо), еукаріоти, ссавці, гриби, дріжджі, археобактерії, еубактерії, рослини, комахи, протисти тощо.

5 Окрім того, рекомбінантна тРНК факультативно аміноацилюють штучно закодованою амінокислотою, де згадану штучно закодовану амінокислоту біосинтезують *in vivo* природним шляхом або шляхом генетичної маніпуляції. Згадану штучно закодовану амінокислоту факультативно додають до середовища для вирощування щонайменше першого або другого організму.

10 [344] За одним з аспектів цього винаходу селекція (у тому числі, але без обмеження, негативна селекція) або скринінг бібліотеки для виявлення (факультативно мutowаних) тРНК, які аміноацилюються аміноацил-тРНК-синтетазою (етап (b)), включає: введення гена-маркера токсичності, де згаданий ген-маркер токсичності містить щонайменше один із селекторних кодонів (або ген, який призводить до продукування токсичного або статичного агента, чи ген, незамінний для організму, де такий ген-маркер містить щонайменше один селекторний кодон),  
15 та бібліотеки (факультативно мутантних) тРНК до множини клітин другого організму; та селекцію клітин, які вижили, де клітини, які вижили, містять пул (факультативно мутантних) тРНК, який містить щонайменше одну ортогональну тРНК або нефункціональну тРНК. Наприклад, клітини, які вижили, можна відбирати із застосуванням аналізу порівняння  
20 коефіцієнтів густини клітин.

[345] За іншим аспектом цього винаходу ген-маркер токсичності може містити два або декілька селекторних кодонів. За іншим варіантом здійснення згаданих методів ген-маркер токсичності є геном бактеріальної рибонуклеази (барнази), де згаданий ген бактеріальної рибонуклеази (барнази) містить щонайменше один амбер-кодон. Факультативно ген  
25 бактеріальної рибонуклеази (барнази) може містити два або декілька амбер-кодонів.

[346] У одному з варіантів здійснення цього винаходу селекція або скринінг пулу (факультативно мутантних) тРНК для виявлення членів, які аміноацилюються введеною ортогональною RS (O-RS), може включати: введення позитивного гена-маркера селекції або скринінгового гена-маркера, де позитивний ген-маркер містить ген стійкості до лікарської речовини (у тому числі, але без обмеження, ген  $\beta$ -лактамази, який містить щонайменше один із селекторних кодонів, таких як щонайменше один амбер стоп-кодон) або ген, незамінний для організму, чи ген, який призводить до детоксифікації токсичного агента, разом з O-RS, та пулу (факультативно мутантних) тРНК до множини клітин другого організму; та ідентифікацію клітин,  
30 які вижили, або відібраних клітин, які вирости у присутності селекційного або скринінгового агента, у тому числі, але без обмеження, антибіотика, з одержанням, таким чином, пулу клітин, які мають щонайменше одну рекомбінантну тРНК, де щонайменше одна рекомбінантна тРНК аміноацилюється O-RS, і введення амінокислоти до трансляційного продукту, який кодується позитивним геном-маркером у відповідь на щонайменше один із селекторних кодонів. В іншому варіанті здійснення цього винаходу концентрація селекційного та/або скринінгового агента  
40 змінюється.

[347] Запропоновані способи одержання специфічних пар O-тРНК/O-RS. Способи включають: (a) одержання бібліотеки мутантних тРНК із щонайменше однієї тРНК першого організму; (b) негативну селекцію або скринінг бібліотеки для виявлення (факультативно мутантних) тРНК, які аміноацилюються аміноацил-тРНК-синтетазою (RS) другого організму за відсутності RS першого організму, з одержанням, таким чином, пулу (факультативно мутантних) тРНК; (c) селекцію або скринінг пулів (факультативно мутантних) тРНК для виявлення членів, які аміноацилюються введеною ортогональною (O-RS), з одержанням, таким чином, щонайменше однієї рекомбінантної O-тРНК. Згадана щонайменше одна рекомбінантна O-tRNA розпізнає селекторний кодон і неефективно розпізнається RS другого організму та переважно аміноацилюється O-RS. Згаданий спосіб також включає (d) одержання бібліотеки (факультативно мутантних) RS із щонайменше однієї аміноацил-тРНК-синтетази (RS) третього організму; (e) селекцію або скринінг бібліотеки мутантних RS для виявлення членів, які переважно аміноацилюють щонайменше одну рекомбінантну O-тРНК у присутності штучно закодованої амінокислоти та природної амінокислоти, з одержанням, таким чином, пулу  
55 активних (факультативно мутантних) RS; та (f) негативну селекцію або скринінг пулу для виявлення активних (факультативно мутантних) RS, які переважно аміноацилюють щонайменше одну рекомбінантну O-тРНК за відсутності штучно закодованої амінокислоти, з одержанням, таким чином, щонайменше однієї специфічної пари O-тРНК/O-RS, де згадана щонайменше одна специфічна пара O-тРНК/O-RS містить щонайменше одну рекомбінантну O-RS, яка є специфічною для штучно закодованої амінокислоти, та щонайменше однієї рекомбінантної O-

тРНК. Цей винахід охоплює специфічні пари О-тРНК/О-RS, одержані за допомогою згаданих способів. Наприклад, специфічна пара О-тРНК/О-RS може включати, у тому числі, але без обмеження, пару мутРНК<sup>Tyr</sup>-мут<sup>Tyr</sup>RS, таку як пара мутРНК<sup>Tyr</sup>-SS12<sup>Tyr</sup>RS, пара мутРНК<sup>Leu</sup>-мут<sup>Leu</sup>RS, пара мутРНК<sup>Thr</sup>-мут<sup>Thr</sup>RS, пара мутРНК<sup>Glu</sup>-мут<sup>Glu</sup>RS тощо. На додаток до цього, такі способи включають спосіб, де перший та третій організми є однаковими (у тому числі, але без обмеження, *Methanococcus jannaschii*).

[348] Цей винахід включає також способи селекції пари ортогональної тРНК-тРНК-синтетази для застосування у *in vivo* трансляційній системі другого організму. Згадані способи включають: введення гена-маркера, тРНК та аміноацил-тРНК-синтетази (RS), ізольованої або одержаної з першого організму, до першої популяції клітин другого організму; введення гена-маркера та тРНК до другої популяції клітин другого організму; та селекцію клітин, які вижили у першій популяції, які не виживають у другій популяції клітин, або скринінг клітин, які демонструють специфічну скринінгову реакцію, якої не демонструють у другій популяції клітин, де перша популяція та друга популяція клітин культивуються у присутності селекційного або скринінгового агента, де клітини, які вижили, або відібрані клітини містять пару ортогональної тРНК-тРНК-синтетази для застосування у *in vivo* трансляційній системі другого організму. У одному з варіантів здійснення цього винаходу порівняння та селекція або скринінг включає *in vivo* аналіз на комплементарність. Концентрація селекційного або скринінгового агента може змінюватись.

[349] Організмами за цим винаходом є різноманітні організми у різноманітних комбінаціях. Наприклад, першим та другим організмами у способах за цим винаходом можуть бути однакові або різні організми. У одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданими організмами факультативно є прокаріотний організм, у тому числі, але без обмеження, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* тощо. Альтернативно згадані організми факультативно являють собою еукаріотний організм, у тому числі, але без обмеження, рослини (у тому числі, але без обмеження, складні рослини, такі як однодольні або дводольні), водорості, протисти, гриби (у тому числі, але без обмеження, дріжджі тощо), тварини (у тому числі, але без обмеження, ссавці, комахи, членистоногі тощо) та подібні організми. В іншому варіанті здійснення цього винаходу другим організмом є прокаріотний організм, у тому числі, але без обмеження, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* тощо. Альтернативно другим організмом може бути еукаріотний організм, у тому числі, але без обмеження, дріжджі, тваринна клітина, рослинна клітина, гриб, клітина ссавця тощо. За різними варіантами здійснення, перший та другий організми є різними.

#### IV. Місцезнаходження штучних амінокислот у поліпептидах bG-CSF

[350] Цей винахід передбачає введення однієї або декількох штучних амінокислот до поліпептидів bG-CSF. Одна або декілька штучних амінокислот можуть бути введені до конкретного положення, яке не порушує активності поліпептиду. Це можна зробити шляхом "консервативних" заміन, у тому числі, але без обмеження, шляхом заміни гідрофобних амінокислот гідрофобними амінокислотами, великих амінокислот великими амінокислотами, гідрофільних амінокислот гідрофільними амінокислотами та/або шляхом введення штучної амінокислоти у таке положення, яке не є необхідним для активності.

[351] Різні біохімічні та структурні варіанти підходів можуть застосовуватись для вибору бажаних ділянок для заміни штучно закодованою амінокислотою у межах поліпептиду bG-CSF. Фахівцям у цій галузі легко зрозуміло, що будь-яке положення поліпептидного ланцюга є прийнятним для вибору з метою введення штучно закодованої амінокислоти, і вибір може базуватись на раціональному конструюванні або на довільному виборі з будь-якою або без жодної конкретної бажаної мети. Вибір необхідних ділянок можна робити для одержання молекули bG-CSF, яка має будь-яку бажану властивість або активність, у тому числі, але без обмеження, агоністів, суперагоністів, зворотних агоністів, антагоністів, модуляторів зв'язування рецепторів, модуляторів активності рецепторів, утворення димеру або мультимеру, без зміни активності або властивості, порівняно з нативною молекулою або для маніпулювання будь-якою фізичною або хімічною властивістю поліпептиду, такою як розчинність, агрегування або стабільність. Наприклад, місцезнаходження у поліпептиді, необхідні для біологічної активності поліпептидів bG-CSF, можна ідентифікувати із застосуванням точкового мутаційного аналізу, дослідження з аланін-сканувальним мутагенезом, насичувального мутагенезу та скринінгу на біологічну активність або методів гомолог-сканувального мутагенезу, відомих у цій галузі. До інших способів, які можна застосовувати для ідентифікування залишків для модифікації поліпептидів bG-CSF, належать, але без обмеження ними, спосіб профілювання послідовностей, спосіб вибору бібліотек ротамерів, спосіб визначення потенціалу пар залишків

та спосіб раціонального конструювання із застосуванням методу Protein Design Automation®. (Дивись патенти США № 6,188,965; № 6,269,312; № 6,403,312; та WO98/47089, які включені до цього опису шляхом посилання). Залишки, які є критичними для біологічної активності bG-CSF, залишки, які приймають участь у фармацевтичній стабільності, антигенні детермінанти або рецептор-зв'язувальні залишки можна піддавати мутації. У патентах США № 5,580,723; № 5,834,250; № 6,013,478; № 6,428,954 та № 6,451,561, які включені до цього опису шляхом посилання, описані способи систематичного аналізу структури та функції поліпептидів, такі як bG-CSF, шляхом ідентифікування активних доменів, які впливають на активність поліпептиду з речовиною-мішенню. Дослідження G-CSF з аланін-сканувальним мутагенезом описані у Reidhaar-Olson J.F. et al., *Biochemistry* (1996) *Jul.* 16;35(28):9034-9041, Young D.C. et al. *Protein Sci.* (1997) *Jun.*; 6(6):1228-1236, та Layton et al. (1997) *JBC* 272(47):29735-29741. Залишки, окрім тих, які ідентифіковані як критичні для біологічної активності за результатами аланін- або гомолог-сканувального мутагенезу, можуть бути прийнятними кандидатами для заміни штучно закодованими амінокислотами, у залежності від бажаної активності, яку повинен мати поліпептид. Альтернативно ділянки, ідентифіковані як критичні для біологічної активності, можуть також бути прийнятними кандидатами для заміни штучно закодованими амінокислотами, що знову ж таки залежить від бажаної активності, яку повинен мати поліпептид. Іншою альтернативою було б просте здійснення послідовних заміन у кожному положенні поліпептидного ланцюга штучно закованою амінокислотою і спостереженням впливу, якого зазнають активності поліпептиду. Фахівцям у цій галузі цілком зрозуміло, що будь-який засіб, метод або спосіб вибору положення для заміни штучною амінокислотою у будь-якому поліпептиді є прийнятним для застосування за цим винаходом.

[352] Структура та активність поліпептидів-мутантів bG-CSF, які містять делеції, можна також досліджувати для визначення ділянок білка, які, ймовірно, будуть толерантними до заміни штучно закованою амінокислотою. Подібним чином, розщеплення протеази та моноклональні антитіла можна застосовувати для визначення ділянок bG-CSF, які несуть відповідальність за зв'язування рецептора. Layton et al. (2001) *JBC* 276 (39) 36779-36787 описує застосування антитіл для досліджень із hG-CSF та його рецептором. Після видалення залишків, які, ймовірно, були б нетолерантними до заміни штучно закодованими амінокислотами, можна перевіряти вплив запропонованих замін на кожному із залишкових положень. Моделі можна розробити за тривимірними кристалічними структурами інших членів родини CSF та рецепторів CSF. Protein Data Bank (PDB, доступний у мережі Інтернету за адресою rcsb.org) являє собою централізовану базу даних, яка містить тривимірні структурні дані великих молекул білків та нуклеїнових кислот. Моделі можна розробити шляхом дослідження вторинної та третинної структури поліпептидів, у разі недоступності тривимірних структурних даних. Рентгенівська кристалічна та ЯМР структури hG-CSF є доступними у Protein Data Bank за номером PDB: 1CD9, 1PGR, 1RHG, 1GNC, а також у патентах США № 5,581,476 та № 5,790,421, які включені до цього опису шляхом посилання. Таким чином, фахівці у цій галузі зможуть легко ідентифікувати амінокислотні положення, які можуть бути замінені штучно закодованими амінокислотами.

[353] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF за цим винаходом містять одну або декілька штучних амінокислот, розміщених на ділянці білка, яка не порушує структури поліпептиду.

[354] Прикладами залишків для введення штучно закованої амінокислоти можуть бути ті залишки, які є виключеними з потенційних ділянок зв'язування рецептора, можуть бути частково або повністю відкриті розчинником, мають мінімальні або не мають будь-яких взаємодій, обумовлених водневим зв'язуванням із розміщеними поблизу залишками, можуть бути мінімально відкритими для розміщених поблизу реакційноздатних залишків, можуть локалізуватись на одній або декількох відкритих поверхнях, можуть бути сайтом або сайтами, які розміщені поряд з другим bG-CSF або іншою молекулою чи її фрагментом, можуть бути на ділянках, які мають високу гнучкість або є структурно жорсткими, як прогнозується тривимірною, вторинною, третинною або четвертинною структурою bG-CSF, зв'язаними або незв'язаними зі своїм рецептором або сполученими чи не сполученими з іншою біологічно активною молекулою, або можуть модулювати конформацію самого bG-CSF чи димера або мультимера, який містить один або декілька bG-CSF шляхом зміни гнучкості або жорсткості повної структури, за бажанням.

[355] Фахівцю у цій галузі зрозуміло, що таке дослідження bG-CSF надає можливість визначення, які амінокислотні залишки є локалізованими на поверхні, у зіставленні з амінокислотними залишками, які є зануреними у третинній структурі білка. Таким чином,

прикладом здійснення цього винаходу є заміна штучно закодованою амінокислотою амінокислоти, яка являє собою локалізований на поверхні залишок.

[356] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох із наведених нижче положень у bG-CSF: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка) та будь-якої їхньої комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[357] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох із наведених нижче положень 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, та будь-якої їх комбінації послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та будь-якої їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166, та будь-якої їх комбінації послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до положення 62 bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до положення 133 bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид за цим винаходом містить заміну, додання або делецію однієї або декількох природних амінокислот. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучних амінокислот введені до лідерної або сигнальної послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1), і згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот не містить(-ять) гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину, фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 2), і згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот не містить(-ять) гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину, фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо. В деяких варіантах здійснення цього винаходу амінокислотою, введеною до положення 133 послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідного положення послідовності SEQ ID NO: 2 є амінокислота, яка відрізняється від гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину, фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо.

[358] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені за допомогою рибосом до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1), і згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот не містить(-ять) гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину,

фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені за допомогою

5 рибосом до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 2), і згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот не містить(-ять) гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину, фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо. В деяких варіантах здійснення цього винаходу амінокислотою, введеною

10 за допомогою рибосом до положення 133 послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідного положення послідовності SEQ ID NO: 2 є амінокислота, яка відрізняється від гістидину, аргініну, лізину, ізолейцину, фенілаланіну, лейцину, триптофану, аланіну, цистеїну, аспарагіну, валіну, гліцину, серину, глутаміну, тирозину, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, треоніну або

15 природної непротеогенної амінокислоти, такої як  $\beta$ -аланін, орнітин тощо. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1), де згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот має або мають функціональну групу або групи, які не розпізнаються ендогенною RS. В деяких варіантах

20 здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введені до одного або декількох положень bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 2), де згадана одна штучно закодована амінокислота або декілька штучно закодованих амінокислот має або мають функціональну групу або групи, які не розпізнаються ендогенною RS. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом має амінокислоту, введenu до

25 положення 133 послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідного положення послідовності SEQ ID NO: 2, де згадана амінокислота має функціональну групу або групи, які не розпізнаються ендогенною RS. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом має параацетилфенілаланін, введений до положення 133 послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідного положення послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах

30 здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом має параамінофенілаланін, введений до положення 133 послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідного положення послідовності SEQ ID NO: 2.

[359] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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,

40 115, 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та у будь-якій їхній комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні

45 амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[360] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, та у будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або

50 відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та у будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному

55 або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 62, 133, 166, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному

60 або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні



амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 62 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 133 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у лідерній або сигнальній послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF є сполученою з водорозчинним полімером.

[361] Результати вивчення кристалічної структури bG-CSF або члену(-ів) родини bG-CSF та їх взаємодії з рецептором G-CSF можуть вказати, які з певних амінокислотних залишків мають бічні ланцюги, повністю або частково доступні для розчинника. Бічний ланцюг штучно закодованої амінокислоти у цих положеннях може спрямовуватись від поверхні білка у бік розчинника.

[362] Найрізноманітніші штучно закодовані амінокислоти можна замінювати або вводити до певного положення поліпептиду bG-CSF. Взагалі, конкретну штучно закодовану амінокислоту вибирають для введення, виходячи з результатів вивчення тривимірної кристалічної структури поліпептиду bG-CSF або іншого члену родини G-CSF з його рецептором, з відданням переваги консервативним замінам (тобто штучно закодованим амінокислотам на основі арилу, таким як заміна Phe, Tyr або Trp п-ацетилфенілаланіном або О-пропаргілтирозином) та специфічній хімії кон'югування, за якою бажано здійснювати введення до поліпептиду bG-CSF (наприклад, введення 4-азидофенілаланіну, якщо необхідно здійснити реакцію [3+2]-циклоприєднання Хьюсена з водорозчинним полімером, який несе алкінову складову, або утворення амідного зв'язку з водорозчинним полімером, який несе арильний складний ефір, який, у свою чергу, містить фосфінову складову).

[363] У одному з варіантів здійснення цього винаходу спосіб також включає введення до білка штучної амінокислоти, яка містить першу реакційноздатну групу; та введення в контакт білка з молекулою (у тому числі, але без обмеження, гідроксіалкілкрохмалю (HAS), гідроксіетилкрохмалю (HES), мітки, барвника, полімеру, водорозчинного полімеру, похідної поліетиленгліколю, фотозшивального агента, радіонукліда, цитотоксичної сполуки, лікарської речовини, афінної мітки, фотоафінної мітки, реакційноздатної сполуки, смоли, другого білка або поліпептиду чи аналога поліпептиду, антитіла або фрагмента антитіла, металохелату, кофактора, жирної кислоти, вуглеводу, полінуклеотиду, ДНК, РНК, антисмислового полінуклеотиду, сахариду, водорозчинного дендримера, циклодекстрину, інгібуючої рибонуклеїнової кислоти, біоматеріалу, наночастинки, спінової мітки, флуорофору, металовмісної складової, радіоактивної складової, нової функціональної групи, групи, яка ковалентно або нековалентно взаємодіє з іншими молекулами, фотореактивної складової, групи, яка збуджується фотохімічноактивним випромінюванням, складової, здатної до фотоізомеризації, біотину, похідної біотину, аналога біотину, складової, яка містить важкий атом, хімічно розщеплюваної групи, фоторозщеплюваної групи, подовженого бічного ланцюга, цукру, приєданого до атомом вуглецю, окиснювально-відновлювального засобу, тіоамінокислоти, токсичної складової, складової, міченої радіоактивною міткою, біофізичного зонда, фосфоресцентної групи, хемілюмінесцентної групи, групи з високою електронною густиною, магнітної групи, інтеркаляційної групи, хромофору, енергопередавального засобу, біологічно активного засобу, виявної мітки, невеликої молекули, квантової точки, нанопередавача, радіонуклеотиду, радіопередавача, нейтронзахватної речовини або будь-якої комбінації вищенаведеного або будь-якої іншої необхідної сполуки або речовини), що містить другу реакційноздатну групу. Перша реакційноздатна група реагує з другою реакційноздатною групою з приєднанням молекули до штучної амінокислоти шляхом [3+2]-циклоприєднання. У одному з варіантів здійснення цього винаходу першою реакційноздатною групою є алкінільна або азидна складова, а другою реакційноздатною групою є азидна або алкінільна складова. Наприклад, першою реакційноздатною групою є алкінільна складова (у тому числі, але без обмеження, у штучній амінокислоті, п-пропаргілоксифенілаланіні), а другою реакційноздатною групою є азидна складова. За іншим прикладом першою реакційноздатною групою є азидна складова (у тому числі, але без обмеження, у штучній амінокислоті, п-азидо-L-фенілаланіні), а другою реакційноздатною групою є алкінільна складова.

[364] В деяких варіантах здійснення цього винаходу заміна(-и) штучно закодованою(-ими) амінокислотою(-ами) буде комбінуватись з іншими доданнями, замінами або делеціями у межах поліпептиду bG-CSF для впливання на інші біологічні властивості поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу інші додання, заміни або делеції можуть підвищувати стабільність (у тому числі, але без обмеження, стійкість до протеолітичного розщеплення)

поліпептиду bG-CSF або підвищувати спорідненість поліпептиду bG-CSF до його рецептора. В деяких варіантах здійснення цього винаходу інші додання, заміни або делеції можуть підвищувати фармацевтичну стабільність поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу інші додання, заміни або делеції можуть підвищувати біологічну активність поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу інші додання, заміни або делеції можуть підвищувати розчинність (у тому числі, але без обмеження, у разі експресії у *E. coli* або інших клітинах-хазяях) поліпептиду bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу заміни або делеції можуть підвищувати розчинність поліпептиду bG-CSF у разі експресії у *E. coli* або інших клітинах-хазяях. В деяких варіантах здійснення цього винаходу вибирають ділянки для заміни природною або штучно закодованою амінокислотою на додаток до іншої ділянки для введення штучної амінокислоти, результатом чого є підвищення розчинності поліпептиду у разі експресії у *E. coli* або інших клітинах-хазяях. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF містить інші додання, заміну або делецію, які модулюють спорідненість до рецептора, зв'язування білків або відповідного ліганду, модулює трансдукцію сигналів після зв'язування з рецептором, модулює період напіввиведення з плазми, модулює виділення або біодоступність, полегшує очищення або поліпшує чи змінює конкретний шлях введення. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF містять додання, заміну або делецію, які підвищують спорідненість варіанту bG-CSF до його рецептора. Подібним чином, поліпептиди bG-CSF можуть містити послідовності хімічного або ферментативного розщеплення, послідовності протеазного розщеплення, реакційноздатні групи, антитілозв'язувальні ділянки (у тому числі, але без обмеження, FLAG або полі-His) або інші послідовності на основі спорідненості (у тому числі, але без обмеження, FLAG, полі-His, GST тощо) або зв'язані молекули (у тому числі, але без обмеження, біотин), які поліпшують виявлення (у тому числі, але без обмеження, GFP), очищення, транспортування через тканини або клітинні мембрани, виділення або активацію проліків, зменшення розміру bG-CSF або інші властивості поліпептиду.

[365] В деяких варіантах здійснення цього винаходу результатом заміни штучно закодованою амінокислотою є одержання антагоніста bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу заміна або додання штучно закодованої амінокислоти відбувається на ділянці, яка приймає участь у зв'язуванні рецептора. В деяких варіантах здійснення цього винаходу антагоністи bG-CSF містять щонайменше одну заміну, в результаті якої bG-CSF відіграє роль антагоніста. В деяких варіантах здійснення цього винаходу антагоніст bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту, приєднану до водорозчинного полімеру, присутнього на ділянці зв'язування рецептора молекули bG-CSF.

[366] В деяких варіантах здійснення цього винаходу результатом заміни штучно закодованою амінокислотою є одержання антагоніста bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу антагоніст bG-CSF містить штучно закодовану амінокислоту, приєднану до водорозчинного полімеру, присутнього на ділянці зв'язування рецептора молекули bG-CSF.

[367] В деяких варіантах здійснення цього винаходу 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше амінокислот замінені однією або декількома штучно закодованими амінокислотами. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF також містить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше замін природних амінокислот штучно закодованими амінокислотами. Наприклад, в деяких варіантах здійснення цього винаходу один або декілька залишків bG-CSF замінують однією або декількома штучно закодованими амінокислотами. В деяких варіантах здійснення цього винаходу один або декілька штучно закодованих залишків приєднані до одного або декількох низькомолекулярних лінійних або розгалужених поліетиленгліколів, результатом чого є підвищення зв'язувальної спорідненості та порівнянного періоду напіввиведення з плазми, порівняно з видами, приєднаними до одного високомолекулярного поліетиленгліколю.

[368] В деяких варіантах здійснення цього винаходу до двох послідовних залишків bG-CSF замінені однією або декількома штучно закодованими амінокислотами.

#### VII. Експресія у нееукаріотах та еукаріотах

[369] Для одержання високорівневої експресії клонованого полінуклеотиду bG-CSF, полінуклеотиди, які кодують поліпептид bG-CSF за цим винаходом, субклонують, як правило, у експресійному векторі, який містить сильний промотор для спрямування транскрипції, термінатор транскрипції/трансляції, а у разі нуклеїнової кислоти, яка кодує білок, сайт зв'язування рибосом для ініціювання трансляції. Прийнятні бактеріальні промотори відомі фахівцям у цій галузі і описані, наприклад, у Sambrook et al. та Ausubel et al.

[370] Бактеріальні експресійні системи для експресії поліпептидів bG-CSF за цим винаходом є доступними, у тому числі, але без обмеження, у *E. coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* та *Salmonella* (Palva et al., Gene 22:229-235

(1983); Mosbach et al., Nature 302:543-545 (1983)). Комерційно доступними є набори для таких експресійних систем. Еукаріотні експресійні системи для клітин ссавців, дріжджів та клітин комах є відомими фахівцям у цій галузі і також є комерційно доступними. У тому разі, коли для експресії поліпептидів bG-CSF за цим винаходом застосовують ортогональні tРНК та

5 аміноацил-tРНК-синтетази (описані вище), клітини-хазяї для експресії вибирають на основі їх здатності до застосування ортогональних компонентів. До прикладів клітин-хазяїв належать

грампозитивні бактерії (у тому числі, але без обмеження, *B. brevis*, *B. subtilis* або *Streptomyces*) та грамнегативні бактерії (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), а також дріжджові та інші еукаріотні клітини. Клітини, які містять пари О-

10 tРНК/O-RS, можна застосовувати як описано у цьому винаході.

[371] Еукаріотна клітина-хазяїн або нееукаріотна клітина-хазяїн за цим винаходом надає можливість синтезування білків, які містять штучні амінокислоти, у великих необхідних кількостях. За одним з аспектів цього винаходу композиція факультативно містить, у тому числі, але без обмеження, щонайменше 10 мкг, щонайменше 50 мкг, щонайменше 75 мкг, щонайменше 100 мкг, щонайменше 200 мкг, щонайменше 250 мкг, щонайменше 500 мкг, щонайменше 1 мг, щонайменше 10 мг, щонайменше 100 мг, щонайменше 1 г або більше білка, який містить штучну амінокислоту, або кількість, яку можна одержати за допомогою методів

15 продукування білка *in vivo* (подробити рекомбінантного продукування та очищення білка наведені у цьому описі). За іншим аспектом цього винаходу білок факультативно є присутнім у композиції з концентрацією, у тому числі, але без обмеження, щонайменше 10 мкг білка на 1 літр, щонайменше 50 мкг білка на 1 літр, щонайменше 75 мкг білка на 1 літр, щонайменше 100 мкг білка на 1 літр, щонайменше 200 мкг білка на 1 літр, щонайменше 250 мкг білка на 1 літр, щонайменше 500 мкг білка на 1 літр, щонайменше 1 мг білка на 1 літр, щонайменше 10 мг білка на 1 літр або більше в, у тому числі, але без обмеження, клітинному лізаті, буфері, фармацевтичному буфері або іншій рідинній суспензії (у тому числі, але без обмеження, у об'ємі, у тому числі, але без обмеження, дець від приблизно 1 нл до приблизно 100 л або більше). Продукування великих кількостей (у тому числі, але без обмеження, більше ніж, як правило, можливо за допомогою інших методів, у тому числі, але без обмеження, шляхом

20 *in vitro* трансляції) білка в еукаріотних клітинах, з включенням щонайменше однієї штучної амінокислоти, є відмінною ознакою цього винаходу.

[372] Еукаріотна клітина-хазяїн або нееукаріотна клітина-хазяїн за цим винаходом надає можливість біосинтезування білків, які містять штучні амінокислоти, у великих необхідних кількостях. Наприклад, білки, які містять штучну амінокислоту, можна продукувати з концентрацією, у тому числі, але без обмеження, щонайменше 10 мкг/літр, щонайменше 50 мкг/літр, щонайменше 75 мкг/літр, щонайменше 100 мкг/літр, щонайменше 200 мкг/літр, щонайменше 250 мкг/літр, щонайменше 500 мкг/літр, щонайменше 1 мг/літр, щонайменше 2 мг/літр, щонайменше 3 мг/літр, щонайменше 4 мг/літр, щонайменше 5 мг/літр, щонайменше 6 мг/літр, щонайменше 7 мг/літр, щонайменше 8 мг/літр, щонайменше 9 мг/літр, щонайменше 10 мг/літр, щонайменше 20 мг/літр, 30 мг/літр, 40 мг/літр, 50 мг/літр, 60 мг/літр, 70 мг/літр, 80 мг/літр, 90 мг/літр, 100 мг/літр, 200 мг/літр, 300 мг/літр, 400 мг/літр, 500 мг/літр, 600 мг/літр, 700 мг/літр, 800 мг/літр, 900 мг/літр, 1 г/літр, 5 г/літр, 10 г/літр або більше білка у клітинному екстракті, клітинному лізаті, культуральному середовищі, буфері та/або подібних середовищах.

35 40

[373] Ряд векторів, прийнятих для експресії bG-CSF, є комерційно доступним. До прийнятих експресійних векторів для хазяїв-еукаріотів належать, але без обмеження ними, вектори, які містять контрольні послідовності експресії з SV40, вірусу папіломи великої рогатої худоби, аденовірусу та вірусу цитомегалії. До таких векторів належать pCDNA3.1(+)\Hug (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія, США) та pCI-neo (компанія Stratagene, La Jolla, штат Каліфорнія, США). Можна застосовувати бактеріальні плазміди, такі як плазміди *E. coli*, у тому числі pBR322, pET3a та pET12a, плазміди ширшого діапазону хазяїв, такі як RP4, фагові ДНК, наприклад, численні похідні фага лямбда, наприклад, NM989, та ДНК інших фагів, таких як M13, і нитчастоподібні одноланцюгові фагові ДНК. З дріжджовими клітинами-хазяями можна застосовувати плазмиду 2μ та її похідні, вектор POT1 (патент США № 4,931,373, включений до цього опису шляхом посилання), вектор pJSO37, описаний у (Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996) та pPICZ A, B або C (компанія Invitrogen). Для клітин комах до згаданих

50 векторів належать, але без обмеження ними, 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, pp. 685-698 (1986), pBluebac 4.5 та pMelbac (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія).

[374] Нуклеотидна послідовність, яка кодує поліпептид bG-CSF, також може включати або

60 може не включати послідовність, яка кодує сигнальний пептид. Сигнальний пептид є присутнім у

разі, коли поліпептид необхідно секретувати з клітин, у яких він експресується. Таким сигнальним пептидом може бути будь-яка послідовність. Сигнальний пептид може бути прокаріотним або еукаріотним. Coloma M. (1992) J. Imm. Methods 152:89-104) описує сигнальний пептид для застосування у клітинах ссавців (сигнальний пептид легкого ланцюга Ig типу каппа).

До інших сигнальних пептидів належать, але без обмеження ними, сигнальний пептид  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae* (патент США № 4,870,008, включений до цього опису шляхом посилання), сигнальний пептид амілази слинних залоз мишей (O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), сигнальний пептид модифікованої карбоксипептидази (L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), сигнальний пептид гена BAR1 дріжджів (WO 87/02670, включена до цього опису шляхом посилання) та сигнальний пептид аспарагінової протеази 3 (YAP3) дріжджів (cf. M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

[375] Приклади відповідних клітин-хазяїв ссавців є відомими фахівцям у цій галузі. Такими клітинами-хазяями можуть бути клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), (наприклад, CHO-K1; ATCC CCL-61), клітини яєчника зеленої мавпи (COS) (наприклад, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); клітини мишей (наприклад, NS/O), лінії клітин нирок хом'ячка (BHK) (наприклад, ATCC CRL-1632 або ATCC CCL-10) та людські клітини (наприклад, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), а також клітини рослин у культурі клітин тканини. Ці та інші лінії клітин є доступними з публічних репозитаріїв, таких як Американська колекція типових культур (ATCC), Rockville, штат Меріленд. Для забезпечення поліпшеного глікозилування поліпептиду bG-CSF, клітини-хазяї ссавців можна модифікувати для експресування сіалілтрансферази, наприклад, 1,6-сіалілтрансферази, наприклад, як описано у патенті США № 5,047,335, включеному до цього опису шляхом посилання.

[376] До способів введення екзогенної ДНК до клітин-хазяїв ссавців належать, але без обмеження ними, трансфекція, опосередкована фосфатом кальцію, електропорація, трансфекція, опосередкована DEAE (діетиламіноетил)-декстраном, трансфекція, опосередкована ліпосомами, трансфекція, опосередкована векторами на основі вірусного геному, та методи трансфекції, описані компанією Life Technologies Ltd, Paisley, Великобританія, із застосуванням Lipofectamin 2000 та компанією Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, США, із застосуванням FuGENE 6. Ці методи є добре відомими у цій галузі і описані Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. Клітини ссавців можна культивувати за розробленими способами, наприклад, за способами, описаними у (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa N.J., USA та Harrison Mass. and Rae I.F., General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997).

I. Системи експресії, культивування та ізоляція

[377] Поліпептиди bG-CSF можна експресувати у будь-якій з численних прийнятних експресійних систем, у тому числі, наприклад, дріжджах, клітинах комах, клітинах ссавців та бактеріях. Опис прикладів експресійних систем наведено нижче.

[378] Дріжджі Термін "дріжджі", який вживають у цьому описі, означає будь-які із цілого ряду різноманітних дріжджів, здатних експресувати ген, який кодує поліпептид bG-CSF. До таких дріжджів належать, але без обмеження ними, аскоспорогенні дріжджі (Endomycetales), базидоспорогенні дріжджі та дріжджі, які належать до групи Fungi imperfecti (Blastomycetes). Згадані аскоспорогенні дріжджі підрозділяються на дві родини, *Spermothoraceae* та *Saccharomycetaceae*. Остання згадана родина складається із чотирьох підродин, *Schizosaccharomycoideae* (наприклад, рід *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* та *Saccharomycoideae* (наприклад, роди *Pichia*, *Kluyveromyces* та *Saccharomyces*). До згаданих базидоспорогенних дріжджів належать роди *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* та *Filobasidiella*. Дріжджі, які належать до групи Fungi Imperfecti (Blastomycetes), підрозділяються на дві родини, *Sporobolomycetaceae* (наприклад, роди *Sporobolomyces* та *Bullera*) і *Cryptococcaceae* (наприклад, рід *Candida*).

[379] Особливий інтерес для застосування за цим винаходом становляють види у межах родів *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* та *Candida*, у тому числі, але без обмеження, *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* та *H. polymorpha*.

[380] Вибір відповідних дріжджів для експресії поліпептидів bG-CSF знаходиться у межах можливостей фахівця у цій галузі. При виборі дріжджів-хазяїв для експресії до прийнятних хазяїв можуть належати ті, які показані як такі, що мають добру секреторну здатність, низьку протеолітичну активність, добрий рівень продукування розчинних білків та загальну міцність. Дріжджі, взагалі, є доступними з цілого ряду джерел, у тому числі, але без обмеження, із центру

Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, штат Каліфорнія) та з Американської колекції типових культур ("ATCC") (Manassas, штат Вірджинія).

[381] Термін "дріжджі-хазяїн" або "дріжджова клітина-хазяїн" означає дріжджі, які можна застосовувати або застосовували як реципієнт для рекомбінантних векторів або іншої ДНК, яка переноситься. Згаданий термін охоплює нащадків вихідної дріжджової клітини-хазяїна, яка одержала рекомбінантні вектори або іншу ДНК, яка переноситься. Зрозуміло, що нащадки однієї вихідної клітини не обов'язково можуть бути повністю ідентичними за морфологією або геномною чи тотальною ДНК до вихідного родоначальника унаслідок випадкової або навмисної мутації. Нащадки вихідної клітини, які є достатньо подібними до родоначальника, щоб характеризуватись відповідною властивістю, такою як присутність нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид bG-CSF, включаються до нащадків, які охоплюються за цим визначенням.

[382] Експресійні та трансформаційні вектори, у тому числі екстрахромосомні реплікони або інтеграційні вектори, були розроблені для трансформації у багатьох дріжджах-хазяях. Наприклад, експресійні вектори були розроблені 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 and 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* (патент США № 5,324,639; № 4,929,555; та № 4,837,148; Cregg et al., Mol. Cell. Biol. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach et al., Nature (1982) 300:706); та *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112:284-289; Tilburn et al., Gene (1983) 26:205-221; та Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:1470-1474); *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); та нитчастих грибів, наприклад, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* (WO 91/00357; кожне зі згаданих джерел включене до цього опису шляхом посилання).

[383] Контрольні послідовності для дріжджових векторів є відомими фахівцям у цій галузі, і до них належать, але без обмеження ними, промоторні ділянки з генів, наприклад, спиртової дегідрогенази (ADH) (EP 0 284 044); енолази; глюкокінази; глюкозо-6-фосфатізомераз; гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAP або GAPDH); гексокінази; фосфофруктокінази; 3-фосфогліцератмутази та піруваткінази (PyK) (EP 0 329 203). Ген PHO5 дріжджів, який кодує кислу фосфатазу, також може надати корисні промоторні послідовності (Miyanojara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:1). До інших придатних промоторних послідовностей для застосування з дріжджами-хазяями можуть належати промотори для 3-фосфогліцераткінази (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. (1980) 255:12073) та інші гліколітичні ферменти, такі як піруватдекарбоксилаза, тріозофосфатізомераза та фосфоглюкозоізомераза (Holland et al., Biochemistry (1978) 17:4900; Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. (1969) 7:149). Індукційні дріжджові промотори, додаткова перевага яких полягає у контролюванні транскрипції умовами культивування, можуть включати промоторні ділянки для спиртової дегідрогенази 2; ізоцитохрому C; кислої фосфатази; металотіонеїну; гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази; деградаційних ферментів, пов'язаних із метаболізмом азоту та ферментів, які несуть відповідальність за утилізацію мальтози та галактози. Прийнятні вектори та промотори для застосування у дріжджовій експресії описані у EP 0 073 657.

[384] Дріжджові енхансери також можна застосовувати з дріжджовими промоторами. Крім того, синтетичні промотори можуть також функціонувати як дріжджові промотори. Наприклад, активаційні послідовності (UAS) дріжджового промотору, орієнтовані у напрямку 3'-5', можна сполучати з ділянкою активації транскрипції іншого дріжджового промотору з утворенням синтетичного гібридного промотору. До прикладів таких гібридних промоторів належать регуляторна послідовність ADH, приєднана до ділянки активації транскрипції GAP. Дивись патенти США № 4,880,734 та № 4,876,197, які включені до цього опису шляхом посилання. До інших прикладів гібридних промоторів належать промотори, які містять регуляторні послідовності генів ADH2, GAL4, GAL10 або PHO5 у комбінації з ділянкою активації транскрипції гена гліколітичного ферменту, такого як GAP або PyK. Дивись EP 0 164 556. Крім того, дріжджовий промотор може включати природні промотори недріжджового походження, які мають здатність до зв'язування дріжджової РНК-полімерази та ініціювання транскрипції.

[385] Інші контрольні елементи, які можуть становити частину дріжджових експресійних векторів, включають термінатори, наприклад, із генів GAPDH або енолази (Holland et al., J. Biol. Chem. (1981) 256:1385). Окрім того, прийнятною для дріжджів є точка ініціювання реплікації, яка

походить з плазмід 2μ. Прийнятним селекційним геном для застосування у дріжджах є ген *trp1*, присутній у дріжджовій плазміді. Дивись Tschumper et al., *Gene* (1980) 10:157; Kingsman et al., *Gene* (1979) 7:141. Згаданий ген *trp1* надає селекційний маркер для дріжджового штаму-мутанта, якому бракує здатності до росту у триптофані. Аналогічно *Leu2*-дефіцитні штами

5 (ATCC 20,622 або 38,626) доповнюють відомими плазмідами, які несуть ген *Leu2*.  
 [386] Способи введення екзогенної ДНК до дріжджів-хазяїв є відомими фахівцям у цій галузі і, як правило, до них належить, але без обмеження нею, трансформація сферопластів або інтактних дріжджових клітин-хазяїв, оброблених лужними катіонами. Наприклад, трансформацію дріжджів можна здійснювати за методом, описаним у Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76:3829 та Van Solingen et al., *J. Bact.* (1977) 130:946. Однак можна також застосовувати інші методи введення ДНК до клітин, такі як ядерна ін'єкція, електропорація або злиття протопластів, як загалом описано у Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Lab. Manual* (2001). Дріжджові клітини-хазяї після цього можна культивувати за стандартними методами, відомими фахівцям у цій галузі.

15 [387] Фахівцям у цій галузі відомі інші способи експресії гетерологічних білків у дріжджових клітинах-хазяях. Дивись взагалі в цілому патентну публікацію США № 2002/0055169, патенти США № 6,361,969; № 6,312,923; № 6,183,985; № 6,083,723; № 6,017,731; № 5,674,706; № 5,629,203; № 5,602,034 та № 5,089,398; переглянуті патенти США № RE37,343 та № RE35,749; патентні публікації WO 99/07862; WO 98/37208 та WO 98/26080; EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274 та EP 0 164 556. Дивись також Gellissen et al., *Antonie Van Leeuwenhoek* (1992) 62(1-2):79-93; Romanos et al., *Yeast* (1992) 8(6):423-488; Goeddel, *Methods in Enzymology* (1990) 185:3-7, які включені до цього опису шляхом посилання.

20 [388] Дріжджові штами-хазяї можна культивувати у біореакторах на етапі ампліфікації за методами періодичної ферментації, відомими фахівцям у цій галузі. Ферментаційні методи можна адаптувати для компенсування різниць шляхів утилізації вуглецю або способу контролювання експресії конкретним дріжджовим штамом-хазяїном. Наприклад, ферментація дріжджового штаму-хазяїну *Saccharomyces* може потребувати одноразової подачі живильного середовища, складного джерела азоту (наприклад, гідролізатів казеїну) та додання численних вітамінів. На відміну від цього, метилотрофні дріжджі *P. pastoris* можуть потребувати подачі гліцерину, метанолу та мікроелементів, але лише простих солей амонію (азоту) для оптимального росту та експресії. Дивись, наприклад, патент США № 5,324,639; Elliott et al., *J. Protein Chem.* (1990) 9:95; та Fieschko et al., *Biotech. Bioeng.* (1987) 29:1113, які включені до цього опису шляхом посилання.

25 [389] Однак такі методи ферментації можуть мати певні спільні відмітні особливості, незалежно від застосовуваного дріжджового штаму-хазяїна. Наприклад, живильну речовину, яка обмежує ріст, як правило, вуглець, можна додавати до біореактора на стадії ампліфікації для забезпечення максимального росту. Окрім того, ферментаційні методи, як правило, застосовують ферментаційне середовище, розроблене таким чином, щоб містити адекватні кількості вуглецю, азоту, основних солей, фосфору та інших другорядних живильних речовин (вітаміни, мікроелементи та солі тощо). Приклади ферментаційних середовищ, придатних для застосування з *Pichia*, описані у патентах США № 5,324,639 та № 5,231,178, включених до цього опису шляхом посилання.

30 [390] Клітини комах, інфіковані бакуловірусом Термін "комаха-хазяїн" або "клітина комахи-хазяїна" означає комаху, яку можна застосовувати або яку застосовували як реципієнт для рекомбінантних векторів або іншої ДНК, яка переноситься. Згаданий термін охоплює нащадків вихідної клітини комахи-хазяїна, яка була трансфікована. Зрозуміло, що нащадки однієї вихідної клітини не обов'язково можуть бути повністю ідентичними за морфологією або геномною чи тотальною ДНК до вихідного родоначальника унаслідок випадкової або навмисної мутації. Нащадки вихідної клітини, яка є достатньо подібними до родоначальника, щоб характеризуватись відповідною властивістю, такою як присутність нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид bG-CSF, включаються до нащадків, які відповідають цьому визначенню.

35 [391] Вибір прийнятних клітин комах для експресії поліпептидів bG-CSF є відомим фахівцям у цій галузі. Декілька видів комах добре відомі у цій галузі і комерційно доступні, у тому числі *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* та *Trichoplusia ni*. При виборі комах-хазяїв для експресії, прийнятні хазяї можуть включати тих, які показані як такі, що мають, *inter alia*, добру секреторну здатність, низьку протеолітичну активність та загальну міцність. Комахи, взагалі, є доступними із цілого ряду джерел, у тому числі, але без обмеження, з Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California

(Berkeley, штат Каліфорнія); та з Американської колекції типових культур ("ATCC") (Manassas, штат Вірджинія).

[392] Взагалі, до компонентів експресійної системи комах, інфікованих бакуловірусом, належать вектор-переносник, як правило, бактеріальна плазмідна, яка містить і фрагмент бакуловірусного геному, і зручний сайт рестрикції для введення гетерологічного гена, призначеного для експресії; бакуловірус дикого типу з послідовностями, гомологічними бакуловірус-специфічному фрагменту у векторі-переноснику (що надає можливість здійснення гомологічної рекомбінації гетерологічного гена до бакуловірусного геному); та відповідні клітини комах-хазяїна і середовища для вирощування. Матеріали, способи та методи, які застосовують при конструюванні векторів, трансфікуванні клітин, збиранні колоній, вирощуванні клітин у культурі тощо, є відомими у цій галузі, і є доступними довідники з описом цих методів.

[393] Після введення гетерологічного гена до вектора-переносника згаданий вектор та вірусний геном дикого типу трансфікують до клітини комах-хазяїна, де відбувається рекомбінація вектора та вірусного геному. Запакований рекомбінантний вірус експресують, а рекомбінантні колонії ідентифікують і очищають. Матеріали і методи для експресійних систем бакуловірус/клітина комах є комерційно доступними у наборі від, наприклад, компанії Invitrogen Corp. (Carlsbad, штат Каліфорнія). Ці методи, взагалі, відомі фахівцям у цій галузі і повністю описані у публікації Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), включений до цього опису шляхом посилання. Дивись також Richardson, 39 Methods in Molecular Biology: Baculovirus Expression Protocols (1995); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology 16.9-16.11 (1994); King and Possee, The Baculovirus System: A Laboratory Guide (1992); та O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (1992).

[394] Фактично продукування різних гетерологічних білків із застосуванням експресійних систем бакуловірус/клітина комах є відомим фахівцям у цій галузі. Дивись, наприклад, патенти США № 6,368,825; № 6,342,216; № 6,338,846; № 6,261,805; № 6,245,528; № 6,225,060; № 6,183,987; № 6,168,932; № 6,126,944; № 6,096,304; № 6,013,433; № 5,965,393; № 5,939,285; № 5,891,676; № 5,871,986; № 5,861,279; № 5,858,368; № 5,843,733; № 5,762,939; № 5,753,220; № 5,605,827; № 5,583,023; № 5,571,709; № 5,516,657; № 5,290,686; та 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, включені до цього опису шляхом посилання.

[395] Вектори, які є прийнятними для застосування у експресійних системах бакуловірус/клітина комах, є відомими у цій галузі, і до них належать, наприклад, експресійні вектори та вектори-переносники, одержані з бакуловірусу Autographa californica, вірусу ядерного поліедрозу (AcNPV), який являє собою Т-хелпер-незалежний вірусний вектор експресії. Вірусні вектори експресії, одержані із цієї системи, як правило, застосовують сильний вірусний промотор гена поліедрину для стимуляції експресії гетерологічних генів. Дивись взагалі O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (1992).

[396] Перед введенням чужорідного гена до бакуловірусного геному вищеописані компоненти, до яких належать промотор, лідерна послідовність (у разі необхідності), кодувальна послідовність, яка становить інтерес, та термінатор транскрипції, як правило, укладають у проміжну переміщувальну генно-інженерну конструкцію (вектор-переносник). Проміжні переміщувальні генно-інженерні конструкції часто зберігають у репліконі, такому як екстрахромосомний елемент (наприклад, плазмід), здатному до стабільного знаходження у хазяїні, такому як бактерія. Реплікон буде мати систему реплікації, яка забезпечує йому можливість зберігання у прийнятному хазяїні для клонування та ампліфікації. Конкретніше, плазмідна може містити сигнал поліаденілювання поліедрину (Miller, Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:177), прокаріотний ген стійкості до ампіциліну (amp) і точку ініціювання реплікації для селекції та розмноження у *E. coli*.

[397] Одним із традиційно застосовуваних генів-переносників для введення чужорідних генів до AcNPV є pAc373. Були сконструйовані багато інших векторів, відомих фахівцям у цій галузі, у тому числі, наприклад, pVL985, який змінює старт-кодон поліедрину з ATG на ATT і який вводить сайт клонування BamHI (32 пари нуклеотидів) у напрямку 5'-3' відносно ATT. Дивись Luckow and Summers, Virology 170:31 (1989). До інших комерційно доступних векторів належать, наприклад, pBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (компанія Invitrogen Corp., Carlsbad, штат Каліфорнія).

[398] Після введення гетерологічного гена вектор-переносник та бакуловірусний геном дикого типу котрансфектують до клітини-хазяїна комах. Методи введення гетерологічної ДНК

до бажаної ділянки бакуловірусу є відомими у цій галузі. Дивись, Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987); Smith et al., Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156; Luckow and Summers, Virology (1989) 170:31. Наприклад, введення можна здійснювати до гена, такого як ген поліедрина, шляхом гомологічної подвійної перехресної рекомбінації; введення  
5 можна також здійснювати до сайту рестрикції ферментів, сконструйованого у необхідному бакуловірусному гені методами генної інженерії. Дивись Miller et al., Bioessays (1989) 11(4):91.

[399] Трансфекцію можна здійснювати шляхом електропорації. Дивись, Trotter and Wood, 39 Methods in Molecular Biology (1995); Mann and King, J. Gen. Virol. (1989) 70:3501. Альтернативно ліпосоми можна застосовувати для трансфекції клітин комах за допомогою рекомбінантного  
10 вектора експресії та бакуловірусу. Дивись, наприклад, 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;  
15 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; Revere et al., J. Biol. Chem. (1996) 271(39):23607-23610; Stanley et al., J. Biol. Chem. (1995) 270:4121; Sisk et al., J. Virol. (1994) 68(2):766; та Peng et al., BioTechniques (1993) 14(2):274. До комерційно доступних ліпосом належать, наприклад, Cellfectin® та Lipofectin® (компанія Invitrogen, Corp., Carlsbad, штат Каліфорнія). Крім того, можна  
20 застосовувати кальцій-фосфатну трансфекцію. Дивись, Trotter and Wood, 39 Methods in Molecular Biology (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; та Mann and King, J. Gen. Virol. (1989) 70:3501.

[400] Бакуловірусні вектори експресії, як правило, містять бакуловірусний промотор. Бакуловірусний промотор являє собою будь-яку послідовність ДНК, здатну зв'язувати  
25 бакуловірусну РНК-полімеразу та ініціювати спрямовану у 5'-3' напрямку транскрипцію кодувальної послідовності (наприклад, структурного гена) у мРНК. Промотор буде мати ділянку ініціювання транскрипції, яка розміщується, як правило, проксимально по відношенню до 5'-кінця кодувальної послідовності. Ця ділянка ініціювання транскрипції, як правило, включає сайт зв'язування РНК-полімерази та сайт ініціювання транскрипції. Бакуловірусний промотор може  
30 також мати другий домен, який називають енхансером, який, у разі присутності, розміщується, як правило, дистально по відношенню до структурного гена. Більше того, експресія може бути регуляторною або конститутивною.

[401] Структурні гени, які у величезній кількості транскрибуються на пізніх етапах циклу інфікування, надають особливо корисні промоторні послідовності. Приклади включають  
35 послідовності, одержані з гена, який кодує білок вірусної оболонки поліедрин (Friesen et al., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in The Molecular Biology of Baculoviruses (1986); EP 0 127 839 та EP 0 155 476) та гена, який кодує білок p10 (Vlak et al., J. Gen. Virol. (1988) 69:765).

[402] Новостворений бакуловірусний вектор експресії пакують до інфекційного рекомбінантного бакуловірусу, і у подальшому колонії можна очищати методами, відомими  
40 фахівцям у цій галузі. Дивись, Miller et al., Bioessays (1989) 11(4):91; Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987).

[403] Рекомбінантні бакуловірусні вектори експресії були розроблені для інфікування декількох клітин комах. Наприклад, рекомбінантні бакуловіруси були розроблені для, inter alia,  
45 *Aedes aegypti* (ATCC No. CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC No. CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC No. 1963), *Spodoptera frugiperda* та *Trichoplusia ni*. Дивись, Wright, Nature (1986) 321:718; Carbonell et al., J. Virol. (1985) 56:153; Smith et al., Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156. Дивись взагалі, Fraser et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. (1989) 25:225. Конкретніше, до ліній клітин, які застосовують для систем бакуловірусного вектора експресії, як правило, належать, але без обмеження ними,  
50 Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC, номер за каталогом CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (компанія Invitrogen Corp., номер за каталогом 11497-013 (Carlsbad, штат Каліфорнія)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*) та High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*).

[404] Клітини та культуральні середовища є комерційно доступними як для прямої, так і для гібридної експресії гетерологічних поліпептидів у бакуловірусній експресійній системі, а методи  
55 культивування клітин є, у цілому, відомі фахівцям у цій галузі.

[405] *E. Coli*, *Pseudomonas* spp та інші прокаріоти. Методи бактеріальної експресії відомі фахівцям у цій галузі. Широкий діапазон векторів є доступним для застосування у бактеріальних  
60 хазяях. Згадані вектори можуть бути однокопійними або низько- чи висококопійними векторами. Вектори можна застосовувати для клонування та/або експресії. Приймаючи до уваги великий обсяг літературних джерел стосовно векторів, комерційну доступність багатьох векторів і навіть



навчальні посібники з описом векторів та їх рестрикційних карт та характеристик, у більш докладному описі потреби немає. Як добре відомо, вектори, за нормальних обставин, містять маркери, які надають можливість селекції, де згадані маркери можуть забезпечувати стійкість проти цитотоксичних агентів, прототропність або імунітет. Часто присутньою є велика кількість маркерів, які забезпечують різні характеристики.

[406] Бактеріальний промотор являє собою будь-яку послідовність ДНК, здатну зв'язувати бактеріальну РНК-полімеразу та ініціювати спрямовану у 5'-3' напрямку транскрипцію кодувальної послідовності (наприклад, структурного гена) у мРНК. Промотор має ділянку ініціювання транскрипції, яка розміщується, як правило, проксимально по відношенню до 5'-кінця кодувальної послідовності. Ця ділянка ініціювання транскрипції, як правило, включає сайт зв'язування РНК-полімерази та сайт ініціювання транскрипції. Бактеріальний промотор може також мати другий домен, який називають оператором, що може перекривати прилеглий сайт зв'язування РНК-полімерази, на якому розпочинається синтез РНК. Згаданий оператор забезпечує можливість негативно регульованої (індуцибельної) транскрипції, оскільки білок-репресор може зв'язувати оператор і, тим самим, пригнічувати транскрипцію конкретного гена. Конститутивна експресія може відбуватись за відсутності негативних регуляторних елементів, таких як оператор. На додаток до цього, позитивну регуляцію можна забезпечувати зв'язувальною послідовністю білка-активатора гена, яка, у разі присутності, розміщується, як правило, проксимально (5') по відношенню до зв'язувальної послідовності РНК-полімерази. Прикладом білка-активатора гена є білок-активатор катаболіту (CAP), який допомагає ініціювати транскрипцію *lac* оперону у *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., *Annu. Rev. Genet.* (1984) 18:173]. Регульована експресія, таким чином, може бути позитивною або негативною і, тим самим, посилювати або зменшувати транскрипцію.

[407] Послідовності, які кодують ферменти метаболічних шляхів, надають особливо прийнятні промоторні послідовності. До прикладів належать промоторні послідовності, одержані із ферментів, які метаболізують цукор, такий як галактоза, лактоза (*lac*) [Chang et al., *Nature* (1977) 198:1056] та мальтоза. До інших прикладів належать промоторні послідовності, одержані з біосинтетичних ферментів, такий як триптофан (*trp*) [Goeddel et al., *Nuc. Acids Res.* (1980) 8:4057; Yelverton et al., *Nucl. Acids Res.* (1981) 9:731; патент США № 4,738,921; публікації EP № 036 776 та EP № 121 775, включені до цього опису шляхом посилання].  $\beta$ -галактозидазна (*bla*) промоторна система [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes", у *Interferon 3* (Ed. I. Gresser)], промоторні системи бактеріофагів лямбда PL [Shimatake et al., *Nature* (1981) 292:128] та T5 [патент США № 4,689,406, які включено до цього опису шляхом посилання] також надають корисні промоторні послідовності. У методах за цим винаходом, яким віддається перевага, застосовують сильні промотори, такі як промотор T7, для індукування поліпептидів bG-CSF на високому рівні. Приклади таких векторів відомі фахівцям у цій галузі і до них належать серія pET29 від компанії Novagen та вектори pPOP, описані у WO99/05297, включеній до цього опису шляхом посилання. Такі експресійні системи можуть продукувати високі рівні поліпептидів bG-CSF у хазяїна без порушення життєздатності або параметрів росту клітини-хазяїна. pET19 (компанія Novagen) є ще одним вектором, відомим у цій галузі.

[408] Крім того, синтетичні промотори, які не зустрічаються у природі, також функціонують як бактеріальні промотори. Наприклад, послідовності активації транскрипції одного бактеріального або бактеріофагового промотору можна сполучати з послідовностями оперонів іншого бактеріального або бактеріофагового промотору, з одержанням синтетичного гібридного промотору [патент США № 4,551,433, включений до цього опису шляхом посилання]. Наприклад, тає промотор є гібридним *trp-lac* промотором, який містить послідовності і *trp* промотору, і *lac* оперону, і регулюється *lac* репресором [Amann et al., *Gene* (1983) 25:167; de Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1983) 80:21]. Окрім того, бактеріальний промотор може включати природні промотори небактеріального походження, які є здатними зв'язувати бактеріальну РНК-полімеразу та ініціювати транскрипцію. Природний промотор небактеріального походження можна також сполучати із сумісною РНК-полімеразою з продукуванням високих рівнів експресії деяких генів у прокаріотах. Система РНК-полімераза/промотор бактеріофагу T7 є прикладом спарованої промоторної системи [Studier et al., *J. Mol. Biol.* (1986) 189:113; Tabor et al., *Proc Natl. Acad. Sci.* (1985) 82:1074]. Крім того, гібридний промотор може також складатись із промотору бактеріофагу та операторної ділянки *E. coli* (публікація EP № 267 851).

[409] Для експресії чужорідних генів у прокаріотах окрім функціональної промоторної послідовності є також прийнятним ефективний сайт зв'язування рибосом. У *E. coli*, сайт зв'язування рибосом називають послідовністю Шайна-Дальгарно (SD). Він містить ініціувальний кодон (ATG) та послідовність довжиною 3-9 нуклеотидів, розміщену у напрямку 3'-5' відносно

згаданого ініціувального кодону [Shine et al., Nature (1975) 254:34]. Гадають, що послідовність SD стимулює зв'язування мРНК з рибосомою шляхом парування нуклеотидів між послідовністю SD та 3'-кінцем 16S рРНК *E. coli* [Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", у Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R.F. Goldberger, 1979)] для експресії еукаріотних генів та прокаріотних генів слабким сайтом зв'язування рибосом [Sambrook et al. "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

[410] Термін "бактеріальний хазяїн" або "бактеріальна клітина-хазяїн" означає бактеріальну клітину, яку можна застосовувати або застосовували як реципієнт для рекомбінантних векторів або іншої ДНК, що переноситься. Згаданий термін охоплює нащадків вихідної бактеріальної клітини-хазяїна, яка була трансфікована. Зрозуміло, що нащадки однієї вихідної клітини не обов'язково можуть бути повністю ідентичними за морфологією або геномною чи загальною ДНК до вихідного родоначальника унаслідок випадкової або навмисної мутації. Нащадки вихідної клітини, які є достатньо подібними до родоначальника, щоб характеризуватись відповідною властивістю, такою як присутність нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид bG-CSF, належать до нащадків, які відповідають цьому визначенню.

[411] Вибір прийнятної бактерії-хазяїна для експресії поліпептидів bG-CSF є відомим фахівцям у цій галузі. При виборі бактеріальних хазяїв для експресії, до прийнятних хазяїв можуть належати ті, які показані як такі, що мають, *inter alia*, добру здатність до формування тілець включення, низьку протеолітичну активність та загальну міцність. Бактеріальні хазяї, взагалі, є доступними з цілого ряду джерел, у тому числі, але без обмеження, із центру Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, штат Каліфорнія) та з Американської колекції типових культур ("ATCC") (Manassas, штат Вірджинія). У разі промислової/фармацевтичної ферментації, як правило, застосовують бактерії штамів K (наприклад, W3110) або бактерії штамів B (наприклад, BL21). Ці штами є особливо прийнятними, оскільки параметри їх росту є надзвичайно добре відомими та надійними. Крім того, ці штами є непатогенними, що є важливим у комерційному відношенні з точки зору безпечності та охорони навколишнього середовища. До інших прикладів прийнятних *E. coli* хазяїв належать, але без обмеження ними, штами BL21, DH10B або їх похідні. За іншим варіантом здійснення методів за цим винаходом *E. coli*-хазяїном є штам без сайтів розщеплення протеазами, у тому числі, але без обмеження, OMP- та LON-. Штам клітин-хазяїв може бути різновидом *Pseudomonas*, у тому числі, але без обмеження, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Pseudomonas putida*. Відомо, що *Pseudomonas fluorescens* біовар 1, який позначають як штам MB101, є прийнятним для рекомбінантного продукування та є доступним для процесів продукування терапевтичного білка. До прикладів експресійної системи *Pseudomonas* належить система, доступна від компанії The Dow Chemical Company як штам-хазяїн (Midland, штат Мічиган, є доступною у мережі Інтернет за адресою: [dow.com](http://dow.com)).

[412] Після одержання штаму рекомбінантних клітин-хазяїв (тобто експресійна генно-інженерна конструкція була введена до клітини-хазяїна, і були ізольовані клітини-хазяї з відповідною експресійною конструкцією) згаданий штам рекомбінантних клітин-хазяїв культивують за умов, прийнятних для продукування поліпептидів bG-CSF. Як зрозуміло фахівцю у цій галузі, метод культивування штаму рекомбінантних клітин-хазяїв буде залежати від природи застосованого експресійного конструкта та ідентичності клітина-хазяїна. Штами рекомбінантних хазяїв, як правило, культивують за методами, відомими фахівцям у цій галузі. Рекомбінантні клітини-хазяї, як правило, культивують у рідкому середовищі, яке містить засвоєвані джерела вуглецю, азоту та неорганічних солей і факультативно містить вітаміни, амінокислоти, фактори росту та інші білкові домішки до культуральних середовищ, відомі фахівцям у цій галузі. Рідкі середовища для культивування клітин-хазяїв можуть факультативно містити антибіотики чи протигрибкові препарати для запобігання росту небажаних мікроорганізмів та/або сполуки, у тому числі, але без обмеження, антибіотики для селекції клітин-хазяїв, які містять експресійний вектор.

[413] Рекомбінантні клітини-хазяї можна культивувати у періодичному або безперервному режимі з подальшим збиранням клітин (у разі, коли поліпептид bG-CSF накопичується усередині клітин) чи збирати культуральний супернатант у періодичному або безперервному режимі. Для продукування у прокаріотних клітинах-хазяях, перевагу віддають періодичному культивуванню та збиранню клітин.

[414] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом, як правило, очищають після експресії у рекомбінантних системах. Поліпептид bG-CSF можна очищати з клітин-хазяїв або культурального середовища за допомогою різноманітних методів, відомих у цій галузі. У патенті США № 5,849,883 та заявці WO 89/10932, включених до цього опису шляхом посилання,

описане клонування b-GCSF та його аналогів у клітинах-хазяях та методи виділення та очищення. Поліпептиди bG-CSF, які продукуються у бактеріальних клітинах-хазяях, можуть мати низьку розчинність або бути нерозчинними (у формі тілець включення). За одним із варіантів здійснення цього винаходу у поліпептиді bG-CSF можна легко здійснювати амінокислотні заміни, які вибирають з метою підвищення розчинності білка, який продукують рекомбінантним шляхом, із застосуванням методів, описаних у цій заявці, а також методів, відомих у цій галузі. У разі нерозчинного білка згаданий білок можна збирати з лізатів клітин-хазяїв шляхом центрифугування з можливою подальшою гомогенізацією клітин. У разі слаботорозчинного білка можна додавати сполуки, у тому числі, але без обмеження, поліетиленімін (PEI), для індукування осадження частково розчинного білка. Осаджений білок у подальшому можна зручно збирати шляхом центрифугування. Рекомбінантні клітини-хазяї можна руйнувати або гомогенізувати для виділення тілець включення з клітин за допомогою різноманітних способів, відомих фахівцям у цій галузі. Клітини-хазяї можна руйнувати або гомогенізувати за допомогою добре відомих методів, у тому числі, але без обмеження, шляхом ферментативного руйнування клітин, обробки ультразвуком, гомогенізації у гомогенізаторі Даунса або руйнування високим тиском. За одним із варіантів здійснення методу за цим винаходом метод руйнування високим тиском застосовують для руйнування клітин-хазяїв *E. coli* з метою виділення тілець включення поліпептидів bG-CSF. При роботі з тільцями включення поліпептиду bG-CSF сприятливим може виявитись скорочення часу гомогенізації або зменшення кількості повторень для доведення до максимального рівня виходу тілець включення без втрат, обумовлених такими факторами як солюбілізація, механічний зсув або протеоліз.

[415] Нерозчинний або осаджений поліпептид bG-CSF можна після цього солюбілізувати за допомогою будь-якого з численних прийнятних солюбілізуювальних агентів, відомих у цій галузі. Поліпептид bG-CSF можна солюбілізувати сечовиною або гідрохлоридом гуанідину. Об'єм солюбілізованого поліпептиду bG-CSF повинен бути зведений до мінімального рівня, так щоб великі партії могли бути продукуювані із застосуванням зручного для маніпулювання розміру. Цей фактор може відігравати важливу роль за умов великомасштабного серійного виробництва, коли рекомбінантний хазяїн можна вирощувати партіями, об'єм яких дорівнює тисячам літрів. Окрім того, у разі продукування поліпептиду bG-CSF за умов великомасштабного серійного виробництва, зокрема, для фармацевтичного та медичного застосування, слід, наскільки це видається можливим, запобігати застосування сильнодіючих хімічних препаратів, які можуть пошкодити обладнання та контейнер або сам білковий продукт. За варіантом здійснення методу за цим винаходом було з'ясовано, що більш слабкий денатурувальний агент, сечовину, можна застосовувати для солюбілізації тілець включення поліпептиду bG-CSF замість більш сильнодіючого денатурувального агента, гідрохлориду гуанідину. Застосування сечовини значно зменшує ризик пошкодження обладнання з нержавіючої сталі, яка застосовується у процесі одержання та очищення поліпептиду bG-CSF, з одночасною ефективною солюбілізацією тілець включення поліпептиду bG-CSF.

[416] У разі розчинного білка bG-CSF, bG-CSF можна секретувати до периплазматичного простору або до культурального середовища. Крім того, розчинний bG-CSF може бути присутнім у цитоплазмі клітин-хазяїв. Може виникнути необхідність концентрування розчинного bG-CSF перед здійсненням етапів очищення. Для концентрування розчинного bG-CSF, наприклад, з клітинних лізатів або культурального середовища, можна застосовувати стандартні методи, відомі фахівцям у цій галузі. Крім того, стандартні методи, відомі фахівцям у цій галузі, можна застосовувати для руйнування клітин-хазяїв та виділення розчинного bG-CSF із цитоплазми або периплазматичного простору клітин-хазяїв.

[417] У разі продукування поліпептиду bG-CSF у формі гібридного білка гібридну послідовність можна видалити. Видалення гібридної послідовності можна здійснювати шляхом ферментативного або хімічного розщеплення. Ферментативне видалення гібридних послідовностей можна здійснювати за допомогою методів, відомих фахівцям у цій галузі. Вибір ферменту для видалення гібридної послідовності буде визначатись ідентичністю гібриду, а умови реакції будуть визначатись вибором ферменту, як зрозуміло фахівцю у цій галузі. Хімічне розщеплення можна здійснювати за допомогою реактивів, відомих фахівцям у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, ціаногенброміду, TEV-протеази та інших реактивів. Відщеплений поліпептид bG-CSF можна очищати з розщепленої гібридної послідовності за допомогою методів, відомих фахівцям у цій галузі. Такі методи будуть визначатись ідентичністю та властивостями гібридної послідовності та поліпептиду bG-CSF, як зрозуміло фахівцю у цій галузі. До способів очищення можуть належати, але без обмеження ними, гель-хроматографія

за розміром молекул, гідрофобна хроматографія, іонообмінна хроматографія або діаліз чи будь-яка їх комбінація.

[418] Поліпептид bG-CSF можна також очищати з видаленням ДНК з білкового розчину. ДНК можна видаляти із застосуванням будь-якого прийнятного методу, відомого у цій галузі, такого як осадження або іонообмінне хроматографування, але можна також видаляти шляхом осадження за допомогою агента для осадження нуклеїнової кислоти, такого як, але без обмеження, сульфат протаміну. Поліпептид bG-CSF можна відділяти від осадженої ДНК із застосуванням стандартних, добре відомих, методів, у тому числі, але без обмеження, центрифугування або фільтрації. Видалення хазяйських нуклеїнових кислотних молекул є важливим фактором за обставин, коли поліпептид bG-CSF має застосовуватись для лікування тварин або людей, і способи за цим винаходом зменшують вміст ДНК клітин-хазяїв до фармацевтично прийнятних рівнів.

[419] У разі експресії білків можна також застосовувати засоби дрібномасштабної або великомасштабної ферментації, у тому числі, але без обмеження, ферментери, хитальні колби, біореактори з псевдозрідженим шаром, біореактори з порожнистим волокном, культуральні системи з ролерними бутлями та біореакторні системи у вигляді баків із мішалками. Процес за кожним із цих методів можна здійснювати у періодичному режимі, періодичному режимі з підживленням або безперервному режимі.

[420] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна, взагалі, виділяти із застосуванням методів, стандартних для цієї галузі. Наприклад, культуральне середовище або клітинний лізат можна центрифугувати або фільтрувати для видалення клітинного дебрису. Супернатант можна концентрувати або розбавляти до бажаного об'єму чи діафільтрувати до прийнятного буфера для підготовки препарату для додаткового очищення. Додаткове очищення поліпептиду bG-CSF за цим винаходом включає відокремлення деамідованих та скорочених форм варіанта поліпептиду bG-CSF від інтактної форми.

[421] Будь-які з наведених нижче прикладів методів можна застосовувати для очищення поліпептидів bG-CSF за цим винаходом: афінна хроматографія, аніоно- або катіонообмінна хроматографія (із застосуванням, у тому числі, але без обмеження, DEAE SEPHAROSE); хроматографія на силікагелі; високоефективна рідинна хроматографія (HPLC); високоефективна рідинна хроматографія з оберненою фазою; гель-фільтрація (із застосуванням, у тому числі, але без обмеження, SEPHADEX G-75); гідрофобна хроматографія; гель-фільтрація за розміром молекул; метал-хелатна хроматографія; ультрафільтрація/діафільтрація; осадження етанолом; осадження сульфатом амонію; хроматофокусування; витіснявальна хроматографія; електрофоретичні методи (у тому числі, але без обмеження, препаративне ізоелектричне фокусування), метод диференційованої розчинності (у тому числі, але без обмеження, осадження сульфатом амонію), SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) або екстракція.

[422] Білки за цим винаходом, у тому числі, але без обмеження, білки, які містять штучні амінокислоти, пептиди, які містять штучні амінокислоти, антитіла проти білків, які містять штучні амінокислоти, зв'язувальні партнери для білків, які містять штучні амінокислоти, тощо, можна очищати, частково або по суті до однорідності, за стандартними методами, відомими та застосовуваними фахівцями у цій галузі. Відповідно, поліпептиди за цим винаходом можна виділяти та очищати будь-яким із цілого ряду методів, відомих фахівцям у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, осадження сульфатом амонію або етанолом, кислотним екстрагуванням або екстрагуванням основами, хроматографуванням на колонках, афінним хроматографуванням, аніоно- або катіонообмінним хроматографуванням, хроматографуванням на фотоцелюлозному сорбенті, гідрофобним хроматографуванням, хроматографуванням на гідроксилапатитній адсорбційній колонці, лектиновим хроматографуванням, гель-електрофорезом тощо. Етапи рефолдингу білка можна застосовувати за необхідністю при одержанні відповідним чином укладених зрілих білків. На кінцевих етапах очищення, де необхідна чистота високого ступеня, можна застосовувати високоефективну рідинну хроматографію (HPLC), афінну хроматографію або інші прийнятні методи. У одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіла проти штучних амінокислот (або білків чи пептидів, які містять штучні амінокислоти) застосовують як очищувальні реактиви, у тому числі, але без обмеження, для афінного очищення білків або пептидів, які містять одну або декілька штучних амінокислот. Після очищення, часткового або до однорідності, за необхідністю, поліпептиди факультативно застосовують з різними цілями, у тому числі, але без обмеження, як компоненти для випробування, терапевтичні засоби, профілактичні засоби, діагностичні засоби, дослідницькі засоби та/або як імуногени для продукування антитіл. Антитіла проти поліпептидів

за цим винаходом можна одержати шляхом введення поліпептидів або фрагментів, які несуть антигенну детермінанту, чи клітин тварини, за варіантом, якому віддається перевага, тварин, окрім людини, за стандартними методами. Фахівець у цій галузі може одержати антитіла із застосуванням цілого ряду відомих методів. Для експресії гуманізованих антитіл можна також

5 застосовувати трансгенних мишей або інші організми, у тому числі інших ссавців. Вищеописані антитіла можна застосовувати для ізолювання або ідентифікування клонів, які експресують поліпептид, або для очищення поліпептидів. Антитіла проти поліпептидів за цим винаходом можна також застосовувати для лікування захворювань.

[423] Поліпептиди та полінуклеотиди за цим винаходом можна також застосовувати як вакцини. Відповідно, у іншому аспекті цей винахід стосується способу індукування імунної реакції у ссавця, який включає введення ссавцю поліпептиду за цим винаходом у кількості, достатній для викликання гуморальної імунної відповіді або Т-клітинної імунної реакції, у тому числі, наприклад, цитокін-продукуючих Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, для захисту згаданої тварини від захворювання, незалежно від того, хворий цей індивід чи ні. Імунна реакція

15 у ссавця може також бути індукована за методом, який включає доставку поліпептиду за цим винаходом за допомогою вектора, який спрямовує експресію полінуклеотиду та кодування поліпептиду *in vivo* для індукування такої імунної реакції з продукуванням антитіла для захисту згаданої тварини проти захворювань, лікування яких передбачено цим винаходом. Один зі способів введення згаданого вектора полягає у прискоренні його доставки до необхідних клітин

20 як покриття на частинках або іншим шляхом. Такі вектори на основі нуклеїнових кислот можуть містити ДНК, РНК, модифіковану нуклеїнову кислоту або гібрид ДНК/РНК. Для застосування у ролі вакцини, поліпептид або вектор на основі нуклеїнової кислоти буде, за нормальних умов, наданий у вигляді вакцинної лікарської форми (композиції). Згадана лікарська форма може містити прийнятний носій. Оскільки поліпептид може розкладатись у шлунку, його можна

25 вводити парентеральним шляхом (наприклад, підшкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним шляхом або шляхом внутрішньошкірної ін'єкції). До лікарських форм, прийнятих для парентерального введення, належать водні та неводні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики та розчинені речовини, які забезпечують ізотонічність лікарської форми з кров'ю реципієнта; та водні і неводні стерильні

30 суспензії, які можуть містити суспендувальні агенти або загущувальні агенти. Вакцинна лікарська форма може також містити ад'ювантні системи для посилення імуногенності лікарської форми, які є відомими фахівцям у цій галузі. Дозування буде залежати від питомої активності вакцини і може бути легко визначене шляхом стандартного експериментування.

[424] На додаток до інших посилань, наведених у цьому описі, фахівцям у цій галузі відомі різноманітні методи очищення/укладання білків, у тому числі, але без обмеження, методи, наведені у 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) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris and Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and 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 and Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Second Edition Wiley-VCH, NY; та Walker (1998), *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ; та посилання, наведені у цих джерелах.

40

[425] Одна з переваг продукування білка або поліпептиду, які становлять інтерес, зі штучною амінокислотою у еукаріотній клітині-хазяїні або нееукаріотній клітині-хазяїні полягає у тому, що, як правило, білки або поліпептиди будуть укладені відповідно до їх нативних конформацій. Однак у певних варіантах здійснення цього винаходу фахівцям у цій галузі зрозуміло, що, після

50 синтезу, експресії та/або очищення, білки або пептиди можуть мати конформацію, яка відрізняється від необхідної конформації відповідних поліпептидів. За одним з аспектів цього винаходу експресований білок або поліпептид факультативно денатурують і потім ренатурують. Це здійснюють за методами, відомими у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом приєднання шапероніну до білка або поліпептиду, який становить інтерес, шляхом солюбілізації білка у хаотропному агенті, такому як гуанідин-HCl, шляхом застосування білка, дисульфідізомерази, тощо.

55

[426] Взагалі, подеколи виникає необхідність у денатуруванні та відновленні експресованих поліпептидів із подальшим рефолдингом поліпептидів до переважної конформації. Наприклад, до продукту трансляції, який становить інтерес, можна додавати гуанідин, сечовину, DTT (дитіотреїтол), DTE (дитіоеритритол) та/або шаперонін. Методи відновлення, денатурації та

60

ренатурації білків є відомими фахівцям у цій галузі (дивись посилання, наведені вище, та Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; та Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski, et al., наприклад, описують денатурацію та відновлення білкових тілець включення у суміші гуанідину-DTE. Рефолдинг білків може відбуватись у окиснювально-відновлювальному буфері, який містить, у тому числі, але без обмеження, окиснений глутатіон та L-аргінін. Реактиви для рефолдингу наливають або іншим чином забезпечують їх контактування з одним або декількома поліпептидами або іншим експресованим продуктом чи навпаки.

[427] У разі прокаріотного продукування поліпептиду bG-CSF продукований таким чином поліпептид bG-CSF може бути помилково укладеним, завдяки чому йому буде бракувати або він буде мати знижену біологічну активність. Біологічна активність білка може бути відновлена шляхом "рефолдингу". Взагалі, помилково укладений поліпептид піддають рефолдингу шляхом солюбілізації (де поліпептид bG-CSF може також бути нерозчинним), розгортання та відновлення поліпептидного ланцюга за допомогою, наприклад, одного або декількох хаотропних агентів (наприклад, сечовини та/або гуанідину) та відновника, здатного відновити дисульфідні зв'язки (наприклад, дитіотреїтолу, DTT або 2-меркаптоетанолу, 2-ME). При помірній концентрації хаотропу додають окисник (наприклад, кисень, цистеїн або цистамін), який забезпечує переформування дисульфідних зв'язків. Поліпептид bG-CSF може бути підданий рефолдингу за стандартними методами, відомими у цій галузі, такими як методи, опис яких наведений у патентах США № 4,511,502, № 4,511,503 та № 4,512,922, які включені до цього опису шляхом посилання. Поліпептид bG-CSF можна також укладати сумісно з іншими білками з утворенням гетеродимерів або гетеромультимерів.

[428] Після рефолдингу bG-CSF можна додатково очищати. Очищення bG-CSF можна здійснювати із застосуванням різноманітних методів, відомих фахівцям у цій галузі, у тому числі засобами гідрофобної хроматографії, гель-хроматографії за розміром молекул, іонообмінної хроматографії, високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, афінної хроматографії тощо або будь-якої їх комбінації. Додаткове очищення може також включати етап сушіння або осадження очищеного білка.

[429] Після очищення bG-CSF можна обмінювати у різних буферах та/або концентрувати за будь-яким із цілого ряду методів, відомих у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом діалізу, діалізу, бG-CSF, одержаний у вигляді єдиного очищеного білка, можна піддавати агрегуванню та осадженню.

[430] Очищений bG-CSF може мати щонайменше 90 % рівень чистоти (за результатами визначення засобами високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, RP-HPLC, або електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію, SDS-PAGE) або щонайменше 95 % рівень чистоти, або щонайменше 98 % рівень чистоти, або щонайменше 99 % або більший рівень чистоти. Незалежно від точного числового значення рівня чистоти bG-CSF, згаданий bG-CSF є достатньо чистим для застосування як фармацевтичний продукт або для додаткового процесування, такого як кон'югування з водорозчинним полімером, таким як поліетиленгліколь.

[431] Певні молекули bG-CSF можна застосовувати як терапевтичні агенти за відсутності інших активних інгредієнтів або білків (окрім допоміжних речовин, носіїв та стабілізаторів, сироваткового альбуміну тощо) або їх можна комплексувати з іншим білком або полімером.

[432] Загальні методи очищення Будь-яка із цілого ряду стадій ізоляції може бути здійснена на клітинному лізаті, екстракті, культуральному середовищі, тільцях включення, періплазматичному просторі клітин-хазяїв, цитоплазмі клітин-хазяїв або іншому матеріалі, який містить поліпептид bG-CSF, або будь-якій суміші поліпептидів bG-CSF, яку одержали унаслідок здійснення будь-яких стадій ізоляції, у тому числі, але без обмеження, афінної хроматографії, іонообмінної хроматографії, гідрофобної хроматографії, гель-хроматографії за розміром молекул, високоефективної рідинної хроматографії ("HPLC"), високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою ("RP-HPLC"), адсорбції спученим шаром або будь-якої комбінації та/або їх повторення у будь-якому відповідному порядку.

[433] Обладнання та інші необхідні матеріали, які застосовують при здійсненні методів, опис яких наведено, є комерційно доступними. Насоси, колектори фракцій, контрольно-вимірювальні пристрої, самописці та системи у цілому є доступними, наприклад, від компанії Applied Biosystems (Foster City, штат Каліфорнія), компанії Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, штат Каліфорнія) та компанії Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, штат Нью-Джерсі). Хроматографічні матеріали, у тому числі, але без обмеження, матеріали для обмінних матриць, живильні середовища та буфери також є доступними від цих компаній.

[434] Зрівнювання та інші етапи процесів хроматографування на колонках, опис яких наведений у цьому винаході, такі як промивання та елювання, можна здійснювати швидше у разі застосування спеціалізованого обладнання, такого як насоси. До комерційно доступних насосів належать, але без обмеження ними, HILOAD<sup>®</sup> Pump P-50, Peristaltic Pump P-1, Pump P-901 та Pump P-903 (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі).

[435] До прикладів колекторів фракцій належать RediFrac Fraction Collector, FRAC-100 та FRAC-200 Fraction Collectors і SUPERFRAC<sup>®</sup> Fraction Collector (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі). Доступними є також мішалки для регулювання pH та лінійних градієнтів концентрації. До комерційно доступних мішалок належать Gradient Mixer GM-1 та In-Line Mixers (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі).

[436] Проходження хроматографії можна контролювати із застосуванням будь-якого комерційно доступного контрольно-вимірювального пристрою. Такі контрольно-вимірювальні пристрої можна застосовувати для збирання інформації, наприклад, УФ, pH та електропровідності. До прикладів контрольно-вимірювальних пристроїв належать Monitor UV-1, UVICORD<sup>®</sup> S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 та Conductivity Monitor (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі). Фактично комерційно доступними від компанії Amersham Biosciences (Piscataway, штат Нью-Джерсі) є системи у цілому, у тому числі різноманітні системи АКТА<sup>®</sup>.

[437] За одним із варіантів здійснення цього винаходу, наприклад, поліпептид bG-CSF може бути відновленим та денатурованим, починаючи з денатурування у сечовині очищеного поліпептиду bG-CSF, який був одержаний, з подальшим розведенням у трис-буфері, який містить відновник (такий як DTT) при відповідному значенні pH. В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF денатурують у сечовині у діапазоні концентрацій від приблизно 2 М до приблизно 9 М, з подальшим розведенням у трис-буфері при pH у діапазоні від приблизно 5,0 до приблизно 8,0. Після цього суміш для рефолдингу за цим прикладом здійснення можна інкубувати. У одному з варіантів здійснення цього винаходу суміш для рефолдингу інкубують при кімнатній температурі впродовж періоду часу тривалістю від 4 год. до 24 год. Після цього суміш відновлених та денатурованих поліпептидів bG-CSF можна додатково ізолювати та очищати.

[438] Як зазначається у цьому описі, значення pH першої суміші поліпептидів bG-CSF можна регулювати перед здійсненням будь-яких подальших етапів ізолювання. Крім того, першу суміш поліпептидів bG-CSF або будь-яку подальшу їх суміш можна концентрувати за методами, відомими у цій галузі. Більше того, елювальний буфер, який містить першу суміш поліпептидів bG-CSF або будь-яку подальшу їх суміш, можна замінювати буфером, прийнятним для наступного етапу ізолювання за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

[439] Іонообмінна хроматографія За одним із прикладів здійснення та як факультативний, додатковий, етап, перша суміш поліпептидів bG-CSF може бути піддана іонообмінному хроматографуванню. Дивись, взагалі, Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods (номер за каталогом: 18-1114-21, компанія Amersham Biosciences (Piscataway, штат Нью-Джерсі)). До комерційно доступних іонообмінних колонок належать HITRAP<sup>®</sup>, HIPREP<sup>®</sup> та HILOAD<sup>®</sup> (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі). У таких колонках застосовують сильні аніонообмінники, такі як Q SEPHAROSE<sup>®</sup> Fast Flow, Q SEPHAROSE<sup>®</sup> High Performance та Q SEPHAROSE<sup>®</sup> XL; сильні катіонообмінники, такі як SP SEPHAROSE<sup>®</sup> High Performance, SP SEPHAROSE<sup>®</sup> Fast Flow та SP SEPHAROSE<sup>®</sup> XL; слабкі аніонообмінники, такі як DEAE SEPHAROSE<sup>®</sup> Fast Flow; та слабкі катіонообмінники, такі як CM SEPHAROSE<sup>®</sup> Fast Flow (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі). Аніоно- або катіонообмінній хроматографії можна піддавати поліпептид bG-CSF на будь-якій стадії процесу очищення для ізоляції по суті очищеного поліпептиду bG-CSF. Катіонообмінну хроматографію можна здійснювати із застосуванням будь-якої прийнятної катіонообмінної матриці. До прийнятних катіонообмінних матриць належать, але без обмеження ними, волокнисті, пористі, непористі, мікрогранулярні, гранульовані або зшиті катіонообмінні матричні матеріали. До таких катіонообмінних матричних матеріалів належать, але без обмеження ними, целюлоза, агароза, декстран, поліакрилат, полівініл, полістирол, діоксид кремнію, поліефір або композиційні матеріали на основі будь-якого з вищезгаданих.

[440] Катіонообмінною матрицею може бути будь-який прийнятний катіонообмінник, у тому числі сильні та слабкі катіонообмінники. Сильні катіонообмінники можуть залишатись іонізованими у широкому діапазоні значень pH і, завдяки цьому, можуть зв'язувати bG-CSF у широкому діапазоні значень pH. Слабкі катіонообмінники, однак, можуть втратити іонізацію у залежності від значення pH. Наприклад, слабкий катіонообмінник може втратити заряд, коли значення pH падає нижче приблизно pH 4 або pH 5. Для прийнятних сильних катіонообмінників

належать, але без обмеження ними, заряджені функціональні групи, такі як сульфопропіл (SP), метилсульфонат (S) або сульфоетил (SE). Катионообмінна матриця може бути сильним катионообмінником, який, за варіантом, якому віддається перевага, має діапазон рН зв'язування bG-CSF від приблизно 2,5 до приблизно 6,0. Альтернативно сильний катионообмінник може мати діапазон рН зв'язування bG-CSF від приблизно 2,5 до приблизно 5,5. Катионообмінна матриця може бути сильним катионообмінником, який має рН зв'язування bG-CSF на рівні приблизно 3,0. Альтернативно катионообмінна матриця може бути сильним катионообмінником, який, за варіантом, якому віддається перевага, має діапазон рН зв'язування bG-CSF від приблизно 6,0 до приблизно 8,0. Катионообмінна матриця може бути сильним катионообмінником, який, за варіантом, якому віддається перевага, має діапазон рН зв'язування bG-CSF від приблизно 8,0 до приблизно 12,5. Альтернативно сильний катионообмінник може мати діапазон рН зв'язування bG-CSF від приблизно рН 6,0 до приблизно рН 12,0.

[441] Перед завантаженням bG-CSF катионообмінну матрицю можна зрівноважувати, наприклад, із застосуванням декількох об'ємів колонки розбавленої слабкої кислоти, наприклад, чотирьох об'ємів колонки 20 мМ розчину оцтової кислоти, рН 3. Після зрівноважування можна додати bG-CSF, і колонку можна промити від одного до декількох разів слабким розчином кислоти, таким як слабкий розчин оцтової або фосфорної кислоти, після чого елювати по суті очищений bG-CSF. Наприклад, колонку можна промити приблизно 2-4 об'ємами колонки 20 мМ розчину оцтової кислоти, рН 3. Можна здійснити додаткові промивання колонки із застосуванням, наприклад, 2-4 об'ємів колонки 0,05 М розчину ацетату натрію, рН 5,5, або 0,05 М розчину ацетату натрію, змішаного з 0,1 М розчином хлориду натрію, рН 5,5. Альтернативно за методами, відомими у цій галузі, катионообмінну матрицю можна зрівноважувати із застосуванням декількох об'ємів колонки розбавленого розчину слабкої основи.

[442] Альтернативно по суті очищений bG-CSF можна елювати шляхом введення в контакт катионообмінної матриці з буфером, який має достатньо низьке значення рН або іонної сили для витіснення bG-CSF з матриці. Значення рН елювального буфера може коливатись у межах від приблизно рН 2,5 до приблизно рН 6,0. Більш конкретно, значення рН елювального буфера може коливатись у межах від приблизно рН 2,5 до приблизно рН 5,5, від приблизно рН 2,5 до приблизно рН 5,0. Елювальний буфер може мати значення рН на рівні приблизно 3,0. Крім того, кількість елювального буфера може змінюватись у широких межах і буде взагалі знаходитись у межах від приблизно 2 об'ємів колонки до приблизно 10 об'ємів колонки.

[443] Після адсорбції поліпептиду bG-CSF на катионообмінній матриці, по суті очищений поліпептид bG-CSF можна елювати шляхом контактування матриці з буфером, який має достатньо високе значення рН або іонної сили для витіснення поліпептиду bG-CSF з матриці. До прийнятних буферів для застосування з метою елювання при високому значенні рН по суті очищеного поліпептиду bG-CSF можуть належати, але без обмеження ними, цитратний, фосфатний, форміатний, ацетатний, гепес- та MES-буфери з концентрацією у межах від щонайменше приблизно 5 мМ до щонайменше приблизно 100 мМ.

[444] Хроматографію з оберненою фазою, RP-HPLC, можна здійснювати для очищення білків за відповідними методиками, які є відомими фахівцям у цій галузі. Дивись, наприклад, 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. RP-HPLC може бути підданий поліпептид bG-CSF для ізоляції по суті очищеного поліпептиду bG-CSF. Для цього можна застосовувати смоли на основі діоксиду кремнію з алкільними функціональними групами різної довжини, у тому числі, але без обмеження, від щонайменше приблизно C<sub>3</sub> до щонайменше приблизно C<sub>30</sub>, від щонайменше приблизно C<sub>3</sub> до щонайменше приблизно C<sub>20</sub> або від щонайменше приблизно C<sub>3</sub> до щонайменше приблизно C<sub>18</sub>. Альтернативно можна застосовувати полімерну смолу. Наприклад, можна застосовувати смолу TosoHaas Amberchrome CG1000sd, яка являє собою смолу на основі полістиролу. Можна застосовувати також ціаноакрилатні або полімерні смоли з алкільним ланцюгом найрізноманітнішої довжини. Крім того, RP-HPLC колонку можна промивати розчинником, таким як етанол. Іншим прикладом RP-HPLC колонки є колонка Source RP.

[445] Для елювання поліпептиду bG-CSF з RP-HPLC колонки можна застосовувати прийнятний елювальний буфер, який містить агент для утворення пари іонів та органічний модифікатор, такий як метанол, ізопропанол, тетрагідрофуран, ацетонітрил або етанол. До найчастіше застосовуваних агентів для утворення пари іонів належать, але без обмеження ними, оцтова кислота, мурашина кислота, перхлорна кислота, фосфорна кислота, трифтороцтова кислота, гептафторомасляна кислота, триетиламін, тетраметиламоній, тетрабутиламоній та триетиламоніацетат. Елювання можна здійснювати із застосуванням



одного або декількох градієнтів або за ізократичних умов, де перевагу віддають градієнтам для скорочення часу відділення та зменшення ширини піків. Інший метод включає застосування двох градієнтів з різними діапазонами концентрації розчинника. До прикладів прийнятних елюювальних буферів для застосування за цим винаходом можуть належати, але без обмеження ними, розчини ацетату амонію та ацетонітрилу.

[446] Метод очищення за допомогою гідрофобної хроматографії Гідрофобну хроматографію (HIC) можна здійснювати на поліпептиді bG-CSF. Дивись, взагалі, Hydrophobic Interaction Chromatography Handbook: Principles and Methods (номер за каталогом: 18-1020-90, компанія Amersham Biosciences (Piscataway, штат Нью-Джерсі), включений до цього опису шляхом посилання. До прийнятних HIC матриць можуть належати, але без обмеження ними, алкіл- або арилзаміщені матриці, такі як бутіл-, гексил-, октил- або фенілзаміщені матриці, у тому числі, агарозні, зшиті агарозні, сефарозні, целюлозні матриці, матриці з діоксиду кремнію, декстранові, полістирольні, поліметакрилатні матриці та матриці змішаного типу, у тому числі, але без обмеження, матрицю з поліетиленамінової смоли або матрицю з бутіл- чи фенілзаміщеного поліметакрилату. До комерційно доступних джерел для гідрофобної хроматографії належать, але без обмеження ними, колонки HITRAP®, HIPREP® та HILOAD® (компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі).

[447] Стисло, перед завантаженням, HIC колонку можна зрівноважувати із застосуванням стандартних буферів, відомих фахівцям у цій галузі, таких як розчин оцтової кислоти/хлориду натрію або розчин сульфату амонію, який містить гепес-буфер. Для завантаження HIC колонки у ролі буферу можна застосовувати сульфат амонію. Після завантаження поліпептиду bG-CSF, колонку можна промивати із застосуванням стандартних буферів та за стандартних умов для видалення небажаних матеріалів, але з утриманням поліпептиду bG-CSF у HIC колонці. Поліпептид bG-CSF можна елювати із застосуванням від приблизно 3 об'ємів колонки до приблизно 10 об'ємів колонки стандартного буфера, такого як гепес-буфер, який містить EDTA (етилендіамінтрифтороцтову кислоту) і має меншу концентрацію сульфату амонію, порівняно із зрівноважувальним буфером, або буфера, який являє собою суміш оцтової кислоти/хлориду натрію тощо. Для елювання молекул bG-CSF можна також застосовувати низхідний лінійний градієнт концентрації солі, наприклад, градієнт фосфату калію. Елюент у подальшому можна концентрувати, наприклад, шляхом фільтрації, такої як діафільтрація або ультрафільтрація. Діафільтрацію можна застосовувати для видалення солі, яку застосовували для елювання поліпептиду bG-CSF.

[448] Інші методи очищення Першу суміш поліпептидів bG-CSF або будь-яку подальшу їх суміш можна піддавати ще одній стадії виділення із застосуванням, наприклад, гель-фільтрації (Gel Filtration: Principles and Methods (номер за каталогом: 18-1022-18, компанія Amersham Biosciences, Piscataway, штат Нью-Джерсі), включений до цього опису шляхом посилання), хроматографії на гідроксилапатитних адсорбційних колонках (до прийнятних матриць належать, але без обмеження ними, HA-Ultrogel, High Resolution (компанія Calbiochem), CHT Ceramic Hydroxyapatite (компанія BioRad), Bio-Gel HTP Hydroxyapatite (компанія BioRad)), HPLC, адсорбції спученим шаром, ультрафільтрації, діафільтрації, ліофілізації тощо, для видалення будь-яких надлишкових солей та заміни буфера на прийнятний буфер для наступної стадії виділення або навіть одержання лікарської форми кінцевого лікарського засобу.

[449] Вихід поліпептиду bG-CSF, у тому числі по суті очищеного поліпептиду bG-CSF, можна контролювати на кожній описаній стадії із застосуванням методів, відомих фахівцям у цій галузі. Такі методи можна також застосовувати для визначення виходу по суті очищеного поліпептиду bG-CSF після останньої стадії виділення. Наприклад, вихід поліпептиду bG-CSF можна контролювати із застосуванням будь-якої з декількох колонок для високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, що має алкільні ланцюги різної довжини, такі як ціано RP-HPLC, C<sub>18</sub>RP-HPLC; а також катіонообмінної високоефективної рідинної хроматографії та гель-хроматографії.

[450] За конкретними варіантами здійснення цього винаходу вихід bG-CSF після кожного етапу очищення може становити щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 35 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 45 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 55 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 65 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 91 %, щонайменше приблизно 92 %, щонайменше приблизно 93 %, щонайменше приблизно 94 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 96 %, щонайменше приблизно 97 %, щонайменше приблизно 98 %, щонайменше приблизно 99 %, щонайменше приблизно 99,9 % або щонайменше приблизно 99,99 % bG-CSF з вихідного матеріалу на кожному етапі очищення.

[451] Ступінь чистоти можна визначати із застосуванням стандартних методів, таких як SDS-PAGE, або шляхом визначення чистоти поліпептиду за допомогою аналізів із застосуванням вестерн-блотингу ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз). Наприклад, можна одержати антитіла проти білків, ізольованих після негативної контрольної дріжджової ферментації та катіонообмінного виділення. Згадані антитіла можна також застосовувати для визначення

присутності контамінуючих білків клітин-хазяїв.

[452] Матеріал для RP-HPLC колонки Vydac C4 (Vydac) являє собою частинки силікагелю, на поверхні яких знаходяться C4-алкільні ланцюги. Відділення поліпептиду bG-CSF від білкових домішок ґрунтується на різниці у силі гідрофобних взаємодій. Елюювання здійснюють за допомогою градієнту ацетонітрилу у розведений трифтороцтовій кислоті. Препаративну HPLC здійснюють на колонці з нержавіючої сталі (заповнений 2,8-3,2 л силікагелю Vydac C4). Елюат, який одержують після колонки Hydroхуаратіте Ultrogel, підкислюють додаванням трифтороцтової кислоти і завантажують у колонку Vydac C4. Промивання та елюювання здійснюють за допомогою градієнту ацетонітрилу у розведений трифтороцтовій кислоті. Фракції збирають і негайно нейтралізують фосфатним буфером. Збирають фракції поліпептиду bG-CSF, які не виходять за межі IPC (внутрішній позитивний контроль).

[453] Матеріал DEAE Sepharose (компанія Pharmacia) містить діетиламіноетилові (DEAE)-групи, ковалентно приєднані до поверхні гранул сефарози. Зв'язування поліпептиду bG-CSF з діетиламіноетиловими групами опосередковується іонними взаємодіями. Ацетонітрил та трифтороцтова кислота проходять через колонку без затримки. Після вимивання цих речовин, слідові домішки видаляють шляхом промивання колонки ацетатним буфером при низькому значенні pH. Після цього колонку промивають нейтральним фосфатним буфером, і поліпептид bG-CSF елюють буфером із підвищеною іонною силою. Колонку заповнюють матеріалом DEAE Sepharose fast flow. Об'єм колонки регулюють для забезпечення навантаження поліпептиду bG-CSF у межах 3-10 мг поліпептиду bG-CSF/мл гелю. Колонку промивають водою та зрівноважувальним буфером (натрію/калію фосфат). Зібрані фракції HPLC елюату завантажують, і колонку промивають зрівноважувальним буфером. Потім колонку промивають промивним буфером (натрійацетатний буфер), після чого промивають зрівноважувальним буфером. У подальшому поліпептид bG-CSF елюють із колонки елюювальним буфером (хлорид натрію, фосфат натрію/калію), і збирають як одну фракцію відповідно до еталонного профілю елюювання. Показник електропровідності елюату з DEAE Sepharose колонки доводять до визначеного рівня. Одержану лікарську речовину піддають стерильній фільтрації, збирають у фторопластові флакони і зберігають при температурі -70°C.

[454] До інших методів, які можна застосовувати, належать, але без обмеження ними, етапи з видалення ендотоксинів. Ендотоксини являють собою ліпополісахариди (LPS), які локалізуються на зовнішній мембрані грамнегативних клітин-хазяїв, таких як *Escherichia coli*. Методи зниження рівня ендотоксинів є відомими фахівцю у цій галузі і до них належать, але без обмеження ними, методи очищення із застосуванням силікагелевих носіїв, скляного порошку або гідроксіапатиту, хроматографії з оберненою фазою, афінної хроматографії, гелі-хроматографії за розміром молекул, аніонообмінної хроматографії, гідрофобної хроматографії, комбінації цих методів тощо. Може виникнути потреба у модифікаціях або інших методах для видалення з поліпептидів, які становлять інтерес, домішок, таких як білки, які мігрують сумісно з поліпептидами. Методи визначення рівня ендотоксинів відомі фахівцю у цій галузі, і до них належать, але без обмеження ними, лімулюс-амебоцит-лізат (LAL)-тести. Обладнання для проведення тесту Endosafe<sup>TM</sup>-PTS являє собою колориметричну, однопробірочну систему, у якій застосовуються капсули з попередньо завантаженим LAL реактивом, хромогенним субстратом та контрольним стандартним ендотоксином, разом із ручним спектрофотометром. До інших методів належать, але без обмеження ними, кінетичний LAL метод, який є турбідиметричним методом, який здійснюється у 96-лунковому форматі.

[455] Найрізноманітніші методи та процедури можна застосовувати для визначення виходу та ступеня чистоти білка bG-CSF, яка містить одну або декілька штучно закодованих амінокислот, у тому числі, але без обмеження, аналіз за Бредфордом, SDS-PAGE, SDS-PAGE із забарвленням сріблом, SDS-PAGE із забарвленням кумасі синім, мас-спектрометрія (у тому числі, але без обмеження, MALDI-TOF (мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині із часопролітним аналізатором)) та інші методи для визначення характеристики білків, відомі фахівцю у цій галузі.

[456] До інших методів належать, але без обмеження ними: SDS-PAGE у поєднанні з методами забарвлення білків, імуоблотинг, мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині з часопролітним аналізатором (MALDI-MS), рідинна

хроматографія/мас-спектрометрія, ізоелектричне фокусування, аналітична аніонообмінна хроматографія, хроматофокусування та кільцевий дихроїзм.

#### VIII. Експресія у інших системах

[457] Були застосовані декілька стратегій для введення штучних амінокислот до білків нерекомбінантних клітин-хазяїв, мутагенізованих клітин-хазяїв або безклітинних систем. Ці системи також прийнятні для застосування з метою одержання поліпептидів bG-CSF за цим винаходом. Результатом дериватизації амінокислот реакційноздатними бічними ланцюгами, такими як Lys, Cys та Tug, є перетворення лізину на N<sup>2</sup>-ацетиллізин. Хімічний синтез також являє собою прямий метод введення штучних амінокислот. Нещодавно розроблені способи ферментативного лігування та нативного хімічного лігування фрагментів пептидів надали можливість одержання більших білків. Дивись, наприклад, P.E. Dawson and S.B.H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000). Опис способів хімічного лігування пептидів та нативного хімічного лігування наведений у патенті США № 6,184,344, патентних публікаціях США № 2004/0138412 та № 2003/0208046, міжнародних заявках WO 02/098902 та WO 03/042235, включених до цього опису шляхом посилання. Загальний *in vitro* біосинтетичний метод, за яким супресорну tРНК, хімічним шляхом ациловану бажаною штучною амінокислотою, додають до *in vitro* екстракту, який підтримує біосинтез білка, було застосовано для сайт-специфічного введення більше ніж 100 штучних амінокислот до цілого ряду білків фактично будь-якого розміру. Дивись, наприклад, V.W. Cornish, D. Mendel and P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244:182-188 (1989); та J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989). Найрізноманітніші функціональні групи були введені до білків для вивчення стабільності білків, укладання білків, механізму дії ферментів та трансдукції сигналів.

[458] *In vivo* метод, який називають методом включення селективним тиском, був розроблений для використання у своїх інтересах промискуїтету синтетаз дикого типу. Дивись, наприклад, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F.M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Ауксотрофний штам, у якого був відключений відповідний метаболічний шлях, який забезпечував клітину конкретною амінокислотою, культивують на мінімальних живильних середовищах, які містять обмежені концентрації згаданої природної амінокислоти з одночасним пригніченням транскрипції гена-мішені. На початку стаціонарної фази росту природну амінокислоту вичерпують і замінюють аналогом, який являє собою штучну амінокислоту. Результатом індукування експресії рекомбінантного білка є накопичення білка, який містить штучний аналог. За допомогою цієї стратегії, наприклад, до складу білків були введені о-, м- та п-фторфенілаланіни з одержанням двох характерних плечей в УФ-спектрі, які можна легко ідентифікувати, дивись, наприклад, C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); трифторометіонін був застосований для заміни метіоніну у лізоцимі бактеріофагу T4 для вивчення його взаємодії з хітоолігосахаридними лігандами засобами <sup>19</sup>F ЯМР, дивись, наприклад, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J.F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); і трифторолеїцин був введений на місце лейцину, результатом чого явилось підвищення термічної та хімічної стабільності лейцин-зіперного білка. Дивись, наприклад, Y. Tang, G. Ghirlanda, W.A. Petka, T. Nakajima, W.F. DeGrado and D.A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Більше того, селенометіонін та телурометіонін вводять до різних рекомбінантних білків для полегшення розчинення фаз при проведенні рентгено-кристалографічних досліджень. Дивись, наприклад, 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 and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); та N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). Були також ефективно введені аналоги метіоніну з алкеновими або алкіновими функціональними групами, що надало можливість здійснення додаткового модифікування білків хімічними засобами. Дивись, наприклад, J.C. van Hest and 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); та K.L. Kiick and D.A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); патент США № 6,586,207; патентну публікацію США № 2002/0042097, включені до цього опису шляхом посилання.

[459] Успіх цього методу залежить від розпізнавання аналогів штучних амінокислот аміноацил-тРНК-синтетазами, що, взагалі, вимагає високого рівня селективності для забезпечення надійності трансляції білків. Один із шляхів розширення рамок цього методу полягає у послабленні субстратної специфічності аміноацил-тРНК-синтетаз, чого вдалось

досягти у обмеженій кількості випадків. Наприклад, заміна Ala<sup>294</sup> на Gly у фенілалініл-тРНК-синтетази (PheRS) *Escherichia coli* збільшила розмір субстратзв'язувального карману і призвела до ацилювання тРНКPhe п-Cl-фенілаланіном (п-Cl-Phe). Дивись, M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). Штам *Escherichia coli*, який містить цю мутантну PheRS, надає можливість введення п-Cl-фенілаланіну або п-Br-фенілаланіну замість фенілаланіну. Дивись, наприклад, M. Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); та N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D.A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). Подібним чином, було показано, що точкова мутація Phe130Ser біля сайту зв'язування амінокислоти тирозил-тРНК-синтетази *Escherichia coli*, надає можливість більш ефективного введення азатирозину, аніж тирозину. Дивись, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll and S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275:40324 (2000).

[460] Інша стратегія введення штучних амінокислот до складу білків *in vivo* полягає у модифікації синтетаз, які мають механізми виправлення помилок. Ці синтетази не можуть розрізняти і, унаслідок цього, активувати амінокислоти, які є структурно подібними до споріднених природних амінокислот. Ця помилка виправляється на окремому сайті, який деацилює помилково заряджену амінокислоту з тРНК для збереження надійності трансляції білків. Якщо активність синтетаз з виправлення помилок нейтралізується, структурні аналоги, які помилково активуються, можуть уникнути функції редагування і бути введенними. Цей варіант підходу був нещодавно продемонстрований з валіл-тРНК-синтетазою (ValRS). Дивись, V. Doring, H.D. Mootz, L.A. Nangle, T.L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001). ValRS може помилково ацилювати tRNAVal з Cys, Thr або амінобутиратом (Abu); ці неспоріднені амінокислоти у подальшому гідролізуються редагувальним доменом. Після неспецифічного мутагенезу хромосоми *Escherichia coli* вибрали штам-мутант *Escherichia coli*, який мав мутацію у редагувальному сайті ValRS. Ця дефективна за функцією редагування ValRS помилково заряджає тРНКVal Cys. Оскільки Abu стерично нагадує Cys (-SH група Cys у Abu замінена на -CH<sub>3</sub>), мутантна ValRS також вводить Abu до білків у тому разі, коли штам-мутант *Escherichia coli* культивується у присутності Abu. Мас-спектрометричний аналіз показує, що приблизно 24 % валінів замінюються на Abu у кожному положенні валіну нативного білка.

[461] Твердофазний синтез та напівсинтетичні методи також надали можливість синтезування ряду білків, які містять нові амінокислоти. Наприклад, дивись наведені нижче публікації та посилання, які цитуються у згаданих публікаціях, а саме: 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.*, 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); та 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).

[462] Хімічна модифікація була застосована для *in vitro* введення до білків різноманітних штучних бічних ланцюгів, у тому числі кофакторів, спінових міток та олігонуклеотидів. Дивись, наприклад, 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. et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 88:3153-3154 (1966); та Pollack S.J., Nakayama G. Schultz P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242(4881):1038-1040 (1988).

[463] Альтернативно біосинтетичні методи, які застосовують хімічно модифіковані аміноацил-тРНК, були застосовані для введення декількох біофізичних зондів до білків, синтезованих *in vitro*. Дивись наведені нижче публікації та посилання, які цитуються у згаданих публікаціях: Brunner J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev. Biochem.*, 62:483-514 (1993); та 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).

[464] Раніше була показана можливість сайт-специфічного введення штучних амінокислот до білків *in vitro* шляхом додання хімічно аміноацилованих супресорних тРНК до реакційних сумішей синтезу білків, запрограмованих білком, який містить бажану нонсенс (амбер)-мутацію. Із застосуванням цих варіантів підходів можна замінити ряд звичайних двадцяти амінокислот близькими структурними гомологами, наприклад, фторфенілаланін на фенілаланін, застосовуючи штами, ауксотрофні по конкретній амінокислоті. Дивись, наприклад, 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); та 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).

[465] Наприклад, одержали супресорну тРНК, яка розпізнає стоп-кодон UAG і яка була хімічним шляхом аміноацилована штучною амінокислотою. За допомогою традиційного сайт-спрямованого мутагенезу на сайт білкового гена, який становить інтерес, ввели стоп-кодон TAG. Дивись, наприклад, Sayers J.R., Schmidt W., Eckstein F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, 16(3):791-802 (1988). Після того як ациловану супресорну тРНК і мутований ген об'єднали у *in vitro* транскрипційній/трансляційній системі, штучна амінокислота була введена у відповідь на кодон UAG, завдяки чому одержали білок, який містить амінокислоту у визначеному положенні. Експерименти із застосуванням [<sup>3</sup>H]-Phe та експерименти з  $\alpha$ -гідроксикислотами показали, що у положення, визначене кодоном UAG, була включена лише необхідна амінокислота і що ця амінокислота не була включена до жодного іншого сайту згаданого білка. Дивись, наприклад, Noren, et al., *supra*; Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; та Ellman J.A., Mendel D., Schultz P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041):197-200 (1992).

[466] тРНК може бути аміноацилована бажаною амінокислотою за будь-яким методом або способом, у тому числі, але без обмеження, шляхом хімічного або ферментативного аміноацилювання.

[467] Аміноацилювання можна здійснювати аміноацил-тРНК-синтетатазами або іншими ферментативними молекулами, у тому числі, але без обмеження, рибозимами. Термін "рибозим" є взаємозамінним з терміном "каталітична РНК". Cech та співробітники (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) продемонстрували присутність природних РНК, які можуть відігравати роль каталізаторів (рибозимів). Однак, незважаючи на те, що було показано, що ці природні РНК-каталізатори діють лише на рибонуклеїновокислотні субстрати для розщеплення та сплайсування, нещодавно розробка штучної еволюції рибозимів розширила репертуар каталізаторів для різних хімічних реакцій. Шляхом досліджень були ідентифіковані молекули РНК, які можуть каталізувати зв'язки аміноацил-РНК на їх власних (2')3'-кінцях (Illangakekare et al., 1995 *Science* 267:643-647), та молекула РНК, яка може переносити амінокислоту з однієї молекули РНК на іншу (Lohse et al., 1996, *Nature* 381:442-444).

[468] Патентна публікація США № 2003/0228593, включена до цього опису шляхом посилання, описує методи конструювання рибозимів та їх застосування для аміноацилювання тРНК природними та штучно закодованими амінокислотами. Імобілізовані на субстраті форми ферментативних молекул, які можуть аміноацилювати тРНК, у тому числі, але без обмеження, рибозими, можуть забезпечити можливість ефективного афінного очищення аміноацилованих продуктів. До прикладів прийнятних субстратів належать агароза, сефароза та магнітні кульки. Продуктування та застосування іммобілізованої на субстраті форми рибозиму для аміноацилювання описані у *Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084 та патентній публікації США № 2003/0228593, включених до цього опису шляхом посилання.

[469] До методів хімічного аміноацилювання належать (але без обмеження ними) методи, введені Hecht та співробітниками (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) та 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; Holsaka T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34), включені до цього опису шляхом посилання, для запобігання застосування синтетаз при аміноацилюванні. Такі або інші методи хімічного аміноацилювання можна застосовувати для аміноацилювання молекул тРНК.

[470] Методи одержання каталітичної РНК можуть включати продукування окремих пулів рандомізованих рибозимних послідовностей, здійснення прямої еволюції пулів, скринінг пулів на бажану аміноацилювальну активність та селекцію послідовностей тих рибозимів, які демонструють бажану аміноацилювальну активність.

[471] Рибозими можуть містити мотиви та/або ділянки, які полегшують ацилювальну активність, такі як мотив GGU та U-збагачену ділянку. Було повідомлено, наприклад, що U-збагачені ділянки можуть полегшувати розпізнавання амінокислотного субстрату, а мотив GGU може формувати пари основ з 3'-кінцями тРНК. У комбінації, мотив GGU та U-збагачена ділянка полегшують одночасне розпізнавання як амінокислоти, так і тРНК і, тим самим, полегшують аміноацилювання 3'-кінця тРНК.

[472] Рибозими можна одержати шляхом *in vitro* селекції із застосуванням частково рандомізованого r24mini, кон'югованого з тРНК<sup>Asn</sup><sub>CCCG</sub>, з подальшим систематичним конструюванням консенсусної послідовності, знайденої у активних клонів. Зразковий рибозим, який був одержаний за цим методом, який називають "рибозим Fx3" і опис якого наведено у патентній публікації США № 2003/0228593, зміст якої включено до цього опису шляхом посилання, відіграє роль універсального каталізатора у синтезі різних аміноацил-тРНК, заряджених спорідненими штучними амінокислотами.

[473] Імобілізацію на субстраті можна застосовувати для забезпечення можливості ефективного афінного очищення аміноацилованих тРНК. До прикладів прийнятних субстратів належать, але без обмеження ними, агароза, сефароза та магнітні кульки. Рибозими можна іммобілізувати на смолах завдяки можливості скористання перевагою хімічної структури РНК, а саме тим, що 3'-цис-діол на рибозі РНК може окиснюватись періодатом з одержанням відповідного діальдегіду для полегшення іммобілізації РНК на смолі. Можна застосовувати смоли різних типів, у тому числі недорогі гідралізні смоли, гідроамінування яких перетворює взаємодію між смолою та рибозимом на необоротний зв'язок. Синтез аміноацил-тРНК можна значно полегшувати цим методом аміноацилювання на колонці. Kourouklis et al. Methods 2005; 36:239-234 описує систему аміноацилювання на основі колонки.

[474] Ізоляцію аміноацилованих тРНК можна здійснювати різними способами. Один із прийнятних способів полягає у елюванні аміноацилованих тРНК з колонки за допомогою буфера, такого як розчин ацетату натрію з 10 mM розчином EDTA, буфера, який містить 50 mM N-(2-гідроксietил)піперазин-N'-3-пропансульфонової кислоти, 12,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM EDTA або просто EDTA, забуференої водою (pH 7,0).

[475] Аміноациловані тРНК можна додавати до трансляційних реакційних сумішей для введення амінокислоти, якою була аміноацилована тРНК, до необхідного положення у поліпептиді, який одержують унаслідок реакції трансляції. До прикладів трансляційних систем, у яких можуть застосовуватись аміноациловані тРНК за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, клітинні лізати. Клітинні лізати забезпечують реакційні компоненти, необхідні для *in vitro* трансляції поліпептиду з вхідної мРНК. До прикладів таких реакційних компонентів належать, але без обмеження ними, рибосомні білки, рРНК, амінокислоти, тРНК, GTP (гуанозин-5'-трифосфат), ATP (аденозин-5'-трифосфат), фактори ініціації трансляції та елонгації і додаткові фактори, пов'язані з трансляцією. Крім того, трансляційні системи можуть бути системами періодичної та компартменталізованої трансляції. Системи періодичної трансляції об'єднують реакційні компоненти у одному компартменті, у той час як системи компартменталізованої трансляції відділяють компоненти реакції трансляції від продуктів реакції, які можуть пригнічувати ефективність трансляції. Такі трансляційні системи є комерційно доступними.

[476] Крім того, можна застосовувати спаровану транскрипційну/трансляційну систему. Спаровані транскрипційні/трансляційні системи надають можливість транскрипції вхідної ДНК у відповідну мРНК, яка, у свою чергу, транскрибується реакційними компонентами. Прикладом комерційно доступної спарованої транскрипційної/трансляційної системи є Rapid Translation System (RTS (система прискореної трансляції), компанія Roche Inc.). Згадана система включає суміш, яка містить лізат *E. coli* для забезпечення трансляційних компонентів, таких як рибосоми

та фактори трансляції. Крім того, до складу згаданої системи входить РНК-полімераза для транскрипції вхідної ДНК у мРНК-матрицю для застосування при трансляції. RTS може застосовувати компартменталізацію реакційних компонентів завдяки мембрані, яка встановлюється між реакційними компартментами, у тому числі, компартментом

[477] Аміноацилювання тРНК можна здійснювати іншими агентами, у тому числі, але без обмеження, трансферазами, полімеразами, каталітичними антитілами, мультифункціональними білками тощо.

[478] Stephan у Scientist 2005 Oct 10; стор. 30-33 описує додаткові методи введення штучно закодованих амінокислот до білків. Lu et al. у Mol. Cell. 2001 Oct.;8(4):759-769 описують метод, за яким білок хімічно зв'язують із синтетичним пептидом, який містить штучні амінокислоти (експресоване лігування білків).

[479] Мікроін'єкційні методи також застосовують для введення штучних амінокислот до білків. Дивись, наприклад, 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); та D.A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000). До *Xenopus oocyte* одночасно були введені два різновиди РНК, продукованої *in vitro*: мРНК, який кодує білок-мішень з UAG стоп-кодоном у амінокислотному положенні, який становить інтерес, та амбер-супресор (супресорна тРНК, яка пригнічує амбермутацію), аміноацилований необхідною штучною амінокислотою. Після цього трансляційний механізм ооциту вставляє штучну амінокислоту у положення, визначене UAG. Цей метод надав можливість проведення *in vivo* структурно-функціональних досліджень інтегральних мембранних білків, які, як правило, є недоступними для *in vitro* експресійних систем. До прикладів належать введення флуоресцентної амінокислоти до рецептора тахікініну (нейрокініну-2) для визначення відстані за допомогою флуоресцентного резонансного перенесення енергії, дивись, наприклад, 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); введення біотинілованих амінокислот для ідентифікування поверхневих залишків у іонних каналах, дивись, наприклад, J.P. Gallivan, H.A. Lester and D.A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997); застосування фотоактивних аналогів тирозину для моніторингу конформаційних змін іонного каналу у реальному масштабі часу, дивись, наприклад, J.C. Miller, S.K. Silverman, P.M. England, D.A. Dougherty and H.A. Lester, Neuron, 20:619 (1998); та застосування альфа-гідроксіамінокислот для зміни каркасів іонних каналів для зондування механізмів їх відкриття. Дивись, наприклад, P.M. England, Y. Zhang, D.A. Dougherty and H.A. Lester, Cell, 96:89 (1999); та T. Lu, A.Y. Ting, J. Mainland, L.Y. Jan, P.G. Schultz and J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001).

[480] Можливість введення штучних амінокислот безпосередньо до білків *in vivo* надає цілий ряд переваг, у тому числі, але без обмеження, високі виходи білків-мутантів, технічна легкість, потенціал дослідження білків-мутантів у клітинах або, можливо, у живих організмах та застосування цих білків-мутантів із лікувальною та діагностичною метою. Можливість введення штучних амінокислот із різними розмірами, кислотністю, нуклеофільністю, гідрофобністю та іншими властивостями до білків може значно розширити наші можливості щодо раціонального та систематичного маніпулювання структурами білків як для вивчення функції білків, так і створення нових білків або організмів із новими властивостями.

[481] За однією зі спроб сайт-специфічного введення пара-F-Phe, пару дріжджової амбер-супресорної-тРНК PheCUA/фенілаланіл-тРНК-синтетази випробували на п-F-Phe-резистентному, Phe-ауксотрофному штамі *Escherichia coli*. Дивись, наприклад, R. Furter, Protein Sci., 7:419 (1998).

[482] Можна також здійснити експресію полінуклеотиду bG-CSF за цим винаходом за допомогою безклітинної (*in vitro*) трансляційної системи. Трансляційні системи можуть бути клітинними або безклітинними, прокаріотними або еукаріотними. До клітинних трансляційних систем належать, але без обмеження ними, цільноклітинні препарати, такі як клітини з підвищеним коефіцієнтом проникності або культури клітин, де бажана нуклеїновокислотна послідовність може бути транскрибована до мРНК з подальшою трансляцією за її допомогою. Безклітинні трансляційні системи є комерційно доступними, і відомо багато різних типів та систем. До прикладів безклітинних систем належать, але без обмеження ними, лізати прокаріот, такі як лізати *Escherichia coli*, та лізати еукаріот, такі як екстракти паростків пшениці, лізати клітин комах, лізати ретикулоцитів кролів, лізати ооцитів кролів та лізати людських клітин. Екстрактам або лізатам еукаріот може надаватись перевага, у разі, якщо білок, який одержують, глікозилюється, фосфорилується або модифікується іншим чином, оскільки здійснення таких модифікацій є можливим лише в еукаріотних системах. Деякі із цих екстрактів та лізатів є

комерційно доступними (компанія Promega; Madison, штат Вісконсін; компанія Stratagene; La Jolla, штат Каліфорнія; компанія Amersham; Arlington Heights, штат Іллінойс; компанія GIBCO/BRL; Grand Island, штат Нью-Йорк). Доступними є також мембранні екстракти, такі як екстракти підшлункової залози собак, які містять мембрани мікросом, які є прийнятними для трансляції секреторних білків. У цих системах, які можуть включати мРНК, як матрицю (*in vitro* трансляція), або ДНК, як матрицю (комбінована *in vitro* транскрипція і трансляція), *in vitro* синтез спрямовується рибосомами. Значні зусилля були докладені до розробки безклітинних систем експресії білків. Дивись, наприклад, 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); та Patnaik R. and J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); патент США № 6,337,191; патентну публікацію США № 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785, які включено до цього опису шляхом посилання. Інший варіант підходу, який може застосовуватись до експресії поліпептидів bG-CSF, які містять штучно закодовані амінокислоти, включає метод гібридизації мРНК-пептиду. Дивись, наприклад, R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003). За цим варіантом підходу мРНК-матриця, сполучена з пуроміцином, трансклюється у пептид на рибосомі. Якщо була модифікована одна або декілька молекул тРНК, до пептиду можуть бути введені також штучні амінокислоти. Після завершення зчитування останнього кодону мРНК, пуроміцин захоплює С-кінець пептиду. Якщо за допомогою *in vitro* аналізу буде встановлено, що кон'югат мРНК-пептид, який одержали, має цікаві властивості, його ідентичність може бути легко встановлена за послідовністю мРНК. Подібним чином можна здійснити скринінг бібліотек поліпептидів bG-CSF, які містять одну або декілька штучно закодованих амінокислот, для ідентифікування поліпептидів, які мають необхідні властивості. Нещодавно повідомили про *in vitro* трансляцію рибосом з очищеними компонентами, що надає можливість здійснення синтезу пептидів, замінених на штучно закодовані амінокислоти. Дивись, наприклад, A. Forster et al., *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 100:6353 (2003).

[483] Можна також застосовувати відновлені трансляційні системи. Для трансляції мРНК у білок також успішно застосовували суміші очищених трансляційних факторів, а також комбінації лізатів або лізатів, доповнених очищеними трансляційними факторами, такими як фактор ініціації 1 (IF-1), IF-2, IF-3 ( $\alpha$  або  $\beta$ ), фактором елонгації Т (EF-Tu) або факторами термінації. Безклітинні системи можуть також бути спарованими системами транскрипції/трансляції, де ДНК вводять до згаданої системи, транскрибують у мРНК, а мРНК трансклюють, як описано у публікації *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al. editors, Wiley Interscience, 1993), яка спеціально включена до цього опису шляхом посилання. РНК, транскрибована в еукаріотній транскрипційній системі, може мати форму гетеронуклеарної РНК (hnRNA) або зрілої мРНК, кепованої на 5'-кінці (7-метилгуанозин), та зрілої мРНК з 3'-кінцевим полі(А) "хвостом", що може надавати перевагу у певних трансляційних системах. Наприклад, кеповані мРНК з високою ефективністю трансклюються у системі ретикулоцитного лізату.

#### XI. Макромолекулярні полімери, сполучені з поліпептидами bG-CSF

[484] Поліпептиди, які містять штучні амінокислоти, опис яких наведено, можна піддати різним модифікаціям за допомогою композицій, методів, способів та стратегій, опис яких наведено. Ці модифікації включають введення додаткової функціональної групи до штучної амінокислотної складової поліпептиду, у тому числі, але без обмеження, гідроксіалкілкрохмалю (HAS), гідроксіетилкрохмалю (HES), мітки, барвника, полімеру, водорозчинного полімеру, похідної поліетиленгліколю, фотозшивального агента, радіонукліда, цитотоксичної сполуки, лікарської речовини, афінної мітки, фотоафінної мітки, реакційноздатної сполуки, смоли, другого білка або поліпептиду чи аналога поліпептиду, антитіла або фрагмента антитіла, металохелату, кофактора, жирної кислоти, вуглеводу, полінуклеотиду, ДНК, РНК, антисмислового полінуклеотиду, сахариду, водорозчинного дендримера, циклодекстрину, інгібувальної рибонуклеїнової кислоти, біоматеріалу, наночастинки, спінової мітки, флуорофору, металовмісної складової, радіоактивної складової, нової функціональної групи, групи, що яка ковалентно або нековалентно взаємодіє з іншими молекулами, фотореактивної складової, групи, яка збуджується фотохімічноактивним випроміненням, складової, здатної до фотоізомеризації, біотину, похідної біотину, аналога біотину, складової, яка містить важкий атом, хімічно розщеплюваної групи, фоторозщеплюваної групи, подовженого бічного ланцюга, цукру, приєднаного до атомом вуглецю, окиснювально-відновлювального засобу, тіоамінокислоти, токсичної складової, складової, міченої радіоактивною міткою, біофізичного зонда, фосфоресцентної групи, хемілюмінесцентної групи, групи з високою електронною



густиною, магнітної групи, інтеркаляційної групи, хромофору, енергопередавального засобу, біологічно активного засобу, виявної мітки, невеликої молекули, квантової точки, нанопередавача, радіонуклеотиду, радіопередавача, нейтронзахватної речовини або будь-якої комбінації вищенаведеного або будь-якої іншої необхідної сполуки або речовини. Як ілюстративний необмежувальний приклад композицій, методів, способів та стратегій, опис яких наведено, наведений нижче опис буде зосереджуватись на приєднанні макромолекулярних полімерів до поліпептиду, який містить штучну амінокислоту, із розумінням того, що композиції, методи, способи та стратегії, опис яких наведено, також застосовні (з відповідними модифікаціями, у разі необхідності, які фахівець у цій галузі міг би здійснити за допомогою наведеного у цій заявці опису) для приєднання інших функціональних груп, у тому числі, але без обмеження, груп, які були наведені вище.

[485] Різноманітні макромолекулярні полімери та інші молекули можна сполучати з поліпептидами bG-CSF за цим винаходом для модулювання біологічних властивостей поліпептиду bG-CSF та/або надання нових біологічних властивостей молекулі bG-CSF. Ці макромолекулярні полімери можна сполучати з поліпептидом bG-CSF за допомогою природної амінокислоти, штучно закодованої амінокислоти або будь-якого функціонального замітника природної або штучної амінокислоти чи будь-якого замітника або функціональної групи, приєднаної до природної або штучної амінокислоти. Молекулярна маса згаданого полімеру може варіювати у широкому діапазоні, у тому числі, але без обмеження, у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да або більше. Молекулярна маса полімеру може знаходитись у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да, у тому числі, але без обмеження, 100000 Да, 95,000 Да, 90,000 Да, 85,000 Да, 80,000 Да, 75,000 Да, 70,000 Да, 65,000 Да, 60,000 Да, 55,000 Да, 50,000 Да, 45,000 Да, 40,000 Да, 35,000 Да, 30,000 Да, 25,000 Да, 20,000 Да, 15,000 Да, 10,000 Да, 9,000 Да, 8,000 Да, 7,000 Да, 6,000 Да, 5,000 Да, 4,000 Да, 3,000 Да, 2,000 Да, 1,000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да та 100 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 50,000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 40,000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 40,000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 40,000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 10000 Да до приблизно 40,000 Да.

[486] Цей винахід пропонує по суті гомогенні препарати кон'югатів полімер:білок. Словосполучення "по суті гомогенні", який вживають у цьому описі, означає, що молекули кон'югату полімер:білок, за спостереженням, становлять більше половини від вмісту білка. Кон'югат полімер:білок має біологічну активність, і представлені "по суті гомогенні" препарати пегільованого поліпептиду bG-CSF за цим винаходом являють собою саме ті препарати, які мають достатній рівень гомогенності для проявлення переваг гомогенного препарату, наприклад, простоти клінічного застосування завдяки передбачуваності фармакокінетичних характеристик різних партій препарату.

[487] Можна також вибрати приготування суміші молекул кон'югату полімер:білок, і перевага, яка надається у цьому разі, полягає у тому, що можна вибрати відносну кількість кон'югату монополімер:білок для включення до згаданої суміші. Таким чином, у разі необхідності, можна одержати суміш різних білків із різною кількістю приєднаних полімерних складових (тобто, ди-, три-, тетра- тощо), комбінувати згадані кон'югати з кон'югатом монополімер:білок, який було одержано за методами за цим винаходом, і мати суміш з попередньо визначеною відносною кількістю кон'югатів монополімер:білок.

[488] Вибраний полімер може бути водорозчинним, завдяки чому білок, до якого він приєднується, не осідає у водному середовищі, такому як фізіологічне середовище. Згаданий полімер може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Згаданий полімер буде фармацевтично прийнятним у разі терапевтичного застосування готового препарату.

[489] До прикладів полімерів належать, але без обмеження ними, поліалкільні ефіри та їх аналоги, блоковані алкоксильними групами (наприклад, поліоксіетиленгліколь, поліоксіетилен/пропіленгліколь та їх аналоги, блоковані метоксильними або етоксильними групами, зокрема, поліоксіетиленгліколь, де останній є відомим також як поліетиленгліколь або PEG); полівінілпіролідони; полівінілалкільні ефіри; поліоксазоліни, поліалкілоксазоліни та полігідроксіалкілоксазоліни; поліакриламід, поліалкілакриламід та полігідроксіалкілакриламід (наприклад, полігідроксипропілметакриламід та його похідні); полігідроксіалкілакрилати; полісіалові кислоти та їх аналоги; гідрофільні пептидні послідовності; полісахариди та їх похідні,

у тому числі декстран та похідні декстрану, наприклад, карбоксиметилдекстран, сульфати декстрану, амінодекстран; целюлозу та її похідні, наприклад, карбоксиметилцелюлозу, гідроксіалкілцелюлозу; хітин та його похідні, наприклад, хітозан, сукцинілхітозан, карбоксиметилхітин, карбоксиметилхітозан; гіалуронову кислоту та її похідні; крохмалі; альгірати; сульфат хондроїтину; альбумін; пулулан та карбоксиметилпулулан; поліамінокислоти та їх похідні, наприклад, поліглутамінові кислоти, полілізини, поліаспарагінові кислоти, поліаспартаміди; співполімери малеїнового ангідриду, такі як співполімер стиролу та малеїнового ангідриду, співполімер дивінілетилового ефіру та малеїнового ангідриду; полівінілові спирти; їх співполімери; їх терполімери; їх суміші; гідроксіалкілкрохмаль (HAS), у тому числі, але без обмеження, гідроксіалкілкрохмаль (HES); та їх похідні.

[490] Співвідношення молекул поліетиленгліколю та молекул білка, як і їх концентрації у реакційній суміші, можуть варіювати. Взагалі, оптимальне відношення (з точки зору ефективності реакції – присутність мінімальної надлишкової кількості білка або полімеру, що не прореагувала) можна визначити за молекулярною масою вибраного поліетиленгліколю та кількістю доступних реакційноздатних груп. Стосовно молекулярної маси, то, як правило, чим більшою є молекулярна маса полімеру, тим меншою є кількість молекул полімеру, які можна приєднати до білка. Аналогічно, розгалуженість полімеру має братись до уваги у разі оптимізації цих параметрів. Взагалі, чим більшою є молекулярна маса (або чим більшою є кількість відгалужень), тим вищим буде відношення полімер:білок.

[491] Словосполучення "терапевтично ефективна кількість", яке вживається у цьому описі відносно кон'югатів PEG:поліпептид bG-CSF, означає кількість, яка чинить необхідну сприятливу дію на тварину. Кількість для різних індивідуумів буде різнитись і буде залежати від ряду факторів, у тому числі загального фізичного стану пацієнта та першопричини стану, який підлягає лікуванню. Кількість поліпептиду bG-CSF, застосована для лікування, забезпечує прийнятну швидкість змін та підтримує бажану реакцію на сприятливому рівні. Терапевтично ефективна кількість запропонованих композицій може бути легко визначена фахівцем у цій галузі із застосуванням загальнодоступних матеріалів та процедур.

[492] Водорозчинний полімер може мати будь-яку структурну форму, у тому числі, але без обмеження, лінійну, роздвоєну або розгалужену. Як правило, згаданим водорозчинним полімером є поліалкіленгліколь, такий як полі(етиленгліколь) (PEG), але застосовуватись також можуть інші водорозчинні полімери. Як приклад, PEG використовують для опису певних варіантів здійснення цього винаходу.

[493] PEG є добре відомим водорозчинним полімером, який є комерційно доступним або може бути одержаний шляхом полімеризації етиленгліколю з розкриттям циклу за методами, відомими фахівцям у цій галузі (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, p. 138-161). Термін "PEG" вживається у широкому значенні для охоплення будь-яких молекул поліетиленгліколю, незважаючи на розмір або модифікацію на кінці PEG, де поліетиленгліколь може бути представлений у сполученні з поліпептидом bG-CSF такою формулою:

$$HO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y,$$
 де  $n$  – від 2 до 10,000,  $X$  –  $H$  або кінцева модифікація, у тому числі, але без обмеження,  $C_{1-4}$ -алкіл, захисна група або кінцева функціональна група.

[494] У деяких випадках PEG, який застосовують за цим винаходом, закінчується на одному кінці гідроксильною або метоксильною групою, тобто,  $X - H$  або  $CH_3$  ("метокси-PEG "). Альтернативно PEG може закінчуватись реакційноздатною групою з утворенням, тим самим, біфункціонального полімеру. До типових реакційноздатних груп можуть належати ті реакційноздатні групи, які традиційно застосовують для реагування із функціональними групами 20 звичайних амінокислот (у тому числі, але без обмеження, малеїмідні групи, активовані карбонати (у тому числі, але без обмеження,  $p$ -нітрофеніловий ефір), складні активовані ефіри (у тому числі, але без обмеження,  $N$ -гідроксисукцинімід,  $p$ -нітрофеніловий ефір) та альдегіди), а також функціональні групи, які є інертними до 20 звичайних амінокислот, але які реагують конкретно з комплементарними функціональними групами, присутніми у штучно закодованих амінокислот (у тому числі, але без обмеження, азидними групами, алкіновими групами). Слід звернути увагу на те, що другий кінець PEG, позначений у вищенаведеній формулі як  $Y$ , буде приєднуватись прямо або опосередковано до поліпептиду bG-CSF через природну або штучно закодовану амінокислот. Наприклад,  $Y$  може бути амідним, карбаматним або сечовинним зв'язком з аміною групою (у тому числі, але без обмеження, епсилон-аміном лізину або  $N$ -кінцем) поліпептиду. Альтернативно  $Y$  може бути малеїмідним зв'язком з тіловою групою (у тому числі, але без обмеження, тіловою групою цистеїну). Альтернативно  $Y$  може бути зв'язком із залишком, який, як правило, не є доступним через 20 звичайних амінокислот.

Наприклад, азидна група PEG може реагувати з алкіною групою поліпептиду bG-CSF з одержанням продукту реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсгена. Альтернативно алкінова група PEG може реагувати з азидною групою, присутньою у штучно закодованій амінокислоті, з одержанням подібного продукту. В деяких варіантах здійснення цього винаходу сильний нуклеофіл (у тому числі, але без обмеження, гідразин, гідразид, гідроксиамін, семікарбазид) може реагувати з альдегідною або кетонною групою, присутньою у штучно закодованій амінокислоті, з одержанням гідразону, оксиму або семікарбазону, відповідно, які, у деяких випадках, можна також відновлювати шляхом обробки відповідним відновником. Альтернативно сильний нуклеофіл можна вводити до поліпептиду bG-CSF через штучно закодовану амінокислоту і застосовувати для реагування, за варіантом, якому віддається перевага, з кетонною або альдегідною групою, присутньою у водорозчинному полімері.

[495] Як практично бажаний можна застосовувати PEG з будь-якою молекулярною масою, у тому числі, але без обмеження, від приблизно 100 дальтонів (Да) до 100000 Да або більше, за необхідністю (у тому числі, але без обмеження, подеколи 0,1-50 кДа або 10-40 кДа). Молекулярна маса PEG може варіювати у широких межах, у тому числі, але без обмеження, від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да або більше. Молекулярна маса PEG може варіювати у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да, у тому числі, але без обмеження, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да та 100 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 50000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса полімеру знаходиться у межах від приблизно 10000 Да до приблизно 40000 Да. Застосовуватись можуть також поліетилєнглїколі з розгалуженим ланцюгом, у тому числі, але без обмеження, молекули PEG з молекулярною масою кожного ланцюга у межах 1-100 кДа (у тому числі, але без обмеження, 1-50 кДа або 5-20 кДа). Молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом може знаходитись у межах, у тому числі, але без обмеження, від приблизно 1000 Да до приблизно 100000 Да або більше. Молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом може знаходитись у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 100000 Да, у тому числі, але без обмеження, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да та 1000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 50000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга поліетилєну з розгалуженим ланцюгом знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 20000 Да. Опис широкого діапазону молекул PEG наведений, у тому числі, але без обмеження, у каталозі компанії Shearwater Polymers, Inc. та у каталозі компанії Nektar Therapeutics, які включені до цього опису шляхом посилання.

[496] Взагалі, щонайменше один кінець молекули PEG є доступним для реагування зі штучно закодованою амінокислотою. Наприклад, похідні PEG, які несуть алкінові та азидні складові для реагування з бічними ланцюгами амінокислот, можна застосовувати для приєднання PEG до штучно закодованої амінокислоти як описано у цьому винаході. Якщо штучно закодована амінокислота містить азид, у такому разі PEG, як правило, може містити алкінову складову для утворення продукту реакції [3+2]-циклоприєднання, або активований різновид PEG (тобто складний ефір, карбонат), який містить фосфінову групу, для утворення амідного зв'язку. Альтернативно якщо штучно закодована амінокислота містить алкін, у такому разі PEG, як правило, може містити азидну складову для утворення продукту реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсгена. Якщо штучно закодована амінокислота містить карбонільну групу, у

такому разі PEG, як правило, може містити сильний нуклеофіл (у тому числі, але без обмеження, гідразинову, гідразидну, гідроксиламінову або семікарбазидну функціональну групу) для утворення відповідного гідразонового, оксимового та семікарбазонового зв'язків, відповідно. За іншими альтернативними варіантами може бути застосований зворотний порядок орієнтації реакційноздатних груп, опис яких наведений вище, тобто азидна складова штучно закодованої амінокислоти може реагувати з похідною PEG, яка містить алкін.

[497] В деяких варіантах здійснення цього винаходу варіант поліпептиду bG-CSF з похідною PEG містить хімічну функціональну групу, яка реагує з хімічною функціональною групою, присутньою на бічному ланцюзі штучно закодованої амінокислоти.

[498] В деяких варіантах здійснення цього винаходу цей винахід пропонує похідні азидо- або ацетиленвмісних полімерів, які містять водорозчинний полімерний каркас, який має середню молекулярну масу у межах від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да. Полімерним каркасом водорозчинного полімеру може бути полі(етиленгліколь). Однак слід розуміти, що різноманітні водорозчинні полімери, у тому числі, але без обмеження, полі(етиленгліколь) та інші споріднені полімери, у тому числі полі(декстран) та полі(пропіленгліколь), також є прийнятними для застосування при практичному здійсненні цього винаходу, і що при вживанні терміну "PEG" або "полі(етиленгліколь)" мається на увазі охоплення та включення усіх таких молекул. Термін "PEG" охоплює, але без обмеження ними, полі(етиленгліколь) у будь-якій з його форм, у тому числі, біфункціональний PEG, мультирозгалужений PEG, дериватизований PEG, роздвоєний PEG, розгалужений PEG, PEG з бічними ланцюгами (тобто PEG або споріднені полімери, які мають одну або декілька функціональних груп, підвішених до полімерного каркасу) або PEG зі зв'язками, які руйнуються.

[499] PEG, як правило, прозорий, безбарвний, не має запаху, розчинний у воді, стійкий при нагріванні, інертний до багатьох хімічних агентів, не гідролізується або не розкладається і, взагалі, нетоксичний. Полі(етиленгліколь) вважається біосумісним, тобто PEG може співіснувати з живими тканинами або організмами без спричинення шкоди. Конкретніше, PEG по суті є неімунотенним, тобто PEG не має схильності до викликання імунної реакції у організмі. У разі приєднання до молекули, яка має якусь бажану функцію у організмі, наприклад, як біологічно активний агент, PEG має схильність до маскування згаданого агента і може зменшувати або ліквідувати будь-яку імунну реакцію, завдяки чому організм може переносити присутність згаданого агента. Кон'югати PEG не мають схильності до викликання суттєвої імунної реакції або спричинення згортання крові або інших небажаних ефектів. PEG, який має формулу - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , де  $n$  – від приблизно 3 до приблизно 4000, як правило, від приблизно 20 до приблизно 2000, є прийнятним для застосування за цим винаходом. Полі(етиленгліколи), які мають молекулярну масу від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да, в деяких варіантах здійснення цього винаходу є особливо прийнятними як полімерний каркас. Молекулярна маса PEG може варіювати у широкому діапазоні, у тому числі, але без обмеження, у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да або більше. Молекулярна маса PEG може знаходитись у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да, у тому числі, але без обмеження, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да та 100 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса PEG знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 50000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса PEG знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса PEG знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса PEG знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса PEG знаходиться у межах від приблизно 10000 Да до приблизно 40000 Да.

[500] Полімерний каркас може бути лінійним або розгалуженим. Розгалужені полімерні каркаси, взагалі, є відомими у цій галузі. Як правило, розгалужений полімер має каркасну складову головного ланцюга та певну кількість лінійних полімерних ланцюгів, приєднаних до центральної каркасної складової. PEG традиційно застосовують у розгалужених формах, які можна одержати шляхом приєднання етиленоксиду до різних поліолів, таких як гліцерин, олігомери гліцерину, пентаеритритіол та сорбіт. Центральну каркасну складову можна також одержати від декількох амінокислот, таких як лізин. Розгалужений полі(етиленгліколь) може бути представлений у загальній формі, як  $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ , де R одержаний з каркасної складової, такої як гліцерин, олігомери гліцерину або пентаеритритіол, а  $m$  означає кількість відгалужень.

Мультирозгалужені молекули PEG, такі як молекули, описані у патентах США № 5,932,462; № 5,643,575; № 5,229,490; № 4,289,872; заявці на патент США 2003/0143596; у WO 96/21469 та WO 93/21259, кожен (кожна) з яких включений (-а) до цього опису шляхом посилання, можна також застосовувати як полімерний каркас.

5 [501] Розгалужений PEG також може бути у формі роздвоєного PEG, представленого формулою  $\text{PEG}(-\text{YCHZ}_2)_n$ , де Y – сполучна група, а Z – активована кінцева група, приєднана до СН ланцюгом атомів визначеної довжини.

[502] Ще одна розгалужена форма, PEG з бічними ланцюгами, має реакційноздатні групи, такі як карбоксильна, які розміщені вздовж каркасу PEG, а не на кінці ланцюга PEG.

10 [503] На додаток до цих форм PEG, полімер можна одержати також зі слабкими зв'язками у каркасі або зі зв'язками, які можуть руйнуватися. Наприклад, можна одержати PEG зі складноєфірними зв'язками у полімерному каркасі, які зазнають гідролізу. Як показано нижче, результатом цього гідролізу є розщеплення полімеру на фрагменти меншої молекулярної маси:  
 $-\text{PEG}-\text{CO}_2-\text{PEG}-+\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG}-\text{CO}_2\text{H}+\text{HO}-\text{PEG}-$ .

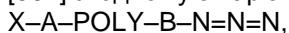
15 Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що термін "полі(етиленгліколь)" або "PEG" означає або охоплює усі форми, відомі у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, описані у цій заявці.

[504] Багато інших полімерів також є прийнятними для застосування за цим винаходом. В деяких варіантах здійснення цього винаходу полімерні каркаси, які є водорозчинними, з кількістю кінців від 2 до приблизно 300, є особливо прийнятними для застосування за цим винаходом. До прикладів прийнятних полімерів належать, але без обмеження ними, інші полі(алкіленгліколі), такі як полі(пропіленгліколь) ("PPG"), їх співполімери (у тому числі, але без обмеження, співполімери етиленгліколю та пропіленгліколю), їх терполімери, їх суміші тощо. Незважаючи на те, що молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу може варіювати, вона, як правило, знаходиться у межах від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да, часто у межах від приблизно 6000 Да до приблизно 80000 Да. Молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу може знаходитись у межах від приблизно 100 Да до приблизно 100000 Да, у тому числі, але без обмеження, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да та 100 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 50000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу знаходиться у межах від приблизно 100 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу знаходиться у межах від приблизно 1000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу знаходиться у межах від приблизно 5000 Да до приблизно 40000 Да. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекулярна маса кожного ланцюга полімерного каркасу знаходиться у межах від приблизно 10000 Да до приблизно 40000 Да.

40 [505] Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що наведений вище список по суті водорозчинних каркасів не є жодною мірою вичерпним і є просто ілюстративним і що усі полімерні матеріали, які мають якісні ознаки, описані вище, розглядаються як прийнятні для застосування за цим винаходом.

45 [506] В деяких варіантах здійснення цього винаходу полімерні похідні є "багатофункціональними", що означає, що полімерний каркас має щонайменше два кінці, а, можливо, і приблизно 300 кінців, функціоналізованих або активованих функціональною групою. До багатофункціональних полімерних похідних належать, але без обмеження ними, лінійні полімери, які мають два кінці, де кожен кінець приєднаний до функціональної групи, які можуть бути однаковими або різними.

[507] У одному з варіантів здійснення цього винаходу похідна полімеру має структуру:



де:

N=N=N – азидна складова;

55 B – сполучна складова, яка може бути присутньою або відсутньою;

POLY – водорозчинний неантигенний полімер;

A – сполучна складова, яка може бути присутньою або відсутньою і яка може бути такою ж самою, що і B або іншою; та

X – друга функціональна група.

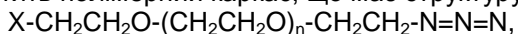
До прикладів сполучної складової для А і В належить, але без обмеження ними, поліфункціоналізована алкільна група, яка містить до 18 атомів, а може містити від 1 атома до 10 атомів вуглецю. До алкільного ланцюга може бути включений гетероатом, такий як атом азоту, кисню або сірки. Алкільний ланцюг може також розгалужуватись на гетероатомі. До інших прикладів сполучної складової для А та В належать, але без обмеження ними, поліфункціоналізовані арильні групи, які містять до 10 атомів, а можуть містити від 5 атомів до 6 атомів вуглецю. Арильна група може бути замінена на ще один атом вуглецю, азоту, кисню або сірки. До інших прикладів прийнятних сполучних груп належать сполучні групи, описані у патентах США № 5,932,462; № 5,643,575; та патентній публікації США 2003/0143596, кожен (кожна) з яких включений (-а) до цього опису шляхом посилання. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що наведений вище список сполучних складових не є жодною мірою вичерпним і є просто ілюстративним, і що усі сполучні складові, які мають якісні ознаки, описані вище, розглядаються як прийнятні для застосування за цим винаходом.

[508] До прикладів прийнятних функціональних груп для застосування як Х належать, але без обмеження ними, гідроксил, захищений гідроксил, алкоксил, активний складний ефір, такий як N-гідроксисукцинімідильні складні ефіри та 1-бензотриазолільні складні ефіри, активний карбонат, такий як N-гідроксисукцинімідильні карбонати та 1-бензотриазолільні карбонати, ацеталь, альдегід, альдегідгідрати, алкеніл, акрилат, метакрилат, акриламід, активний сульфон, амін, амінооксигрупи, захищений амін, гідразид, захищений гідразид, захищений тіол, карбонова кислота, захищена карбонова кислота, ізоціанат, ізотіоціанат, малеїмід, вінілсульфон, дитіопіридин, вінілпіридин, йодоацетамід, епоксид, гліюксалі, діони, мезилати, тозилати, трезилати, алкен, кетон та азид. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що вибрана Х складова повинна бути сумісною з азидною групою для того, щоб реакція з азидною групою не відбувалась. Азидвмісні полімерні похідні можуть бути гомобіфункціональними, що означає, що друга функціональна група (тобто Х) також є азидною складовою, або гетеробіфункціональними, що означає, що друга функціональна група є іншою функціональною групою.

[509] Термін "захищений" означає присутність захисної групи або складової, яка запобігає реакції хімічно реакційноздатної функціональної групи за певних реакційних умов. Згадана захисна група буде варіювати у залежності від типу хімічно реакційноздатної групи, яка захищається. Наприклад, якщо хімічно реакційноздатною групою є амін або гідразид, захисна група може бути вибрана з групи, яку складають трет-бутилоксикарбоніл (t-Boc) та 9-флуоренілметоксикарбоніл (Fmoc). Якщо хімічно реакційноздатною групою є тіол, захисною групою може бути ортопіридилдисульфід. Якщо хімічно реакційноздатною групою є карбонова кислота, така як бутанова або пропіонова кислота, або гідроксильна група, захисною групою може бути бензильна або алкільна група, така як метил, етил або трет-бутил. Інші захисні групи, відомі у цій галузі, також можна застосовувати за цим винаходом.

[510] До конкретних прикладів кінцевих функціональних груп, описаних у літературі, належать, але без обмеження ними, N-сукцинімідилкарбонат (дивись, наприклад, патенти США № 5,281,698, № 5,468,478), амін (дивись, наприклад, Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), гідразид (дивись, наприклад, Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), сукцинімідилпропіонат та сукцинімідилбутаноат (дивись, наприклад, Olson et al. у Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; дивись також патент США № 5,672,662), сукцинімідилсукцинат (дивись, наприклад, Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) та Joppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), сукцинімідиловий складний ефір (дивись, наприклад, патент США № 4,670,417), бензотріазолу карбонат (дивись, наприклад, патент США № 5,650,234), гліцидиловий ефір (дивись, наприклад, Pitha et al. Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), оксикарбонілімідазол (дивись, наприклад, Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)), карбонат п-нітрофенілу (дивись, наприклад, Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); та Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), альдегід (дивись, наприклад, Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), патент США № 5,824,784, патент США № 5,252,714), малеїмід (дивись, наприклад, Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)) та Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ортопіридилдисульфід (дивись, наприклад, Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), акрилол (дивись, наприклад, Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), вінілсульфон (дивись, наприклад, патент США № 5,900,461). Усі вищенаведені посилання та патенти включені до цього опису шляхом посилання.

[511] За певними варіантами здійснення цього винаходу, полімерні похідні за цим винаходом містять полімерний каркас, що має структуру:

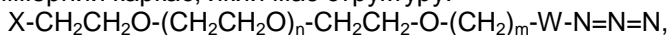


де:

5 X – функціональна група, яка відповідає наведеному вище опису; та

n – від приблизно 20 до приблизно 4000.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу полімерні похідні за цим винаходом містять полімерний каркас, який має структуру:



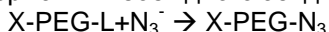
10 де:

W – аліфатична або ароматична сполучна складова, яка містить від 1 атома до 10 атомів вуглецю;

n – від приблизно 20 до приблизно 4000; та

X – функціональна група, яка відповідає наведеному вище опису, m – від приблизно 1 до 10.

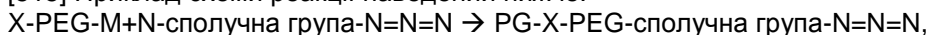
15 [512] Азидвмісні похідні PEG за цим винаходом можна одержати різними способами, відомими у цій галузі та/або описаними у цій заявці. За одним зі способів, описаним нижче, водорозчинний полімерний каркас, який має середню молекулярну масу від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да, при цьому цей полімерний каркас має перший кінець, приєднаний до першої функціональної групи, і другий кінець, приєднаний до прийнятої відщеплюваної групи, реагує з азидним аніоном (який може бути спарованим з будь-яким з цілого ряду прийнятих протиіонів, у тому числі натрієм, калієм, трет-бутиламонієм тощо). Відщеплювану групу піддають нуклеофільному витісненню і замінюють азидною складовою, що надає можливість одержання необхідного азидвмісного полімеру PEG.



25 [513] Як показано, прийнятний полімерний каркас для застосування за цим винаходом має формулу X-PEG-L, де PEG – полі(етиленгліколь), X – функціональна група, яка не реагує з азидними групами, L – прийнятна відщеплювана група. До прикладів прийнятих функціональних груп належать, але без обмеження ними, гідроксил, захищений гідроксил, ацеталь, алкеніл, амін, амінооксил, захищений амін, захищений гідразид, захищений тіол, карбонова кислота, захищена карбонова кислота, малеїмід, дитіопіридин, вінілпіридин та кетон. До прикладів прийнятих відщеплюваних груп належать, але без обмеження ними, хлорид, бромід, йодид, мезилат, трезилат і тозилат.

30 [514] За іншим способом одержання азидвмісних полімерних похідних за цим винаходом сполучний агент, який несе азидну функціональну групу, знаходиться в контакті з водорозчинним полімерним каркасом, який має середню молекулярну масу від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да, при цьому цей сполучний агент несе хімічну функціональну групу, яка буде селективно реагувати з хімічною функціональною групою полімеру PEG з одержанням азидвмісної полімерної похідної, де азид є відокремленим від полімерного каркасу сполучною групою.

40 [515] Приклад схеми реакції наведений нижче:



де:

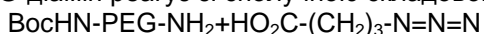
PEG – полі(етиленгліколь), X – група захисту, така як алкоксильна або функціональна група, яка відповідає наведеному вище опису; та

45 M – функціональна група, яка не реагує з азидною функціональною групою, але буде ефективно та селективно реагувати з N функціональною групою.

[516] До прикладів прийнятих функціональних груп належать, але без обмеження ними, M, яка являє собою карбонову кислоту, карбонат або активний складний ефір, якщо N – амін; M, яка являє собою кетон, якщо N – гідразидна або амінооксискладова; M, яка являє собою рухому відщеплювану групу, якщо N – нуклеофіл.

[517] Очищення неочищеного продукту можна здійснювати відомими способами, у тому числі, але без обмеження, осадженням продукту з подальшим хроматографуванням, у разі необхідності.

55 [518] Більш конкретний приклад наведений нижче у разі PEG-діаміну, де один з амінів є захищеним групою захисту, такою як трет-бутил-Вос, і одержаний в результаті монозахиснений PEG-діамін реагує зі сполучною складовою, яка несе азидну функціональну групу:



60 [519] У цьому випадку аміногрупу можна сполучати з карбокисотною групою із застосуванням різних активувальних агентів, таких як тіонілхлорид або карбодіімід, та N-гідроксисукциніміду або N-гідроксибензотриазолу з утворенням амідного зв'язку між

моноамідною PEG-похідною та азидовмісною сполучною складовою. Після успішного утворення амідного зв'язку N-трет-бутил-Вос- захищену азидвмісну похідну, яку одержали, можна використовувати безпосередньо для модифікування біоактивних молекул, або її можна піддати додатковій обробці для введення інших корисних функціональних груп. Наприклад, згадану N-t-  
 5 Вос групу можна гідролізувати шляхом обробки сильною кислотою з одержанням омега-аміно-PEG-азиду. Амін, який одержали, можна застосовувати як синтетичну "ручку" для введення інших корисних функціональних груп, таких як малеїмідні групи, активовані дисульфідні, активовані складні ефіри тощо, для одержання цінних гетеробіфункціональних реактивів.

[520] Гетеробіфункціональні похідні є особливо корисними у разі необхідності приєднання різних молекул до кожного кінця полімеру. Наприклад, омега-N-аміно-N-азидо-PEG надасть можливість приєднання молекули, яка має активовану електрофільну групу, таку як альдегід, кетон, активований складний ефір, активований карбонат тощо, до одного кінця PEG і молекули, яка має ацетиленову групу, до іншого кінця PEG.

[521] В іншому варіанті здійснення цього винаходу полімерна похідна має структуру:

15 X-A-POLY-B-C≡C-R,

де:

R може бути H або алкільною, алкеновою, алкілоксигрупою чи арильною або заміщеною арильною групою;

B – сполучна складова, яка може бути присутньою або відсутньою;

20 POLY – водорозчинний неантигенний полімер;

A – сполучна складова, яка може бути присутньою або відсутньою і яка може бути такою самою, що і B або іншою; та

X – друга функціональна група.

[522] До прикладів сполучної складової для A та B належить, але без обмеження ними, поліфункціоналізована алкільна група, яка містить до 18 атомів, а може містити від 1 атому до 10 атомів вуглецю. Алкільний ланцюг може містити гетероатом, такий як азот, кисень або сірка. Згаданий алкільний ланцюг може бути розгалуженим на гетероатомі. До інших прикладів сполучної складової для A та B належить, але без обмеження ними, поліфункціоналізована арильна група, яка містить до 10 атомів, і може містити 5-6 атомів вуглецю. Згадана арильна група може бути замінена одним або декількома атомами вуглецю, азоту, кисню або сірки. До інших прикладів прийнятних сполучних груп належать ті сполучні групи, які описані у патентах США № 5,932,462 та № 5,643,575 і патентній публікації США 2003/0143596, кожен (кожна) з яких включений (-а) до цього опису шляхом посилання. Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що наведений вище список сполучних складових не є будь-яким чином вичерпним, а просто ілюстративним, і що найрізноманітніші сполучні складові, які мають якісні ознаки, описані вище, розглядаються як прийнятні для застосування за цим винаходом.

[523] До прикладів прийнятних функціональних груп для застосування як X належать гідроксил, захищений гідроксил, алкоксил, активний складний ефір, такий як N-гідроксисукцинімідильні складні ефіри та 1-бензотриазолільні складні ефіри, активний карбонат, такий як N-гідроксисукцинімідильні карбонати та 1-бензотриазолільні карбонати, ацеталь, альдегід, альдегідгідрати, алкеніл, акрилат, метакрилат, акриламід, активний сульфен, амін, амінооксил, захищений амін, гідразид, захищений гідразид, захищений тіол, карбонова кислота, захищена карбонова кислота, ізоціанат, ізотіоціанат, малеїмід, вінілсульфон, дитіопіридин, вінілпіридин, йодоацетамід, епоксид, гліюксалі, діони, мезилати, тозилати, трезилати, алкен, кетон та ацетилен. Слід розуміти, що вибрана X складова повинна бути сумісною з ацетиленовою групою для того, щоб реакція з ацетиленовою групою не відбувалась. Ацетиленвмісні полімерні похідні можуть бути гомобіфункціональними, що означає, що друга функціональна група (тобто X) також є ацетиленовою складовою, або гетеробіфункціональною складовою, що означає, що друга функціональна група є іншою функціональною групою.

50 [524] В іншому варіанті здійснення цього винаходу полімерні похідні містять полімерний каркас, який має структуру:

$X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ ,

де:

X – функціональна група, яка відповідає наведеному вище опису;

55 n – від приблизно 20 до приблизно 4000; та

m – від 1 до 10.

Конкретні приклади кожного з гетеробіфункціональних полімерів PEG наведені нижче.

[525] Ацетиленвмісні похідні PEG за цим винаходом можна одержати способами, відомими фахівцям у цій галузі та/або описаними у цій заявці. За одним зі способів водорозчинний полімерний каркас, який має середню молекулярну масу від приблизно 800 Да до приблизно



100000 Да, при цьому цей полімерний каркас має перший кінець, приєднаний до першої функціональної групи, і другий кінець, приєднаний до відповідної нуклеофільної групи, реагує із сполукою, що несе як ацетиленову функціональну групу, так і відщеплювану групу, яка є прийнятною для реагування з нуклеофільною групою PEG. У разі об'єднання полімеру PEG, що несе нуклеофільну складову, та молекули, яка несе відщеплювану групу, відщеплювану групу піддають нуклеофільному витісненню і замінюють нуклеофільною складовою, яка надає можливість одержання необхідного ацетиленвмісного полімеру.



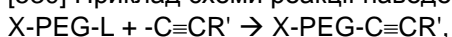
[526] Як показано, полімерний каркас, якому віддається перевага для використання у цій реакції, має формулу X-PEG-Nu, де PEG – полі(етиленгліколь), Nu – нуклеофільна складова, X – функціональна група, яка не реагує з Nu, L або ацетиленовою функціональною групою.

[527] До прикладів Nu належать, але без обмеження ними, аміно-, алкокси-, арилокси-, сульфгідрильну, іміно-, карбоксилатну, гідразидну, амінооксигрупи, які будуть реагувати, головним чином, за механізмом SN2-типу. До інших прикладів Nu груп належать ті функціональні групи, які будуть реагувати, головним чином, за реакцією нуклеофільного приєднання. До прикладів L груп належать хлорид, бромід, йодид, мезилат, трезилат та тозилат і інші групи, які, як очікується, зазнають нуклеофільного витіснення, а також кетони, альдегіди, складні тіоефіри, олефіни, альфа-бета-ненасичені карбонільні групи, карбонати та інші електрофільні групи, які, як очікується, зазнають нуклеофільного приєднання.

[528] В іншому варіанті здійснення цього винаходу А являє собою аліфатичну сполучну групу, яка містить від 1 атома до 10 атомів вуглецю, або заміщений арильний цикл, який містить від 6 атомів до 14 атомів вуглецю. X – функціональна група, яка не реагує з азидними групами, а L – прийнятна відщеплювана група.

[529] За іншим способом одержання ацетиленвмісних полімерних похідних за цим винаходом полімер PEG, який має середню молекулярну масу від приблизно 800 Да до приблизно 100000 Да та який несе захищену функціональну групу або захисний агент на одному кінці та прийнятну відщеплювану групу на другому кінці, контактує з ацетиленовим аніоном.

[530] Приклад схеми реакції наведений нижче:



де:

PEG – полі(етиленгліколь), X – захисна група, така як алкоксильна група або функціональна група, яка відповідає наведеному вище опису; та

R' – H, алкільна, алкоксильна, арильна або арилоксигрупа чи заміщена алкільна, алкоксильна, арильна чи арилоксигрупа.

[531] За вищенаведеним прикладом, відщеплювана група L повинна бути достатньо реакційноздатною, щоб зазнати витіснення за SN2-типом у разі введення в контакт з ацетиленовим аніоном у достатній концентрації. Реакційні умови, необхідні для здійснення витіснення за SN2-типом відщеплюваної групи ацетиленовими аніонами, є відомими фахівцям у цій галузі.

[532] Очищення неочищеного продукту можна здійснювати способами, відомими у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом осадження продукту з подальшим хроматографуванням, у разі необхідності.

[533] Водорозчинні полімери можуть зв'язуватись з поліпептидами bG-CSF за цим винаходом. Водорозчинні полімери можуть зв'язуватись через штучно закодовану амінокислоту, введену до поліпептиду bG-CSF, або будь-яку функціональну групу чи замісник штучно закодованої або природної амінокислоти чи будь-яку функціональну групу або замісник, приєднаний до штучно закодованої або природної амінокислоти. Альтернативно водорозчинні полімери зв'язуються з поліпептидом bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, через природну амінокислоту (у тому числі, але без обмеження, цистеїн, лізин або аміногрупу N-кінцевого залишку). У деяких варіантах здійснення поліпептиди bG-CSF за цим винаходом містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 штучно закодованих амінокислот, ще одна або декілька штучно закодованих амінокислот є приєднані до водорозчинного(-их) полімеру(-ів) (у тому числі, але без обмеження, PEG та/або олігосахариди). У деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF за цим винаходом додатково містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше природних амінокислот, приєднаних до водорозчинних полімерів. У деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF за цим винаходом містять одну або декілька штучно закодованих амінокислот, приєднаних до водорозчинних полімерів, та одну або декілька природних амінокислот, приєднаних до водорозчинних полімерів. В деяких варіантах здійснення

цього винаходу водорозчинні полімери, які застосовують за цим винаходом, збільшують період напіввиведення поліпептиду bG-CSF з плазми у порівнянні з некон'югованою формою.

[534] Кількість водорозчинних полімерів, приєднаних до поліпептиду bG-CSF (тобто ступінь пегілування або глікозилювання) за цим винаходом, можна змінювати для забезпечення змінених (у тому числі, але без обмеження, збільшених або зменшених) фармакологічних, фармакокінетичних або фармакодинамічних характеристик, таких як *in vivo* період напіввиведення. В деяких варіантах здійснення цього винаходу період напіввиведення bG-CSF збільшується на щонайменше приблизно 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, у 2 рази, 5 разів, 6 разів, 7 разів, 8 разів, 9 разів, 10 разів, 11 разів, 12 разів, 13 разів, 14 разів, 15 разів, 16 разів, 17 разів, 18 разів, 19 разів, 20 разів, 25 разів, 30 разів, 35 разів, 40 разів, 50 разів або у щонайменше приблизно 100 разів у порівнянні з немодифікованим поліпептидом.

Похідні PEG, які містять сильну нуклеофільну групу (тобто гідрозид, гідрозин, гідроксиламін або семікарбазид)

[535] За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну штучно закодовану амінокислоту, модифікують похідною PEG, яка містить кінцеву гідрозидову, гідроксиламінову, гідрозидну або семікарбазидну складову, яка приєднана безпосередньо до каркасу PEG.

[536] В деяких варіантах здійснення цього винаходу гідроксиламінокінцева похідна PEG буде мати структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, та n – 100-1000 (тобто середня молекулярна маса становить від 5 кДа до 40 кДа).

[537] В деяких варіантах здійснення цього винаходу гідрозин- або гідрозидвмісна похідна PEG буде мати структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, n – 100-1000, X факультативно є карбонільною групою (C=O), яка може бути присутньою або відсутньою.

[538] В деяких варіантах здійснення цього винаходу семікарбазидвмісна похідна PEG буде мати структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, і n – 100-1000.

[539] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, модифікують похідною PEG, яка містить кінцеву гідроксиламінову, гідрозидну, гідрозидову або семікарбазидну складову, яка приєднана до каркасу PEG за допомогою амідного зв'язку.

[540] В деяких варіантах здійснення цього винаходу гідроксиламінокінцеві похідні PEG мають структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, і n – 100-1000 (тобто середня молекулярна маса становить від 5 кДа до 40 кДа).

[541] В деяких варіантах здійснення цього винаходу гідрозин- або гідрозидвмісні похідні PEG мають структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл і т.ін.), m – 2-10, n – 100-1000, X, факультативно, карбонільна група (C=O), що може бути присутньою або відсутньою.

[542] В деяких варіантах здійснення цього винаходу семікарбазидвмісні похідні PEG мають структуру:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$   
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, та n – 100-1000.

[543] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, модифікують розгалуженою похідною PEG, яка містить кінцеву гідрозидову, гідроксиламінову, гідрозидну або семікарбазидну складову, де молекулярна маса кожного ланцюга розгалуженого PEG, яка знаходиться у межах від 10 кДа до 40 кДа, може становити 5-20 кДа.

[544] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, модифікують похідною PEG, яка має розгалужену структуру. Наприклад, в деяких варіантах здійснення цього винаходу гідрозин- або гідрозидкінцева похідна PEG буде мати наведену нижче структуру:

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ ,

де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, n – 100-1000, X факультативно є карбонільною групою (C=O), яка може бути присутньою або відсутньою.

[545] В деяких варіантах здійснення цього винаходу похідні PEG, які містять семікарбазидну групу, будуть мати структуру:

5  $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), X факультативно є NH, O, S, C(O) або відсутня, m – 2-10, n – 100-1000.

[546] В деяких варіантах здійснення цього винаходу похідні PEG, які містять гідроксиламінову групу, будуть мати структуру:

10  $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$ ,  
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), X факультативно є NH, O, S, C(O) або відсутня, m – 2-10, n – 100-1000.

[547] Ступінь і сайти, на яких водорозчинний(-и) полімер(-и) є сполученим(-и) з поліпептидом bG-CSF, можуть модулювати зв'язування поліпептиду bG-CSF з рецептором. В деяких варіантах здійснення цього винаходу сполучні зв'язки розміщують таким чином, що поліпептид bG-CSF зв'язує рецептор з  $K_d$  приблизно 400 нМ або менше, з  $K_d$  150 нМ або менше і, у деяких випадках, з  $K_d$  100 нМ або менше при визначенні із застосуванням аналізу зв'язування у стані рівноваги, описаного у Spencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988).

[548] Методи та хімія активації полімерів, а також кон'югації пептидів описані у літературі і є відомими у цій галузі. До традиційно застосовуваних методів активації полімерів належать, але без обмеження ними, активація функціональних груп ціаногенбромідом, періодатом, глутаральдегідом, біпоксидами, епіхлоргідрином, дивінілсульфоном, карбодіімідом, сульфонілгалогенідами, трихлоротриазиним тощо (дивись 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).

[549] Доступними є декілька оглядових статей та монографій із функціоналізації та кон'югації PEG. Дивись, наприклад, 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).

[550] Методи активації полімерів можна також знайти у WO 94/17039, патенті США № 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, патенті США № 5,219,564, патенті США № 5,122,614, WO 90/13540, патенті США № 5,281,698 та WO 93/15189, і кон'югації активованих полімерів із ферментами, у тому числі, але без обмеження, фактором коагуляції VIII (WO 94/15625), гемоглобіном (WO 94/09027), кисеньпереносною молекулою (патент США № 4,412,989), рибонуклеазою та супероксиддисмутазою (Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11: 141-152 (1985)). Усі цитовані посилання та патенти включені до цього опису шляхом посилання.

[551] Пегілювання (тобто приєднання будь-якого водорозчинного полімеру) поліпептидів bG-CSF, які містять штучно закодовані амінокислоти, такі як п-азидо-L-фенілаланін, здійснюють за допомогою будь-якого прийнятного методу. Наприклад, поліпептид bG-CSF пегілюють алкінкінцевою похідною mPEG. Стисло, надлишкову кількість твердого mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH додають, з перемішуванням, до водного розчину п-азидо-L-Phe-вмісного поліпептиду bG-CSF при кімнатній температурі. Як правило, до водного розчину додають буфер, який має значення рK<sub>a</sub>, наближене до значення pH, при якому повинна проходити реакція (як правило, приблизно pH 4-10). Зразки прийнятних буферів для пегілювання при pH 7,5, наприклад, включають, але без обмеження ними, гепес-буфер, фосфат, борат, трис-HCl, EPPS (3-[N-трис-(гідроксиметил)етиламіно]-2-гідроксietил)-1-піперазинпропансульфонова кислота) та TES (2-([2-гідрокси-1,1-біс(гідроксиметил)етил]аміно)етансульфонова кислота). Рівень pH постійно контролюють і регулюють, у разі необхідності. Тривалість реакції, як правило, становить від приблизно 1 год. до 48 год.

[552] Продукти реакції у подальшому піддають гідрофобному хроматографуванню для відділення пегільованих варіантів поліпептиду bG-CSF від вільного mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH та будь-яких високомолекулярних комплексів пегільованого поліпептиду bG-CSF, які можуть утворюватись у разі, коли деблокований PEG активується на обох кінцях молекули із зшиванням молекул варіанта поліпептиду bG-CSF. Умови під час проведення гідрофобного хроматографування такі, що вільний mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH проходить через колонку, у той час як будь-які комплекси варіантів зшитого пегільованого поліпептиду bG-CSF елюються за

бажаними формами, які містять одну молекулу варіанта поліпептиду bG-CSF, кон'юговану з однією або декількома групами PEG. Прийнятні умови варіюють у залежності від відносного розміру зшитих комплексів у зіставленні з бажаними кон'югатами і легко визначаються фахівцями у цій галузі. Елюент, який містить необхідні кон'югати, концентрують шляхом ультрафільтрації та знесолюють шляхом діалізації.

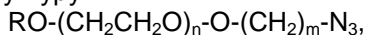
[553] У разі необхідності пегільований пептид bG-CSF, який одержують після гідрофобного хроматографування, можна додатково очищати за допомогою одного або декількох методів, відомих фахівцям у цій галузі, у тому числі, але без обмеження, шляхом афінної хроматографії; аніоно- або катіонообмінної хроматографії (із застосуванням, у тому числі, але без обмеження, DEAE SEP HAROSE); хроматографії на діоксиді кремнію; високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою; гель-фільтрації (із застосуванням, у тому числі, але без обмеження, SEPHADEX G-75); гідрофобної хроматографії; гель-хроматографії за розміром молекул; металхелатної хроматографії; ультрафільтрації/діалізації; осадження етанолом; осадження сульфатом амонію; хроматофокусування; витіснювальної хроматографії; електрофоретичних методів (у тому числі, але без обмеження, препаративного ізоелектричного фокусування), диференційної розчинності (у тому числі, але без обмеження, осадження сульфатом амонію) або екстракції. Середню молекулярну масу можна визначати засобами гель-проникної хроматографії шляхом порівняння зі стандартами глобулярного білка (Preneta, AZ in Protein purification methods, a practical approach (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). Ступінь чистоти кон'югату bG-CSF-PEG можна оцінювати шляхом протеолітичного розкладу (у тому числі, але без обмеження, розщеплення трипсином) з подальшим мас-спектрометричним аналізом. Pepinsky RB., et al., J. Pharmcol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

[554] Водорозчинний полімер, сполучений з амінокислотою поліпептиду bG-CSF за цим винаходом, можна додатково дериватизувати або замінювати без обмеження.

Азидвмісні похідні PEG

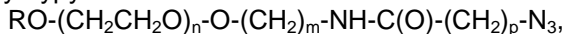
[555] В ще одному варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF модифікують похідною PEG, яка містить азидну складову, яка буде реагувати з алкіною складовою, присутньою на бічному ланцюзі штучно закодованої амінокислоти. Взагалі, похідні PEG будуть мати середню молекулярну масу у межах від 1 кДа до 100 кДа і в деяких варіантах здійснення цього винаходу – у межах від 10 кДа до 40 кДа.

[556] В деяких варіантах здійснення цього винаходу азидкінцева похідна PEG буде мати структуру:



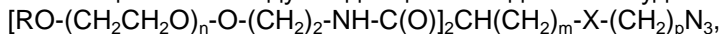
де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, і n – 100-1000 (тобто середня молекулярна маса становить від 5 кДа до 40 кДа).

[557] В іншому варіанті здійснення цього винаходу азидкінцева похідна PEG буде мати структуру:



де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, p – 2-10, n – 100-1000, (тобто середня молекулярна маса становить від 5 кДа до 40 кДа).

[558] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить алкінвмісну амінокислоту, модифікують розгалуженою похідною PEG, яка містить кінцеву азидну складову, де молекулярна маса кожного ланцюга розгалуженого PEG, яка знаходиться у межах від 10 кДа до 40 кДа, може дорівнювати 5-20 кДа. Наприклад, в деяких варіантах здійснення цього винаходу азидкінцева похідна PEG буде мати наведену нижче структуру:

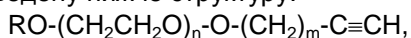


де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, p – 2-10, n – 100-1000, X факультативно є O, N, S або карбонільна група (C=O), яка у кожному випадку може бути присутньою або відсутньою.

Алкінвмісні похідні PEG

[559] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF модифікують похідною PEG, яка містить алкінову складову, яка буде реагувати з азидною складовою, присутньою на бічному ланцюзі штучно закодованої амінокислоти.

[560] В деяких варіантах здійснення цього винаходу алкінкінцева похідна PEG буде мати наведену нижче структуру:

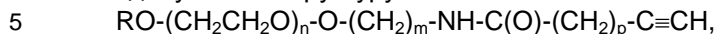


де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, і n – 100-1000 (тобто середня молекулярна маса становить від 5 кДа до 40 кДа).

[561] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить алкінвмісну штучно закодовану амінокислоту, модифікують похідною PEG, яка містить кінцеву

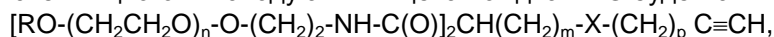
азидну або кінцеву алкінову складову, яка є сполученою з каркасом PEG за допомогою амідного зв'язку.

[562] В деяких варіантах здійснення цього винаходу алкінкінцева похідна PEG буде мати наведену нижче структуру:



де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, p – 2-10, n – 100-1000.

[563] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить азидвмісну амінокислоту, модифікують розгалуженою похідною PEG, яка містить кінцеву алкінову складову, де молекулярна маса кожного ланцюга розгалуженого PEG, яка знаходиться у межах від 10 кДа до 40 кДа, може дорівнювати 5-20 кДа. Наприклад, в деяких варіантах здійснення цього винаходу алкінкінцева похідна PEG буде мати наведену нижче структуру:

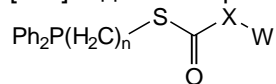


де R – простий алкіл (метил, етил, пропіл тощо), m – 2-10, p – 2-10, n – 100-1000, X факультативно є O, N, S або карбонільна група (C=O) чи не представлена.

15 Фосфінвмісні похідні PEG

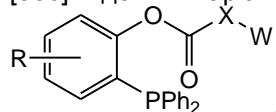
[564] В іншому варіанті здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF модифікують похідною PEG, яка містить активовану функціональну групу (у тому числі, але без обмеження, складний ефір, карбонат), яка також містить арилфосфінову групу, яка буде реагувати з азидною складовою, присутньою на бічному ланцюзі штучно закодованої амінокислоти. Взагалі, похідні PEG будуть мати середню молекулярну масу у межах від 1 кДа до 100 кДа і, в деяких варіантах здійснення цього винаходу від 10 кДа до 40 кДа.

[565] В деяких варіантах здійснення цього винаходу похідна PEG буде мати структуру:



25 де n – 1-10; X може бути O, N, S або не представленою, Ph – феніл, W – водорозчинний полімер.

[566] В деяких варіантах здійснення цього винаходу похідна PEG буде мати структуру:



30 де X може бути O, N, S або не представленою, Ph – феніл, W – водорозчинний полімер, а R може бути H, алкільною, арильною, заміщеною алкільною та заміщеною арильною групами. До прикладів групи R належать, але без обмеження ними, -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 та -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' та R''', кожен незалежно від інших, означає водень, заміщені або незаміщені гетероалкільні, заміщені або незаміщені арильні, у тому числі, але без обмеження, арильні, заміщені 1-3 атомами галогену, заміщені або незаміщені алкільні, алкоксильні або тіоалкоксильні групи чи арилалкільні групи. Якщо сполука за цим винаходом містить більше однієї групи R, наприклад, кожна з груп R вибрана незалежно від інших, також як і кожна з груп R', R'', R''' та R''', у разі присутності більше ніж однієї із цих груп. Якщо R' та R'' приєднані до одного атому азоту, вони можуть бути об'єднані з атомом азоту з утворенням 5-, 6- або 7-членного циклу. Наприклад, -NR'R'' означає, але без обмеження ними, 1-піролідиніл та 4-морфолініл. З вищенаведеного обговорення замісників, фахівцю у цій галузі зрозуміло, що термін "алкіл" охоплює групи, у тому числі, атоми вуглецю, приєднані до груп, які не є водневими групами, такими як галогеналкіл (у тому числі, але без обмеження, -CF<sub>3</sub> та -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) та ацил (у тому числі, але без обмеження, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> тощо).

Інші похідні PEG та загальні методи пегілування

45 [567] До інших прикладів молекул PEG, які можуть бути сполучені з поліпептидами bG-CSF, а також методів пегілування належать, але не обмежуються молекулами та методами, опис яких наведених, наприклад, у патентних публікаціях 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; № 2002/0086939; № 2002/0082345; № 2002/0072573; № 2002/0052430; № 2002/0040076; № 2002/0037949; № 2002/0002250; № 2001/0056171; № 2001/0044526; № 2001/0021763; патентах США № 6,646,110; № 5,824,778; № 5,476,653; № 5,219,564; № 5,629,384; № 5,736,625; № 4,902,502; № 5,281,698; № 5,122,614; № 5,473,034; № 5,516,673; № 5,382,657; № 6,552,167; № 6,610,281; № 6,515,100; № 6,461,603; № 6,436,386; № 6,214,966; № 5,990,237; № 5,900,461; № 5,739,208; № 5,672,662; № 5,446,090; № 5,808,096; № 5,612,460; № 5,324,844; № 5,252,714; № 6,420,339; № 6,201,072; № 6,451,346; № 6,306,821;

№ 5,559,213; № 5,747,646; № 5,834,594; № 5,849,860; № 5,980,948; № 6,004,573; № 6,129,912; WO 97/32607, у EP 229,108, EP 402,378, у WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, 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 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 та EP 154 316, які включені до цього опису шляхом посилання. Будь-яка з молекул PEG, опис яких наведений у цій заявці, може застосовуватись у будь-якій формі, у тому числі, але без обмеження, у формі одного ланцюга, розгалуженого ланцюга, мультирозгалуженого ланцюга, однофункціонального, біфункціонального, поліфункціонального або будь-якої їх комбінації.

[568] Інші полімерні похідні та похідні PEG, у тому числі, але без обмеження, гідроксиламінові (аміноокси) похідні PEG, описані у наведених нижче заявках на патент, усі з яких у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання: патентній публікації США № 2006/0194256, патентній публікації США № 2006/0217532, патентній публікації США № 2006/0217289, попередній заявці на патент США № 60/755,338; попередній заявці на патент США № 60/755,711; попередній заявці на патент США № 60/755,018; PCT/US06/49397; WO 2006/069246; попередній заявці на патент США № 60/743,041; попередній заявці на патент США № 60/743,040; PCT/US06/47822; попередній заявці на патент США № 60/882,819; попередній заявці на патент США № 60/882,500 та попередній заявці на патент США № 60/870,594.

Гетерологічні Fc-гібридні білки

[569] Сполуки bG-CSF, опис яких наведений вище, можна гібридизувати, безпосередньо або через пептидний сполучний зв'язок, з Fc-фрагментом імуноглобуліну. Імуноглобуліни являють собою молекули, які містять поліпептидні ланцюги, утримувані разом дисульфідними зв'язками, та, як правило, мають два легкі ланцюги і два важкі ланцюги. У кожному ланцюзі один домен (V) має варіабельну амінокислотну послідовність, у залежності від антитільної специфічності згаданої молекули. Інші домени (C) мають доволі постійну послідовність, спільну для молекул одного класу.

[570] Словосполучення "Fc-фрагмент імуноглобуліну", яке вживають у цьому описі, має значення, яке, як правило, надається цьому словосполученню у галузі імунології. Конкретно, це словосполучення означає фрагмент антитіла, який одержують шляхом видалення двох антигензв'язувальних ділянок (Fab-фрагментів) з антитіла. Одним зі способів видалення Fab-фрагментів є розщеплення імуноглобуліну папаїновою протеазою. Таким чином, Fc-фрагмент формується із фрагментів константної ділянки обох важких ланцюгів приблизно однакового розміру, які пов'язуються між собою нековалентними взаємодіями та дисульфідними зв'язками. Fc-фрагмент може включати шарнірні ділянки і простягатись через CH2 та CH3 домени до C-кінця антитіла. Репрезентативні шарнірні ділянки людських та мишачих імуноглобулінів можна знайти у Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck C.A.K., ed., W.H. Freeman and Co., 1992, зміст якого включено до цього опису шляхом посилання. Крім цього, Fc-фрагмент може включати один або декілька сайтів глікозилювання. Амінокислотні послідовності численних репрезентативних білків Fc-фрагмента, який містить шарнірну ділянку, CH2 та CH3 домени і один сайт N-глікозилювання, є добре відомими у цій галузі.

[571] Існує п'ять типів людських імуноглобулінових Fc-ділянок із різними ефекторними функціями та фармакокінетичними властивостями: IgG, IgA, IgM, IgD та IgE. Найширше представленим у сироватці є IgG. IgG також має найдовший період напіввиведення з плазми у порівнянні з будь-яким іншим імуноглобуліном (23 дні). На відміну від інших імуноглобулінів, IgG ефективно рециркулюється після зв'язування з Fc-рецептором. Існує чотири підкласи IgG, а саме G1, G2, G3 та G4, кожен з яких має різні ефекторні функції. G1, G2 та G3 можуть зв'язувати C1q та фіксувати комплемент, у той час як G4 цього робити не може. Незважаючи на те, що G3 зв'язує C1q з більшою ефективністю, ніж G1, G1 з більшою ефективністю опосередковує комплемент-спрямований лізис клітин. G2 вкрай неефективно фіксує комплемент. Сайт зв'язування C1q у IgG знаходиться на карбоксикінцевій ділянці CH2 домену.

[572] Усі підкласи IgG можуть зв'язуватись з Fc-рецепторами (CD16, CD32, CD64), причому G1 та G3 є більш ефективними, ніж G2 та G4. Ділянка зв'язування Fc-рецептора IgG складається із залишків, розміщених як на шарнірних, так і на карбоксикінцевих ділянках CH2 домену.

[573] IgA може існувати як у мономерній, так і у димерній формі, окремі елементи якої утримуються разом за допомогою з'єднувальних ділянок поліпептидного ланцюга. IgA є другим найбільш широко представленим Ig у сироватці, але період його напіввиведення з плазми

становить лише 6 днів. IgA має три ефекторні функції. Він зв'язується з IgA-специфічним рецептором на макрофагах та еозинофілах, які стимулюють фагоцитоз та дегрануляцію, відповідно. Він також може фіксувати комплемент невідомим альтернативним шляхом.

[574] IgM експресується у формі пентамеру або гексамеру, окремі елементи яких утримуються разом за допомогою з'єднувальних ділянок поліпептидного ланцюга. Період напіввиведення IgM з плазми становить 5 днів. Він слабо зв'язується з C1q через зв'язувальний сайт, розміщений на його CH3 домені. Період напіввиведення IgD з плазми дорівнює 3 дням. Невідомо, які ефекторні функції пов'язані із цим Ig. IgE являє собою мономерний Ig і має період напіввиведення з плазми, тривалість якого становить 2,5 дня. IgE зв'язується з двома Fc-рецепторами, що стимулює дегрануляцію і призводить до виділення прозапальних агентів.

[575] У залежності від бажаного *in vivo* ефекту, гетерологічні гібридні білки за цим винаходом можуть містити будь-який з вищеописаних ізотипів і можуть містити мутовані Fc-ділянки, на яких були змінені функції зв'язування комплексу та/або Fc-рецептора. Таким чином, гетерологічні гібридні білки за цим винаходом можуть містити Fc-ділянку імуноглобуліну у цілому, фрагменти Fc-ділянки імуноглобуліну або її аналоги, гібридизовані зі сполукою bG-CSF.

[576] Гібридні білки за цим винаходом можуть являти собою одноланцюгові білки або багатоланцюгові білки. Два або декілька Fc-гібридних білків можуть бути продуковані таким чином, що вони взаємодіють через дисульфідні зв'язки, які природним чином утворюються між Fc-ділянками. Ці мультимери можуть бути гомогенними по відношенню до сполуки bG-CSF або вони можуть містити різні сполуки bG-CSF, гібридизовані на N-кінці Fc-ділянки гібридного білка.

[577] Незалежно від кінцевої структури гібридного білка, Fc-ділянка або Fc-подібна ділянка може використовуватися для подовження *in vivo* періоду напіввиведення з плазми сполуки bG-CSF, гібридизованої на N-кінці. Окрім того, складова bG-CSF гібридної білкової сполуки повинна зберігати щонайменше одну біологічну активність bG-CSF. Подовження періоду напіввиведення терапевтично ефективної кількості або часу знаходження у кровообізі може бути продемонстроване за допомогою методу, опис якого наведено або який є відомим у цій галузі, де період напіввиведення гібридного білка порівнюють із періодом напіввиведення тільки сполуки bG-CSF. Біологічну активність можна визначати за допомогою *in vitro* та *in vivo* методів, відомих у цій галузі.

[578] Оскільки Fc-ділянка IgG, яку одержують шляхом протеолізу, має такий самий *in vivo* період напіввиведення, що і інтактна молекула IgG, а Fab-фрагменти швидко деградує, вважають, що відповідна послідовність для подовження періоду напіввиведення знаходиться у CH2 та/або CH3 доменах. Окрім того, у літературі було описано, що швидкість катаболізму варіантів IgG, які не зв'язують високоафінний Fc-рецептор або C1q, не відрізняється від швидкості кліренсу вихідного антитіла дикого типу, що вказує на те, що катаболічний сайт відрізняється від сайтів, які приймають участь у зв'язуванні Fc-рецептора або C1q. [Wawrzynszak et al., (1992) *Molecular Immunology* 29:221]. Результати досліджень із сайт-спрямованого мутагенезу із застосуванням Fc-ділянки мишачого IgG1 дозволяють зробити припущення про те, що сайт Fc-ділянки IgG1, який контролює швидкість катаболізму, розміщений на поверхні розділу CH2-CH3 доменів. Fc-ділянки можна модифікувати на катаболічному сайті для оптимізації періоду напіввиведення гібридних білків. Fc-ділянку, використану для гібридних білків за цим винаходом, можна одержати з Fc-ділянки як IgG1, так і з Fc-ділянки IgG4, і вона може містити як CH2, так і CH3 домени, а також шарнірну ділянку.

Гетерологічні гібридні білки з альбуміном

[579] bG-CSF, опис якого наведено, можна гібридизувати безпосередньо або через пептидний сполучний агент, водорозчинний полімер або сполучний агент у формі проліків, з альбуміном або його аналогом, фрагментом чи похідною. Взагалі, альбумінові білки, які є складовою частиною гібридних білків за цим винаходом, можна одержати з альбуміну, клонованого з будь-якого виду, у тому числі людини. Людський сироватковий альбумін (HSA) складається з одного неглікозилизованого поліпептидного ланцюга довжиною у 585 амінокислот із формульною масою 66500. Амінокислотна послідовність людського HSA є відомою [Дивись 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, кожна з яких включена до цього опису шляхом посилання]. Описані різноманітні поліморфні варіанти, а також аналоги та фрагменти альбуміну. [Дивись Weitekamp, et al., (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219]. Наприклад, у EP 322,094 наведений опис різних скорочених форм HSA. Розкриті деякі із цих фрагментів HSA, у тому числі HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) та HSA(1-419), і фрагменти між 1-369 та 1-419. У EP 399,666 описані фрагменти альбуміну, які включають HSA(1-177) та HSA(1-200), і фрагменти між HSA(1-177) та HSA(1-200).

[580] Слід розуміти, що гетерологічні гібридні білки за цим винаходом включають сполуки bG-CSF, які є сполученими з будь-яким альбуміновим білком, у тому числі фрагментами, аналогами та похідними, де згаданий гібридний білок є біологічно активним і має довший період напіввиведення з плазми, аніж сама сполука bG-CSF. Таким чином, альбумінова частина гібридного білка не обов'язково повинна мати період напіввиведення з плазми, який дорівнює періоду напіввиведення з плазми нативного людського альбуміну. Є відомими або можуть бути одержані фрагменти, аналоги і похідні, які мають довший період напіввиведення або період напіввиведення, проміжний між періодом напіввиведення нативного людського альбуміну та періодом напіввиведення сполуки bG-CSF, який становить інтерес.

[581] Гетерологічні гібридні білки за цим винаходом охоплюють білки, які мають консервативні амінокислотні заміни у сполучі bG-CSF та/або у Fc чи альбуміновій частині гібридного білка. "Консервативною заміною" є заміна амінокислоти іншою амінокислотою, яка має такий самий сумарний заряд електронів і приблизно такий самий розмір та форму. Амінокислоти з аліфатичними бічними ланцюгами або амінокислоти із заміненними аліфатичними бічними ланцюгами мають приблизно однаковий розмір, коли загальна кількість атомів вуглецю та гетероатомів у їхніх бічних ланцюгах відрізняється не більше ніж чотирма атомами. Вони мають приблизно однакову форму, коли різниця за кількістю відгалужень у їхніх бічних ланцюгах становить не більше одиниці. Вважається, що амінокислоти із фенільними або заміщеними фенільними групами у їхніх бічних ланцюгах мають приблизно однаковий розмір та форму. Якщо у цьому описі спеціально не оговорюється інше, консервативні заміни, за варіантом, якому віддається перевага, здійснюються із природними амінокислотами.

[582] Альбумінові та імуноглобулінові білки дикого типу можна одержати з цілого ряду джерел. Наприклад, ці білки можна одержати з бібліотеки кДНК, яку одержали з тканини або клітин, які експресують мРНК, яка становить інтерес, на виявлюваному рівні. Скринінг цих бібліотек можна здійснювати із застосуванням зондів, сконструйованих для конкретного білка, який становить інтерес, за допомогою опублікованої послідовності ДНК або білка. Наприклад, константні ділянки легких або важких ланцюгів імуноглобулінів описані 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; та Morrison, et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. До деяких посилань, які описують послідовності альбумінового білка та ДНК, належать 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; та Minghetti, et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747.

Визначення характеристик гетерологічних гібридних білків за цим винаходом

[583] Для визначення характеристик гібридних білків за цим винаходом існують численні методи. До деяких із цих методів належать, але без обмеження ними: SDS-PAGE у поєднанні з методами забарвлення білків або імуноблотингом із застосуванням анти-IgG або анти-HSA антитіл. До інших методів належать, наприклад, мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині із часопролітним аналізатором (MALDI-MS), рідинна хроматографія/мас-спектрометрія, ізоелектричне фокусування, аналітичний аніонообмін, хроматофокусування та круговий дихроїзм.

Посилення афінності до сироваткового альбуміну

[584] Різні молекули також можна гібридизувати з поліпептидами bG-CSF за цим винаходом для модулювання періоду напіввиведення поліпептидів bG-CSF із сироватки. В деяких варіантах здійснення цього винаходу молекули сполучають або гібридизують із поліпептидами bG-CSF за цим винаходом для посилення афінності до ендogenous сироваткового альбуміну у тварини.

[585] Наприклад, у деяких випадках одержують рекомбінантний гібрид поліпептиду bG-CSF та зв'язувальної послідовності альбуміну. До прикладів зв'язувальної послідовності альбуміну належать, але без обмеження ними, зв'язувальний домен альбуміну стрептококового білка G (дивись, наприклад, Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) та Sjolander et al., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)) або альбумін-зв'язувальні білки, такі як білки, описані у Dennis, et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002).

[586] У інших варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF за цим винаходом ацилюють жирними кислотами. У деяких варіантах здійснення цього винаходу жирні кислоти стимулюють зв'язування з сироватковим альбуміном. Дивись, наприклад, Kurtzhals, et al., *Biochem. J.* 312:725-731 (1995).

[587] У інших варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF за цим винаходом гібридизують безпосередньо із сироватковим альбуміном (у тому числі, але без обмеження, з людським сироватковим альбуміном). Фахівцям у цій галузі зрозуміло, що цілий ряд інших



молекул можна також сполучати з bG-CSF за цим винаходом для модулювання зв'язування із сироватковим альбуміном або іншими компонентами сироватки.

#### X. Глікозилювання поліпептидів bG-CSF

[588] Цей винахід охоплює поліпептиди bG-CSF, які містять одну або декілька штучно закодованих амінокислот, які несуть сахаридні залишки. Згадані сахаридні залишки можуть бути природними (у тому числі, але без обмеження, N-ацетилглюкозамін) або штучними (у тому числі, але без обмеження, 3-фторгалактоза). Сахариди можна сполучати із штучно закодованими амінокислотами за допомогою N- або O-сполученого глікозидного зв'язку (у тому числі, але без обмеження, N-ацетилгалактоза-L-серину) або штучного зв'язку (у тому числі, але без обмеження, оксиму або відповідного C- чи S-сполученого глікозиду).

[589] Сахаридні (у тому числі, але без обмеження, глікозил) складові можна додавати до поліпептиду *in vivo* або *in vitro*. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну штучно закодовану амінокислоту, модифікують сахаридом, дериватизованим амінооксигрупою з одержанням відповідного глікозилизованого поліпептиду, сполученого через оксимовий зв'язок. Після приєднання до штучно закодованої амінокислоти згаданий сахарид можна додатково обробляти глікозилтрансферазами та іншими ферментами з одержанням олігосахариду, приєднаного до bG-CSF. Дивись, наприклад. H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

[590] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну штучно закодовану амінокислоту, модифікують безпосередньо гліканом з визначеною структурою, який було одержано як амінооксипохідну. Фахівцю у цій галузі зрозуміло, що інші функціональні групи, у тому числі азид, алкін, гідразид, гідразин та семікарбазид, можна застосовувати для сполучення сахариду зі штучно закодованою амінокислотою.

[591] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF, який містить азид або алкінілвмісну штучно закодовану амінокислоту, можна у подальшому модифікувати шляхом, у тому числі, але без обмеження, реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена з, у тому числі, але без обмеження, алкінільними або азидними похідними, відповідно. Цей метод надає можливість модифікування білків із надзвичайно високою селективністю.

#### XI. Димери та мультимери bG-CSF

[592] Цей винахід пропонує також комбінації bG-CSF та аналогів bG-CSF, таких як гомодимери, гетеродимери, гомомультимери або гетеромультимери (тобто тримери, тетрамери тощо), де bG-CSF, який містить одну або декілька штучно закодованих амінокислот, зв'язується з іншим bG-CSF або варіантом bG-CSF чи будь-яким іншим поліпептидом, який не є bG-CSF або варіантом bG-CSF, чи то безпосередньо з поліпептидним каркасом, чи то за допомогою сполучного агента. Завдяки своїй підвищеній молекулярній масі у порівнянні з мономерами, кон'югати димеру або мультимеру bG-CSF можуть демонструвати нові або бажані властивості, у тому числі, але без обмеження, фармакологічні, фармакокінетичні, фармакодинамічні, модульований період напіввиведення терапевтично ефективної кількості або модульований період напіввиведення з плазми, у порівнянні з мономерним bG-CSF. В деяких варіантах здійснення цього винаходу димери bG-CSF за цим винаходом будуть модулювати трансдукцію сигналу рецептора bG-CSF. У інших варіантах здійснення цього винаходу димери або мультимери bG-CSF за цим винаходом будуть відігравати роль антагоніста, агоніста або модулятора рецептора.

[593] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одна або декілька молекул bG-CSF входять до складу bG-CSF-вмісного димеру або мультимеру, який містить штучно закодовану амінокислоту, сполучену з водорозчинним полімером.

[594] В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF сполучають безпосередньо, у тому числі, але без обмеження, через Asn-Lys амідний зв'язок або Cys-Cys дисульфідний зв'язок. В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептиди bG-CSF та/або сполучені молекули не-bG-CSF будуть містити інші штучно закодовані амінокислоти для полегшення димеризації, у тому числі, але без обмеження, алкін у одній штучно закодованій амінокислоті першого поліпептиду bG-CSF та азид у другій штучно закодованій амінокислоті другої молекули будуть кон'югуватись шляхом реакції [3+2]-циклоприєднання Хьюсена. Альтернативно bG-CSF та/або сполучена молекула не-bG-CSF, яка містить кетонвмісну штучно закодовану амінокислоту, можуть кон'югуватись з другим поліпептидом, який містить гідроксиламіновмісну штучно закодовану амінокислоту, і згадані поліпептиди реагують через утворення відповідного оксиму.

[595] Альтернативно два поліпептиди bG-CSF та/або сполучена молекула не-bG-CSF сполучають через сполучний агент. Будь-який гетеро- або гомобіфункціональний сполучний

агент можна застосовувати для сполучення двох молекул та/або сполучених молекул не-bG-CSF, які можуть мати однакову або різну первинну структуру. У деяких варіантах здійснення цього винаходу сполучним агентом, який застосовують для зв'язування bG-CSF та/або сполучених молекул не-bG-CSF, може бути біфункціональний PEG реактив. Сполучний агент

5 може бути представлений у широкому діапазоні молекулярних мас або молекулярних довжин. Сполучні агенти більшої або меншої молекулярної маси можна застосовувати для забезпечення необхідного просторового співвідношення або конформації між bG-CSF та сполученою складовою або між bG-CSF та його рецептором чи між сполученою складовою та її зв'язувальним партнером, якщо такий існує. Сполучні агенти більшої або меншої молекулярної

10 довжини також можна застосовувати для забезпечення необхідного проміжку або гнучкості між bG-CSF та сполученою складовою або між сполученою складовою та її зв'язувальним партнером, якщо такий існує.

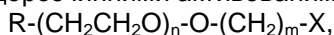
[596] В деяких варіантах здійснення цього винаходу цей винахід пропонує водорозчинні біфункціональні сполучні агенти, які мають "гантельну" структуру, яка включає а) азид, алкін, гідразин, гідразид, гідроксиламін або карбонільвмісну складову на принаймні першому кінці полімерного каркасу; та b) принаймні другу функціональну групу на другому кінці полімерного

15 каркасу. Друга функціональна група може бути такою самою або відрізнитись від першої функціональної групи. В деяких варіантах здійснення цього винаходу друга функціональна група не реагує з першою функціональною групою. В деяких варіантах здійснення цей винахід пропонує водорозчинні сполуки, які містять щонайменше одне відгалуження розгалуженої молекулярної структури. Наприклад, розгалужена молекулярна структура може бути дендритною.

20

[597] В деяких варіантах здійснення цього винаходу цей винахід пропонує мультимери, які містять один або декілька поліпептидів bG-CSF, які одержують шляхом реакцій з водорозчинними активованими полімерами, які мають структуру:

25



де n – від приблизно 5 до 3000, m – 2-10, X може бути азидною, алкіною, гідразиновою, гідразидною, амінооксигрупою, гідроксиламіном, ацетилом або карбонільвмісною складовою, і R – захисна група, функціональна група або відщеплювана група, яка може бути такою самою або відрізнитись від X. R може бути, наприклад, функціональною групою, вибраною з-посеред

30 груп, які складають гідроксил, захищений гідроксил, алкоксил, N-гідроксисукцинімідилловий складний ефір, 1-бензотриазоліловий складний ефір, N-гідроксисукцинімідилкарбонат, 1-бензотриазолілкарбонат, ацеталь, альдегід, гідрати альдегіду, алкеніл, акрилат, метакрилат, акриламід, активний сульфен, амін, амінооксил, захищений амін, гідразид, захищений гідразид,

35 захищений тіол, карбонова кислота, захищена карбонова кислота, ізоціанат, ізотіоціанат, малеїмід, вінілсульфон, дитіопіридин, вінілпіридин, йодоацетамід, епоксид, гліюксалі, діони, мезилати, тозилати та трезилати, алкен і кетон.

## XII. Визначення активності поліпептиду bG-CSF та спорідненості bG-CSF до рецептора

[598] Активність поліпептиду bG-CSF може бути визначена із застосуванням стандартних або відомих *in vitro* чи *in vivo* аналізів. Поліпептиди bG-CSF можуть бути аналізовані на біологічну активність прийнятними методами, відомими у цій галузі. До таких аналізів належать, але без обмеження ними, аналізи, описані у Hedari et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57, та аналізи, які визначають біологічні активності bG-CSF.

40

[599] Поліпептиди bG-CSF можна випробувати на їх здатність до активації CD11a, CD11b, CD11c та/або CD18 у нейтрофілів. Визначення цієї активності можна здійснювати за допомогою FACS (клітинний сортер із збудженням флуоресценції) як описано Hedari et al (*supra*). За допомогою додаткових аналізів, відомих фахівцям у цій галузі, визначають активацію нейтрофілів, у тому числі, але без обмеження, за допомогою аналізів із визначення L-селектину. Інші аналізи, які можуть бути здійснені, оцінюють проліферацію та/або диференціацію клітин

45

50 поліпептидами bG-CSF за цим винаходом.

[600] Поліпептиди bG-CSF можна аналізувати на здатність до зв'язування рецептора. Рецептор G-CSF можна одержати за методами та способами, відомими фахівцю у цій галузі. Рецептор hG-CSF можна одержати як описано у патенті США № 5,574,136, включеному до цього опису шляхом посилання. Наприклад, клітини або лінії клітин, які діють у відповідь на G-CSF або зв'язують G-CSF (у тому числі, але без обмеження, клітини, які містять активні рецептори G-CSF, такі як клітини, які продукують рекомбінантний рецептор G-CSF), можна застосовувати для моніторингу зв'язування рецептора bG-CSF. У разі неpegільованого або pegільованого поліпептиду bG-CSF, який містить штучну амінокислоту, спорідненість bG-CSF до свого рецептора або до іншого рецептора G-CSF можна визначати із застосуванням біосенсора

55

60 BIAcore™ (компанія Pharmacia). До прийнятних аналізів зв'язування належать, але без

обмеження ними, аналіз BIAcore (Pearce et al., Biochemistry 38:81-89 (1999)) та аналіз AlphaScreen™ (компанія PerkinElmer). AlphaScreen™ являє собою аналіз люмінесценції із застосуванням гранульованих нерадіоактивних міток, де донорні гранули-мітки збуджуються лазером при 680 нм із виділенням синглетного кисню. Синглетний кисень дифундує і реагує з похідною тіоксену на поверхні акцепторних гранул-міток із флуоресцентним випромінюванням при ~600 нм. Флуоресцентне випромінювання спостерігається лише тоді, коли донорні та акцепторні гранули опиняються у безпосередній близькості завдяки молекулярним взаємодіям, які відбуваються тоді, коли кожна зі згаданих гранул-міток є сполученою зі сполучним агентом та рецептором, відповідно. Конкуренцію цій взаємодії сполучного агента-рецептора можуть становити рецепторзв'язувальні варіанти, у той час як у разі застосування незв'язувальних варіантів конкуренція буде відсутньою.

[601] Активність поліпептидів bG-CSF може бути визначена із застосуванням стандартних або відомих *in vitro* чи *in vivo* аналізів. Наприклад, клітини або лінії клітин, які проліферують у присутності hG-CSF або зв'язують hG-CSF (у тому числі, але без обмеження, клітини, які містять активні рецептори G-CSF, такі як клітини мишачого кісткового мозку, WEHI-3B (D+), AML-193 (ATCC) або клітини, які продукують рекомбінантний рецептор G-CSF), можна застосовувати для моніторингу зв'язування рецептора bG-CSF. Дивись, наприклад, King et al., Exp. Hematol. 20:223 (1992); патент США № 6,385,505, включені до цього опису шляхом посилання. *In vivo* тваринні моделі, а також клінічні випробування на людях для визначення активності hG-CSF описані, наприклад, у патентах США № 6,166,183; № 6,565,841; № 6,162,426; № 5,718,893, включених до цього опису шляхом посилання. Такі моделі можна застосовувати для оцінювання активності bG-CSF.

[602] Незалежно від того, за допомогою яких методів одержують запропоновані аналоги bG-CSF, згадані аналоги піддають аналізам на біологічну активність. Для визначення ступеня поділу клітин можна проводити тритій-тимідиновий аналіз. Для визначення необхідної активності можна, однак, застосовувати інші біологічні аналізи. Біологічні аналізи, такі як аналіз здатності індуктування термінальної диференціації мишачих лейкозних клітин лінії WEHI-3B (D+), також надають свідчення щодо активності G-CSF. Дивись, Nicola, et al. Blood 54: 614-627 (1979). Інші *in vitro* аналізи можна застосовувати для встановлення біологічної активності. Дивись Nicola, Ann. Rev. Biochem. 58: 45-77 (1989). Взагалі, тест на біологічну активність повинен забезпечувати аналіз для одержання необхідного результату, такого як підвищення або зниження біологічної активності (у порівнянні з незмінним G-CSF), інша біологічна активність (у порівнянні з незмінним G-CSF), аналіз спорідненості до рецептора або партнера зв'язування, конформаційних або структурних змін самого bG-CSF або його рецептора (у порівнянні з модифікованим bG-CSF) або аналіз періоду напіввиведення з плазми.

[603] Раніше повідомлялось, що клітини WEHI-3BD<sup>+</sup> та людські лейкозні клітини з новодіагностованих випадків лейкозу будуть зв'язувати <sup>125</sup>I-мічений мишачий G-CSF, і що конкуренцію цьому зв'язуванню може становити додання неміченого G-CSF або людського CSF-β. Перевіряється здатність природного G-CSF та bG-CSF конкурувати з <sup>125</sup>I-G-CSF за зв'язування з людськими та мишачими лейкозними клітинами. Природний G-CSF високого ступеню чистоти (>95 %; 1 мкг) мітять йодом [Tejedor, et al., Anal. Biochem., 127, 143 (1982)] і відокремлюють від реагентів шляхом гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії. Питома активність природного <sup>125</sup>I-G-CSF становить приблизно 100 мкКюрі/мкг білка.

[604] Вищенаведені списки посилань на аналітичні методи не є вичерпними, і фахівцям у цій галузі відомі інші аналізи, прийнятні для проведення випробувань для одержання необхідного кінцевого результату. Молифікації таких аналізів є відомими фахівцям у цій галузі.

XIII. Визначення ефективності, функціонального *in vivo* періоду напіввиведення та фармакокінетичних параметрів

[605] Важливим аспектом цього винаходу є подовжений біологічний час половини строку життя *in vivo*, що забезпечується шляхом конструювання поліпептиду b-GCSF з кон'югуванням поліпептиду з водорозчинною полімерною складовою або без нього. Швидке зниження концентрації поліпептиду bG-CSF у сироватці після введення надало важливості оцінюванню біологічних реакцій на обробку кон'югованим та некон'югованим поліпептидом bG-CSF та його варіантами. Кон'югований та некон'югований поліпептид bG-CSF та його варіанти за цим винаходом можуть мати подовжений період напіввиведення із сироватки після введення, наприклад, підшкірним або внутрішньовенним шляхом, що надає можливість його визначення, наприклад, за допомогою ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз) або за допомогою первинного відбіркового аналізу. З цією метою можна застосовувати набори ELISA або RIA (радіоімунологічний аналіз) з комерційних джерел. Інший приклад аналізу для визначення *in vivo* періоду напіввиведення hG-CSF або його варіантів описаний у патенті США № 5,824,778,

включеному до цього опису шляхом посилання. Визначення біологічного часу половини строку життя *in vivo* здійснюють за описом, наведеним у цій заявці.

[606] Ефективність та функціональний *in vivo* період напіввиведення поліпептиду hG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, можна визначати за методикою, опис якої наведений у патентах США № 6,646,110; № 6,555,660; № 6,166,183; № 5,985,265; № 5,824,778; № 5,773,581, включених до цього опису шляхом посилання. Згадані методики можна застосовувати також для bG-CSF.

[607] Фармакокінетичні параметри поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, можна визначати на нормальних пацюках-самцях лінії Sprague-Dawley (N=5 тварин на досліджувану групу). Тваринам вводять bG-CSF однією дозою 25 мкг на пацюка (внутрішньовенно) або 50 мкг/пацюка (підшкірно), і приблизно 5-7 зразків крові відбирають за попередньо визначеним графіком, який, як правило, охоплює приблизно 6 год. у разі поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту і не є кон'югованим із водорозчинним полімером, та приблизно 4 дні у разі поліпептиду bG-CSF, який містить природну амінокислоту і є кон'югованим із водорозчинним полімером. Фармакокінетичні дані для bG-CSF без штучно закодованої амінокислоти можна порівнювати безпосередньо з даними, які були одержані для поліпептидів bG-CSF, які містять штучно закодовану амінокислоту.

[608] Фармакокінетичні дослідження поліпептидів bG-CSF можна проводити на мишах, пацюках або на приматах, наприклад, макаках-крабощах. Як правило, одну ін'єкцію здійснюють підшкірним або внутрішньовенним шляхом, і рівні bG-CSF у сироватці відслідковують у перебігу часу.

[609] В патенті США № 5,849,883 та заявці WO 89/10932, включених до цього опису шляхом посилання, описані декілька тваринних моделей, які можна застосовувати для оцінювання поліпептидів bG-CSF за цим винаходом. Дослідження можна проводити на великій рогатій худобі з контрольним зараженням *Pasteurella hemolytica*, на великій рогатій худобі з бактеріальним зараженням молочних залоз/контрольним зараженням маститом (*Klebsiella pneumoniae*). При проведенні інших досліджень можна оцінювати заходи боротьби, кількість випадків захворювань, тривалість респіраторних захворювань великої рогатої худоби або запобігання коліформного маститу. Способи оцінювання стану здоров'я тварин, молочної продуктивності, кількості нейтрофілів та інших параметрів є відомими фахівцю у цій галузі. До інших моделей, які можна застосовувати для оцінювання поліпептидів bG-CSF за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, тваринні моделі інфекції або контакту з інфекцією, такі як хом'якова модель пневмонії (*Pseudomonas aeruginosa*), пацюча модель пієлонефриту (*Candida albicans*), моделі, які включають новонароджених лошат, та моделі, які включають поросят на дорощуванні. Деякі із цих моделей описані у патенті США № 5,849,883 та у WO 89/10932. Моделі, подібні до згаданих, є відомими фахівцям у цій галузі.

[610] Додаткові приклади аналізів для визначення *in vivo* біологічної активності hG-CSF або його варіантів описані у патентах США № 5,681,720; № 5,795,968; № 5,824,778; № 5,985,265 та у Bowen et al., *Experimental Hematology* 27:425-432 (1999), кожен з яких включений до цього опису шляхом посилання.

#### XIV. Введення та фармацевтичні композиції

[611] Поліпептиди або білки за цим винаходом (у тому числі, але без обмеження, bG-CSF, синтетази, білки, які містять одну або декілька штучних амінокислот) факультативно застосовують для терапевтичних цілей, у тому числі, але без обмеження, у комбінації з прийнятним фармацевтичним носієм. Такі композиції, наприклад, містять терапевтично ефективну кількість сполуки та фармацевтично прийнятний носій або допоміжну речовину. До таких носіїв або допоміжних речовин належать, але без обмеження ними, фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, декстроза, вода, гліцерин, етанол та/або їх комбінації. Лікарську форму одержують таким чином, щоб вона відповідала способу введення. Взагалі, способи введення білків є відомими фахівцям у цій галузі і можуть застосовуватись для введення поліпептидів за цим винаходом. Композиції можна надавати водорозчинну форму, вона може бути запропонована у формі фармацевтично прийнятних солей, що означає, що така форма включає як солі, одержані доданням кислоти, так і солі, одержані доданням основи. У патенті США № 6,497,869, включеному до цього опису шляхом посилання, обговорені лікарські форми та введення поліпептидів bG-CSF, у тому числі, але без обмеження, hG-CSF та bG-CSF. Раніше були обговорені солі, які містять іони сульфатів, такі як сульфат амонію, сульфат натрію, сульфат магнію та їх суміші, а також буферні агенти, такі як ацетат, цитрат, фосфат, гепес-буфер, BES, TAPS, EPPS, TES та їх суміші.

[612] Терапевтичні композиції, які містять один або декілька поліпептидів за цим винаходом, факультативно перевіряють на одній або декількох прийнятних *in vitro* та/або *in vivo* тваринних

моделях захворювання для підтвердження ефективності, тканинного метаболізму та для визначення дозування, за методами, відомими фахівцям у цій галузі. Зокрема, дозування можна початково визначати за активністю, стабільністю та іншими прийнятними параметрами від гомологів штучних амінокислот за цим винаходом до гомологів природних амінокислот (у тому числі, але без обмеження, шляхом порівняння поліпептиду bG-CSF, модифікованого з включенням однієї або декількох штучних амінокислот, з поліпептидом bG-CSF, який містить природні амінокислоти, та порівнянням поліпептиду bG-CSF, модифікованого з включенням однієї або декількох штучних амінокислот, з доступним застосовуванням на цей час лікуванням bG-CSF), тобто шляхом відповідного аналізу.

[613] Введення здійснюють будь-якими шляхами, які, як правило, застосовують для введення молекули для кінцевого контактування з клітинами крові або тканини. Поліпептиди за цим винаходом, які містять штучні амінокислоти, вводять будь-яким прийнятним чином, факультативно з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями. Прийнятні способи введення таких поліпептидів у контексті цього винаходу в організм пацієнта є доступними, і, незважаючи на можливість застосування для введення конкретної композиції більше ніж одного шляху, один зі шляхів часто може забезпечити більш негайну та більш ефективну дію або реакцію, ніж інший шлях.

[614] Фармацевтично прийнятні носії визначаються, певною мірою, конкретною композицією, призначеною для введення, а також конкретним способом, який застосовується для введення композиції. Відповідно, існують різноманітні прийнятні лікарські форми фармацевтичних композицій за цим винаходом.

[615] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна вводити будь-яким традиційним шляхом, прийнятним для білків або пептидів, у тому числі, але без обмеження, парентеральним, наприклад, шляхом ін'єкцій, у тому числі, але без обмеження, підшкірних або внутрішньовенних, або шляхом ін'єкцій чи вливань іншого виду. Композиції на основі поліпептидів можна вводити цілим рядом шляхів, у тому числі, але без обмеження, пероральним, внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, внутрішньом'язовим, черезшкірним, підшкірним, місцевим, сублінгвальним, інтраваскулярним, інтрамамарним або ректальним. Композиції, які містять поліпептиди із штучними амінокислотами, модифіковані або немодифіковані, можна також вводити за допомогою ліпосом. Такі шляхи введення та відповідні лікарські форми, взагалі, є відомими фахівцям у цій галузі. Поліпептид bG-CSF можна застосовувати окремо або у комбінації з іншими прийнятними компонентами, такими як фармацевтичний носій. Поліпептид bG-CSF можна застосовувати у комбінації з іншими агентами або терапевтичними засобами.

[616] Поліпептид bG-CSF, який містить штучну амінокислоту, окремо або у комбінації з іншими прийнятними компонентами, можна також застосовувати у лікарській формі у вигляді аерозолу (тобто поліпептиди можна "розпилювати") або вводити інгаляційним шляхом. Лікарські форми у вигляді аерозолу можна змішувати з прийнятними пропелентами під високим тиском, такими як дихлордифторметан, пропан, азот тощо.

[617] До лікарських форм, прийнятних для парентерального введення, такого як, наприклад, внутрішньосуглобове, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньошкірне, внутрішньоочеревинне або підшкірне, належать водні або неводні ізотонічні стерильні розчини для ін'єкції, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики та розчинені речовини, які забезпечують ізотонічність лікарської форми з кров'ю гаданого реципієнта, та водні і неводні стерильні суспензії, які можуть містити суспендувальні речовини, солюбілізатори, загущувальні речовини, стабілізатор та консерванти. Лікарські форми bG-CSF можуть бути надані у вигляді одноступових та багаторазових герметично закритих контейнерів, таких як ампули та флакони.

[618] Парентеральне введення та внутрішньовенне введення є способами введення, яким віддається перевага. Зокрема, шляхи введення, які вже застосовуються для лікарських речовин-гомолгів природних амінокислот (у тому числі, але без обмеження, шляхи, які, як правило, застосовують для EPO (еритропоетин), GH (гормон росту), G-CSF, GM-CSF (гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулювальний фактор), IFN (інтерферони), інтерлейкінів, антитіл, FGF (фактори росту фібробластів) та/або будь-яких інших фармацевтичних білків), разом із лікарськими формами, які застосовують на сучасному етапі, являють собою шляхи введення, яким віддається перевага, та лікарську форму для поліпептидів за цим винаходом, якій віддається перевага.

[619] Доза, яку вводять тварині, у контексті цього винаходу, є достатньою, щоб викликати сприятливу терапевтичну реакцію у тварини з перебігом часу, або іншу відповідну активність, у залежності від застосування. Згадана доза визначається ефективністю конкретного вектора або лікарської форми, та активністю, стабільністю або періодом напіввиведення з плазми

застосовуваного поліпептиду, який містить штучну амінокислоту, та станом тварини, а також масою тіла або площею поверхні тварини, яку піддають лікуванню. Величина дози визначається також існуванням, природою та інтенсивністю будь-яких побічних ефектів, які супроводжують введення конкретного вектора, лікарської форми тощо конкретній тварині.

5 [620] При визначенні ефективної кількості вектора або лікарської форми для введення у разі лікування або профілактики захворювання, ветеринарний лікар визначає рівні вектора або лікарської форми, яка циркулює у плазмі, токсичність лікарської форми, розвиток захворювання та/або, у разі необхідності, продукування антитіл проти поліпептиду, який містить штучні амінокислоти.

10 [621] Доза, яку вводять, як правило, знаходиться у межах еквівалентних доз терапевтичних білків, які застосовують на сучасному етапі, з поправкою на змінену активність або період напіввиведення з плазми відповідної композиції. Вектори або фармацевтичні лікарські форми за цим винаходом можуть доповнювати умови лікування за будь-яким відомим традиційним способом лікування, у тому числі введення антитіл, введення вакцин, введення цитотоксичних агентів, поліпептидів, які містять природні амінокислоти, нуклеїнові кислоти, аналоги нуклеотидів, модифікатори біологічних реакцій тощо.

15 [622] У разі введення, лікарські форми за цим винаходом вводять з інтенсивністю, яка визначається  $LD_{50}$  або  $ED_{50}$  відповідної лікарської форми, та/або спостереженням будь-яких побічних ефектів поліпептидів, які містять штучні амінокислоти, у різних концентраціях, у тому числі, але без обмеження, з урахуванням маси та загального стану здоров'я тварини. Введення можна здійснювати однією або поділеними дозами.

20 [623] Якщо у тварини, якій впливають лікарську форму, розвивається лихоманка, озноб або виникають м'язові болі, такій тварині може бути введена відповідна доза аспірину, ібупрофену, ацетамінофену або іншого болетамувального/протилихоманкового лікарського засобу, прийнятного для тварин. Тваринам, у яких на вливання виникають реакції, такі як лихоманка, м'язові болі та озноб, проводять премедикацію за 30 хв до майбутніх вливань аспірином, ацетамінофеном або, у тому числі, але без обмеження, дифенгідраміном чи іншим лікарським засобом, прийнятним для тварин. Меперідин можна застосовувати у разі більш тяжкого ознобу або м'язових болів, які повільно реагують на антипіретики та антигістамінні препарати.

30 [624] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна вводити тварині безпосереднім шляхом. Введення здійснюють будь-яким із шляхів, які, як правило, застосовують для введення суб'єкту поліпептиду bG-CSF. До композицій на основі поліпептиду bG-CSF за варіантами здійснення цього винаходу належать композиції, прийнятні для перорального, ректального, місцевого, інгалаційного (у тому числі, але без обмеження, за допомогою аерозолі), трансбукального (у тому числі, але без обмеження, сублінгвального), вагінального, парентерального (у тому числі, але без обмеження, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, внутрішньосуглобового, внутрішньоплеврального, внутрішньоочеревинного, внутрішньомозкового, внутрішньоартеріального або

40 внутрішньовенного), місцевого (тобто поверхня шкіри та слизових оболонок, у тому числі поверхня дихальних шляхів), долегеневого, інтраокулярного, інтраназального та черезшкірного введення, хоча найприйнятніший шлях у будь-якому даному випадку буде залежати від природи та тяжкості стану, який піддають лікуванню. Введення може бути місцевим або системним. Лікарські форми сполук можна надавати у вигляді однодозових або багатовдозових герметично закритих контейнерів, таких як ампули та флакони. Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна надавати як суміш у вигляді дозованої лікарської форми для ін'єкцій (у тому числі, але без обмеження, розчину, суспензії або емульсії) із фармацевтично прийнятним носієм. Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна вводити шляхом безперервного вливання (із застосуванням, у тому числі, але без обмеження, мінінасосів, таких як осмотичні насоси),

50 разовою ударною дозою або у вигляді лікарських форм пролонгованої дії.

[625] До лікарських форм, прийнятних для введення, належать водні та неводні розчини, ізотонічні стерильні розчини, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики та розчинені речовини, які забезпечують ізотонічність лікарської форми, та водні і неводні стерильні суспензії, які можуть містити суспендувальні агенти, солубілізатори, загущувальні агенти, стабілізатори та консерванти. Розчини і суспензії можна одержати зі стерильних порошків, гранул та таблеток того виду, який було описано раніше.

60 [626] Ліофілізація являє собою традиційно застосовуваний метод для зберігання білків, призначений для видалення води з білкового препарату, який становить інтерес. Ліофілізація, або сушіння виморожуванням, являє собою процес, за допомогою якого матеріал, призначений для висушування, спочатку заморожують, після чого лід або заморожений розчинник

видаляють шляхом сублімації у вакуумному середовищі. До складу лікарських форм перед ліофілізацією можна вводити допоміжну речовину, яка підвищує стабільність під час процесу ліофілізації та/або поліпшує стабільність ліофілізованого продукту при зберіганні. Píkal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) та Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991).

[627] Фахівцям у цій галузі також є відомим розпилювальне сушіння фармацевтичних препаратів. Дивись, наприклад, Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," у Drug Dev. Ind. Pharm., 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Окрім дрібномолекулярних фармацевтичних препаратів, розпилювальному сушінню піддавали різноманітні біологічні матеріали, у тому числі: ферменти, сироватки, плазму, мікроорганізми і дріжджі. Розпилювальне сушіння є корисним методом, оскільки за його допомогою одностадійним процесом можна перетворити рідкий фармацевтичний препарат на тонкоподрібнений, знепилений або агломерований порошок. Основний спосіб складається з таких чотирьох стадій: а) розпилення вихідного розчину у вигляді аерозолі; б) введення аерозолі в контакт з повітрям; с) висушування аерозолі; та d) відділення висушеного продукту від повітря, яке застосовували для сушіння. Патенти США № 6,235,710 та № 6,001,800, включені до цього опису шляхом посилання, описують одержання рекомбінантного еритропоєтину шляхом розпилювального сушіння.

[628] Фармацевтичні композиції та лікарські форми за цим винаходом можуть містити фармацевтично прийнятний носій, допоміжну речовину або стабілізатор. Фармацевтично прийнятні носії визначаються, певною мірою, конкретною композицією, призначеною для введення, а також конкретним способом, який застосовують для введення композиції. Відповідно, існують найрізноманітніші прийнятні лікарські форми фармацевтичних композицій (у тому числі факультативні фармацевтично прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори) за цим винаходом (дивись, наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed. 1985)).

[629] До прийнятних носіїв належать, але без обмеження ними, буферні суміші, які містять сукцинат, фосфат, борат, гепес-буфер, цитрат, гістидин, імідазол, ацетат, бікарбонат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, у тому числі, але без обмеження, аскорбінова кислота; низькомолекулярні поліпептиди, у тому числі, але без обмеження, поліпептиди, які містять менше ніж приблизно 10 залишків; білки, у тому числі, але без обмеження, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, у тому числі, але без обмеження, полівінілпіролідон; амінокислоти, у тому числі, але без обмеження, гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін, гістидин або похідні гістидину, метіонін, глутамат або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, у тому числі, але без обмеження, трегалоза, цукроза, глюкоза, маноза або декстрини; хелатоутворювачі, у тому числі, але без обмеження, EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) та едетат динатрію; іони двовалентних металів, у тому числі, але без обмеження, цинку, кобальту або міді; цукрові спирти, у тому числі, але без обмеження, маніт або сорбіт; солетвірні протиіони, у тому числі, але без обмеження, натрій та хлорид натрію; наповнювачі, такі як мікрокристалічна целюлоза, лактоза, кукурудзяний та інші крохмалі; зв'язувальні агенти; підсолоджувачі та інші речовини для поліпшення смаку та запаху; барвні речовини; та/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, у тому числі, але без обмеження, Tween<sup>™</sup> (у тому числі, але без обмеження, твін 80 (полісорбат 80) та твін 20 (полісорбат 20)), Pluronic<sup>™</sup> та інші плуронової кислоти, у тому числі, але без обмеження, плуронова кислота F68 (полоксамер 188) або PEG. До прийнятних поверхнево-активних речовин належать, наприклад, але без обмеження ними, поліефіри на основі полі(етиленоксиду)-полі(пропіленоксиду)-полі(етиленоксиду), тобто (PEO-PPO-PEO), або полі(пропіленоксиду)-полі(етиленоксиду)-полі(пропіленоксиду), тобто (PPO-PEO-PPO), або їх комбінації. PEO-PPO-PEO та PPO-PEO-PPO є комерційно доступними під торговими назвами Pluronic<sup>™</sup>, R-Pluronic<sup>™</sup>, Tetronics<sup>™</sup> та R-Tetronics<sup>™</sup> (компанія BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, штат Мічиган) і описані у патенті США № 4,820,352, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання. Інші блокспівполімери етилену/поліпропілену можуть бути прийнятними поверхнево-активними речовинами. Для стабілізації пегільованого bG-CSF проти одного або декількох стресів, у тому числі, але без обмеження, стресу, який є наслідком перемішування, можна застосовувати поверхнево-активну речовину або комбінацію поверхнево-активних речовин. Деякі з вищезгаданих речовин можуть бути віднесені до категорії "наповнювачів". Деякі також можуть бути віднесені до категорії "модифікаторів ізотонічності". Протимікробні консерванти також можна застосовувати для забезпечення стабільності продукту та протимікробної ефективності; до прийнятних консервантів належать, але без обмеження ними, бензиловий спирт, бензалоконію хлорид, метакрезол, метил/пропілпарабен, крезол, фенол або їх комбінацію. Патент США № 7,144,574, включений до цього опису шляхом

посилання, описує інші матеріали, які можуть бути прийнятними для фармацевтичних композицій та лікарських форм за цим винаходом або для інших препаратів для введення.

[630] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом, у тому числі ті з них, які є сполученими з водорозчинними полімерами, такими як PEG, можна також вводити за допомогою або як складову частину систем пролонгованої дії. Композиції пролонгованої дії містять, у тому числі, але без обмеження, напівпроникні полімерні матриці у формі профільованих виробів, у тому числі, але без обмеження, плівки або мікрокапсули. До матриць пролонгованої дії належать матриці, виготовлені з біосумісних матеріалів, таких як полі-2-гідроксіетилметакрилат (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 267-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), етиленвінілацетат (Langer et al., supra) або полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота (EP 133,988), полілактиди (полімер молочної кислоти) (патент США № 3,773,919; EP 58,481), полігліколід (полімер гліколевої кислоти), поліангіриди полілактиду когліколіду (співполімер молочної та гліколевої кислот), співполімери L-глутамової кислоти та гама-етил-L-глутамату (Sidman et al., Biopolymers, 22, 547-556 (1983), складні полі(орто)ефіри, поліпептиди, гіалуронова кислота, колаген, сульфат хондроїтину, карбонові кислоти, жирні кислоти, фосфоліпіди, полісахариди, нуклеїнові кислоти, поліамінокислоти, амінокислоти, такі як фенілаланін, тирозин, ізолейцин, полінуклеотиди, полівінілпропілен, полівінілпіролідон та силікон. Композиції пролонгованої дії також містять сполуку, замкнену до ліпосом. Ліпосоми, які містять цю сполуку, одержують методами, відомими per se: DE 3,218,121; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; патент США № 4,619,794; EP 143,949; патент США № 5,021,234; заявка на патент Японії 83-118008; патенти США № 4,485,045 та № 4,544,545; та EP 102,324. Усі згадані посилання та патенти включені до цього опису шляхом посилання.

[631] Поліпептиди bG-CSF, вміщені у ліпосоми, можна одержати за допомогою методів, описаних, наприклад, у DE 3,218,121; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; патенті США № 4,619,794; EP 143,949; патенті США № 5,021,234; заявці на патент Японії 83-118008; патентах США № 4,485,045 та № 4,544,545; та EP 102,324. Композиції та розмір ліпосом є добре відомими або можуть бути легко визначені емпіричним шляхом фахівцем у цій галузі. Деякі приклади ліпосом описані, наприклад, у Park J.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331 (1995); Lasic D. and Papahadjopoulos D. (eds): Medical Applications of Liposomes (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). Усі згадані посилання та патенти включені до цього опису шляхом посилання. Цілий ряд лікарський форм bG-CSF був описаний, і вони є відомими фахівцям у цій галузі.

[632] Доза, введена тварині у контексті цього винаходу, повинна бути достатньою для того, щоб викликати благотворну реакцію у суб'єкта з перебігом часу. Взагалі, повна фармацевтично ефективна кількість поліпептиду bG-CSF за цим винаходом на дозу, яку вводять парентеральним шляхом, знаходиться у межах від приблизно 0,01 мкг/кг на добу до приблизно 100 мкг/кг на добу або від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 1 мг/кг маси тіла тварини, хоча це визначається на розсуд лікаря. Частота введення дози також визначається на розсуд лікаря, і дозу можна вводити частіше або рідше, ніж комерційно доступні продукти, які містять поліпептиди bG-CSF, схвалені для застосування на тваринах. Взагалі, пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом можна вводити будь-яким із шляхів для введення, опис яких наведено вище.

#### XV. Варіанти терапевтичного застосування поліпептидів bG-CSF за цим винаходом

[633] Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом є прийнятними для лікування цілого ряду розладів. Результатом введення продуктів hG-CSF є утворення лейкоцитів у людей. Так, введення поліпептидів bG-CSF за цим винаходом може бути корисним для запобігання інфекції у тварин, яким загрожує інфекція. Поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна вводити тваринам, які мають інфекцію. До інфекцій, які можна лікувати поліпептидами bG-CSF за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, мастит та транспортна лихоманка. За одним із варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від двох тижнів до одного дня перед отеленням. За одним із варіантів здійснення цього винаходу, пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від двох тижнів до одного дня перед отеленням і додатково вводять у день отелення або впродовж періоду часу тривалістю до одного тижня після отелення. За одним із варіантів здійснення цього винаходу, поліпептид bG-



CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від двох тижнів до одного дня перед отеленням. За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від двох тижнів до одного дня перед отеленням і додатково вводять у день отелення або впродовж періоду часу тривалістю до одного тижня після отелення. За одним із варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед отеленням. За одним із варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед отеленням і додатково вводять у день отелення або впродовж періоду часу тривалістю до одного тижня після отелення. За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед отеленням. За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед отеленням і додатково вводять у день отелення або впродовж періоду часу тривалістю до одного тижня після отелення.

[634] За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю два тижні перед та у день транспортування. За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед транспортуванням. За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять тварині у проміжок часу тривалістю від одного тижня до одного дня перед транспортуванням і додатково вводять у день транспортування або впродовж періоду часу тривалістю до одного тижня після транспортування.

[illegible]

5	0,04 мкг/кг; 0,05 мкг/кг; 0,06 мкг/кг; 0,07 мкг/кг; 0,08 мкг/кг; 0,09 мкг/кг; 0,10 мкг/кг; 0,11 мкг/кг; 0,12 мкг/кг; 0,13 мкг/кг; 0,14 мкг/кг; 0,15 мкг/кг; 0,16 мкг/кг; 0,17 мкг/кг; 0,18 мкг/кг; 0,19 мкг/кг; 0,20 мкг/кг; 0,21 мкг/кг; 0,22 мкг/кг; 0,23 мкг/кг; 0,24 мкг/кг; 0,25 мкг/кг; 0,26 мкг/кг; 0,27 мкг/кг; 0,28 мкг/кг; 0,29 мкг/кг; 0,30 мкг/кг; 0,31 мкг/кг; 0,32 мкг/кг; 0,33 мкг/кг; 0,34 мкг/кг; 0,35 мкг/кг; 0,36 мкг/кг; 0,37 мкг/кг; 0,38 мкг/кг; 0,39 мкг/кг; 0,40 мкг/кг; 0,41 мкг/кг; 0,42 мкг/кг; 0,43 мкг/кг; 0,44 мкг/кг; 0,45 мкг/кг; 0,46 мкг/кг; 0,47 мкг/кг; 0,48 мкг/кг; 0,49 мкг/кг або 0,50 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом є пегільованим, і його вводять у дозі 0,01 мкг/кг; 0,02 мкг/кг; 0,03 мкг/кг; 0,04 мкг/кг; 0,05 мкг/кг; 0,06 мкг/кг; 0,07 мкг/кг; 0,08 мкг/кг; 0,09 мкг/кг; 0,10 мкг/кг; 0,11 мкг/кг; 0,12 мкг/кг; 0,13 мкг/кг; 0,14 мкг/кг; 0,15 мкг/кг; 0,16 мкг/кг; 0,17 мкг/кг; 0,18 мкг/кг; 0,19 мкг/кг; 0,20 мкг/кг; 0,21 мкг/кг; 0,22 мкг/кг; 0,23 мкг/кг; 0,24 мкг/кг; 0,25 мкг/кг; 0,26 мкг/кг; 0,27 мкг/кг; 0,28 мкг/кг; 0,29 мкг/кг; 0,30 мкг/кг; 0,31 мкг/кг; 0,32 мкг/кг; 0,33 мкг/кг; 0,34 мкг/кг; 0,35 мкг/кг; 0,36 мкг/кг; 0,37 мкг/кг; 0,38 мкг/кг; 0,39 мкг/кг; 0,40 мкг/кг; 0,41 мкг/кг; 0,42 мкг/кг; 0,43 мкг/кг; 0,44 мкг/кг; 0,45 мкг/кг; 0,46 мкг/кг; 0,47 мкг/кг; 0,48 мкг/кг; 0,49 мкг/кг або 0,50 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 0,01 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 0,01 мкг/кг.
---	--

[illegible]

[637] У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 8 мкг/кг, 9 мкг/кг, 10 мкг/кг, 11 мкг/кг, 12 мкг/кг, 13 мкг/кг, 14 мкг/кг, 15 мкг/кг, 16 мкг/кг, 17 мкг/кг, 18 мкг/кг, 19 мкг/кг, 20 мкг/кг, 21 мкг/кг, 22 мкг/кг, 23 мкг/кг, 24 мкг/кг, 25 мкг/кг, 26 мкг/кг, 27 мкг/кг, 28 мкг/кг, 29 мкг/кг, 30 мкг/кг, 31 мкг/кг, 32 мкг/кг, 33 мкг/кг, 34 мкг/кг, 35 мкг/кг, 36 мкг/кг, 37 мкг/кг, 38 мкг/кг, 39 мкг/кг, 40 мкг/кг, 41 мкг/кг, 42 мкг/кг, 43 мкг/кг, 44 мкг/кг, 45 мкг/кг, 46 мкг/кг, 47 мкг/кг, 48 мкг/кг, 49 мкг/кг, 50 мкг/кг, 51 мкг/кг, 52 мкг/кг, 53 мкг/кг, 54 мкг/кг, 55 мкг/кг, 56 мкг/кг, 57 мкг/кг, 58 мкг/кг, 59 мкг/кг, 60 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 1 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 6 мкг/кг, 7 мкг/кг, 8 мкг/кг, 9 мкг/кг, 10 мкг/кг, 11 мкг/кг, 12 мкг/кг, 13 мкг/кг, 14 мкг/кг, 15 мкг/кг, 16 мкг/кг, 17 мкг/кг, 18 мкг/кг, 19 мкг/кг, 20 мкг/кг, 21 мкг/кг, 22 мкг/кг, 23 мкг/кг, 24 мкг/кг, 25 мкг/кг, 26 мкг/кг, 27 мкг/кг, 28 мкг/кг, 29 мкг/кг, 30 мкг/кг, 31 мкг/кг, 32 мкг/кг, 33 мкг/кг, 34 мкг/кг, 35 мкг/кг, 36 мкг/кг, 37 мкг/кг, 38 мкг/кг, 39 мкг/кг, 40 мкг/кг, 41 мкг/кг, 42 мкг/кг, 43 мкг/кг, 44 мкг/кг, 45 мкг/кг, 46 мкг/кг, 47 мкг/кг, 48 мкг/кг, 49 мкг/кг.

50 мкг/кг, 51 мкг/кг, 52 мкг/кг, 53 мкг/кг, 54 мкг/кг, 55 мкг/кг, 56 мкг/кг, 57 мкг/кг, 58 мкг/кг, 59 мкг/кг, 60 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 10 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 10 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 20 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 20 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 30 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 30 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 40 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 40 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 50 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі 50 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі більшій за 0,5 мкг/кг. У одному з варіантів здійснення цього винаходу пегільований поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять у дозі більшій за 0,5 мкг/кг.

[638] Фармацевтичні композиції, які містять bG-CSF, можна виготовляти з активністю, ефективною для введення різними засобами тварині, яка страждає на розлади, які характеризуються низьким або недостатнім продукуванням лейкоцитів, самостійно або як складової частини стану або захворювання. Середня кількість bG-CSF може варіюватись і, зокрема, повинна базуватись на рекомендаціях та рецепті кваліфікованого ветеринарного лікаря. Точна кількість bG-CSF є суб'єктивним показником і залежить від таких факторів, як точний тип стану, який піддають лікуванню, стан тварини, яку піддають лікуванню, а також інші інгредієнти композиції. Цей винахід також пропонує введення терапевтично ефективної кількості іншого активного агента. Таку кількість для введення може легко визначати фахівець фахівець у цій галузі, виходячи з лікування із застосуванням bG-CSF. Таким чином, bG-CSF за цим винаходом можна застосовувати для стимуляції продукування лейкоцитів та коригування знижених рівнів еритроцитів. Найчастіше рівні лейкоцитів є зниженими в результаті раку, інфекції або хіміотерапії. Також можна лікувати стани, які можуть призвести до нейтропенії здорову за всіма іншими ознаками тварину, наприклад, передуюче лікування протипухлинними агентами. Взагалі, будь-який стан, який лікується hG-CSF, може також лікуватись bG-CSF та/або кон'югатами PEG:bG-CSF за цим винаходом. Цей винахід також пропонує введення терапевтично ефективної кількості іншого активного агента, такого як протираковий хіміотерапевтичний агент. Згадану кількість для введення може легко визначити фахівець у цій галузі, виходячи з лікування із застосуванням bG-CSF.

[639] Фармацевтичні композиції за цим винаходом можна виготовляти традиційним способом.

## ПРИКЛАДИ

[640] Наведені нижче приклади призначені для ілюстрації, а не для обмеження заявленого винаходу.

### Приклад 1

### Вибір ділянки для введення штучно закодованих амінокислот до bG-CSF

[641] Цей приклад описує деякі з багатьох потенційних наборів критеріїв для вибору ділянок введення штучно закодованих амінокислот до bG-CSF.

[642] Теоретичну модель GCSF розробили із застосуванням кристалічної структури людського GCSF, зв'язаного з рецепторами (розпізнавальний номер PDB 2D9Q). Координати структури цього людського GCSF є доступними з Protein Data Bank (PDB) (Bernstein et al. J. Mol. Biol. 1997, 112, pp. 535). До потенційних залишків для заміни належать, але без обмеження ними, сайти консервативних заміни та залишки з найбільшою доступністю для розчинників із застосуванням програми Cx (Pintar et al. (2002) Bioinformatics, 18(7):980-984). До сайтів консервативних заміни, ідентифікованих для заміни пара-ацетилфенілаланіном, належать, але без обмеження ними, залишки тирозину, фенілаланіну та аргініну, які містять гідрофобне "ядро" з або без заряду. Залишки, які можуть бути структурно важливими, для заміни не вибирали, у тому числі, але без обмеження, гліцини, проліни та залишки, які приймають участь у кепуванні кінця спіральної структури. Залишки на відомих ділянках зв'язування рецептора також для заміни не вибирали. Положення 123 (Asp) та 141 (Thr) послідовності SEQ ID NO: 1 можуть бути критичними для взаємодії з рецептором. Положення 7 (Arg) може бути критичним для укладання поліпептиду. Положення 133 (Thr) являє собою О-сполучений сайт глікозилування у людському G-CSF.

[643] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та до будь-якої їхньої комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 або відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[644] В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень 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, та будь-якої їх комбінації послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та будь-якої їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166, та будь-якої їх комбінації послідовності SEQ ID NO: 1 або відповідних амінокислот послідовності SEQ ID NO: 2. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до одного або декількох із наведених нижче положень bG-CSF: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до положення 62 bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучно закодованих амінокислот вводять до положення 133 bG-CSF (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу поліпептид за цим винаходом містить заміну, додання або делецію однієї або декількох природних амінокислот. В деяких варіантах здійснення цього винаходу одну або декілька штучних амінокислот вводять до лідерної або сигнальної послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF.

[645] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та у будь-якій їхній комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF).

[646] В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним

полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 3, 7, 62, 133, 166, та будь-якій їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у одному або декількох із цих положень сполучена з водорозчинним полімером, у тому числі, але без обмеження, у положеннях: 62, 133, та їх комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 62 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучно закодована амінокислота у положенні 133 сполучена з водорозчинним полімером (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідна амінокислота послідовності SEQ ID NO: 2). В деяких варіантах здійснення цього винаходу штучна амінокислота у сигнальній або лідерній послідовності N- або C-кінця послідовності SEQ ID NO: 1, 2 або іншої послідовності bG-CSF є сполученою з водорозчинним полімером.

#### Приклад 2

Клонування та експресія поліпептиду bG-CSF, що містить штучно закодовану амінокислоту і продукується у *E. coli*

[647] Цей приклад надає подробиці, які стосуються клонування та експресії поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, у *E. coli*, та способів оцінювання біологічної активності модифікованих поліпептидів bG-CSF.

[648] Способи клонування bG-CSF відомі фахівцям у цій галузі. Поліпептидні та полінуклеотидні послідовності bG-CSF і клонування bG-CSF у клітинах-хазяях, а також очищення bG-CSF докладно описані у патенті США № 5,849,883, який у повному обсязі включений до цього опису шляхом посилання, та у Heidari et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57.

[649] кДНК, яка кодує зрілий bG-CSF, представлена як послідовність SEQ ID NO: 3. Поліпептид, який кодується цією послідовністю, представлений як послідовність SEQ ID NO: 1.

[650] кДНК, яка кодує зрілий bG-CSF з метіоніном на N-кінці, представлена як послідовність SEQ ID NO: 4. Поліпептид, який кодується цією послідовністю, представлений як послідовність SEQ ID NO: 2.

[651] Введену трансляційну систему, яка містить ортогональну тРНК (O-tRNA) та ортогональну аміноацил-тРНК-синтетазу (O-RS), застосовують для експресії bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту. O-RS головним чином аміноацилює O-tRNA штучно закодованою амінокислотою. У свою чергу, трансляційна система вставляє штучно закодовану амінокислоту до bG-CSF, у відповідь на закодований селекторний кодон. Прийнятні послідовності O-RS та O-tRNA описані у WO 2006/068802, яка має назву "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (у цій заявці E9-послідовність SEQ ID NO: 22 та D286R мутант E9-послідовність SEQ ID NO: 24), та у WO 2007/021297, яка має назву "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (у цій заявці F13; послідовність SEQ ID NO: 23), які у повному обсязі включені до цього опису шляхом посилання.

Таблиця 2

Послідовності O-RS and O-tRNA

SEQ NO:5	ID	M. jannaschii mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CUA</sub>	tRNA
SEQ NO:6	ID	HLAD03; оптимізований амбер-супресор (супресорна тРНК, яка пригнічує амбермутацію)	tRNA
SEQ NO:7	ID	HL325A; оптимізована супресорна тРНК зсуву рамки AGGA	tRNA
SEQ NO:8	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-L-фенілаланіну п-Az-PheRS(6)	RS
SEQ NO:9	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-бензоїл-L-фенілаланіну п-BpaRS(1)	RS
SEQ NO:10	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргіл-фенілаланіну пропаргіл-PheRS	RS
SEQ NO:11	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргіл-фенілаланіну пропаргіл-PheRS	RS
SEQ NO:12	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргіл-фенілаланіну пропаргіл-PheRS	RS

SEQ NO:13	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну п-Az-PheRS(1)	RS
SEQ NO:14	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну п-Az-PheRS(3)	RS
SEQ NO:15	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну п-Az-PheRS(4)	RS
SEQ NO:16	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну п-Az-PheRS(2)	RS
SEQ NO:17	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-ацетил-фенілаланіну (LW1)	RS
SEQ NO:18	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-ацетил-фенілаланіну (LW5)	RS
SEQ NO:19	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-ацетил-фенілаланіну (LW6)	RS
SEQ NO:20	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну (AzPheRS-5)	RS
SEQ NO:21	ID	Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення п-азидо-фенілаланіну (AzPheRS-6)	RS

[652] Трансформація *E. coli* плазмідами, які містять модифіковану послідовність полінуклеотиду bG-CSF та пару ортогональна аміноацил-тРНК-синтетаза/тРНК (специфічну для бажаної штучно закодованої амінокислоти), надає можливість введення штучно закодованої амінокислоти до поліпептиду bG-CSF. Плазміда, яку застосовують для експресії bG-CSF, представлена на Фіг. 1. Геном, який становить інтерес, наведеним як приклад, є bG-CSF із селекторним кодоном (амбер), який замінює кодон, що кодує T133. Поліпептид з пара-ацетилфенілаланіном у положенні 133 позначають як bG-CSF T133pAF. Plpp – конститутивний промотор *E. coli*; Pro cluster – тандемні копії тРНК проліну *E. coli*; кластер P13 – тандемні копії модифікованої тРНК тирозину *Methanococcus jannaschi* з WO 2007/021297; E9 RS (D286R) – тирозил-тРНК-синтетаза *Methanococcus jannaschi* з WO 2006/068802; T7 pro – T7 промотор; T7 terminator – T7 термінатор; ori – точка ініціації реплікації; bla (ap) sequence – ген стійкості до ампіциліну.

[653] Полінуклеотиди, які кодують bG-CSF дикого типу або один з 15 поліпептидів-мутантів, були клоновані з подальшим субклонуванням у векторі pVK6 компанією Codon Devices, Inc. Кожна з одержаних генно-інженерних конструкцій мала селекторний кодон, амбер-кодон, у різних положеннях. Одержані поліпептиди bG-CSF мали штучно закодовану амінокислоту, пара-ацетилфенілаланін (pAF; pAcF), на яку була заміненна природна амінокислота у одному з наведених нижче положень: L3, R7, E33, H43, Q58, S62, Q67, L69, L99, D123, L124, T133, Q134, T141 та R166 (нумерація положень стосується послідовності SEQ ID NO: 1). Оскільки кожен з одержаних поліпептидів-мутантів b-GCSF мав метіонін на N-кінці (для послідовності бичачого G-CSF дикого типу з метіоніном на N-кінці дивись послідовність SEQ ID NO: 2), експресовані поліпептиди b-GCSF мали штучні амінокислотні заміни у положеннях за номером +1 (наприклад, один мутант мав лейцин у положенні 4 послідовності SEQ ID NO: 2, замінений на pAF). Після перевірки послідовності плазмід трансформували у клітинах W3110 B2, і колонії культивували на чашках з ампіциліном. Інформація, яка стосується лінії клітин *E. coli*, представлена на Фіг. 2. Ці колонії застосовували для інокулювання 5 мл LB (середовище Лурія) ампіциліновими культурами у розведенні 1:1000, які були культивовані при температурі 37°C до O.D. (оптична густина) 600=0,8. Після цього до 15 різних культур додавали pAF (пара-ацетилфенілаланін) із кінцевою концентрацією 4 мМ. Приблизно через 30 хв культури індукували L-арабінозою з кінцевою концентрацією 0,2 %, після чого згадані культури додатково інкубували при температурі 37°C впродовж 5 год. Після завершення інкубування з кожної культури відбирали 500 мкл зразки, і центрифугували при 13000 об/хв впродовж 4 хв. Супернатант викидали, а дебрис ресуспендували у 150 мкл B-PER (реактив для екстрагування бактеріального білка) з 1 мкл ДНКаз та інкубували при кімнатній температурі впродовж ночі. Наступного ранку додавали 4xLDS буфера для зразків (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія), зразки нагрівали при температурі 95°C впродовж 5 хв, і додавали 10-кратну кількість відновлювача зразків (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія). Зразки у подальшому розділяли за допомогою SDS-PAGE на 4-12 % градієнтах гелю (компанія Invitrogen,

Carlsbad, штат Каліфорнія) у MES буфері, та візуалізували за допомогою барвника Simply Blue SafeStain (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія). На Фіг. 3 показані зразки, які були одержані з культур bG-CSF дикого типу та мутантів після аналізу на 4-12 % градієнтах гелю та забарвлення кумасі синім.

#### 5 Солюбілізація препаратів тілець включення

[654] Клітинну масу ресуспендували шляхом змішування при температурі 4°C до кінцевої 10 % концентрації твердої речовини у буфері I для тілець включення (IB) (50 мМ трис-буфера, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 % тритону X-100; 4°C). Згадані клітини піддавали лізису шляхом дворазового пропускання ресуспендованого матеріалу через мікрофлюїдизатор. Зразки 10 центрифугували при 10000×g впродовж 15 хв при температурі 4°C, і супернатант зливали. Дебріс тілець включення (IB) промивали шляхом ресуспендування у додатковому об'ємі IB буфера I (50 мМ трис-буфера, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1 % тритону X-100; 4°C), і ресуспендований матеріал двічі пропускали через мікрофлюїдизатор. Після цього зразки 15 центрифугували при 10000×g впродовж 15 хв при температурі 4°C, і супернатант зливали. Дебріс тілець включення (IB) ресуспендували у одному об'ємі буферу II (50 мМ трис-буфера, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C). Після ресуспендування зразки центрифугували при 10000×g впродовж 15 хв при температурі 4°C, і супернатант зливали. Після цього дебріс тілець 20 включення (IB) ресуспендували у 1/2 об'єму буфера II (50 мМ трис-буфера, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C). Після цього поділені на аліквоти IB вносили у відповідні контейнери. Зразки центрифугували при 10000×g впродовж 15 хв при температурі 4°C, і супернатант зливали. Після цього тільця включення солюбілізували або зберігали при температурі -80°C до подальшого застосування.

#### Солюбілізація тілець включення

[655] Тільця включень солюбілізували до кінцевої концентрації у межах 10-15 мг/мл у солюбілізаційному буфері (20 мМ трис-буфера, pH 8,0; 8 М гуанідину; 10 мМ β-ME). Солюбілізовані IB інкубували при кімнатній температурі з постійним перемішуванням впродовж 1 год. або до їхньої повної солюбілізації. Концентрацію білка регулювали шляхом розбавлення 25 додатковою кількістю солюбілізаційного буфера, у разі, якщо концентрація білка була високою.

#### Рефолдинг

[656] Рефолдинг проводили шляхом розбавлення зразків до кінцевої концентрації білка 0,5 мг/мл у 0,5 М розчині аргініну, pH 8,0; 4°C. Процес рефолдингу відбувався впродовж 48-72 год. при температурі 4°C.

#### Очищення

[657] Твердий  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  додавали до зразків з кінцевою концентрацією 20 % з обережним 35 перемішуванням. Зразки обережно перемішували при температурі 4°C впродовж 30 хв. Преципітований білок (який містив bG-CSF) центрифугували при 12000×g впродовж 15 хв. Супернатант видаляли, а дебріс ресуспендували у 1/2 об'єму 20 мМ розчину NaAc, pH 4,5, для рефолдингу. Весь об'єм дебрісу до розчину не перейшов. До розчину перейшов лише bG-CSF. Несолубілізований матеріал осаджували шляхом центрифугування при 12000×g впродовж 40 15 хв. Зразки видаляли, супернатант зберігали. bG-CSF фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Після цього цей матеріал завантажували до CM FF колонки (компанія GE Healthcare), зрівноваженої у буфері A (20 мМ розчин NaAc, pH 4,5). Перед завантаженням до колонки згаданий матеріал мав показник <10 м/С. bG-CSF елюювали з колонки лінійним градієнтом (більше 10 об'ємів колонки) до 100 % буфера B (20 мМ NaAc, pH 4,5; 500 мМ NaCl). На Фіг. 4 45 зображені результати SDS-PAGE аналізу забарвлених кумасі синім пікових фракцій з CM FF колонки, через яку пропускали bG-CSF-T133pAF.

#### Пегілування та очищення

[658] pH CM пулу доводили до pH 4,0 за допомогою 50 % льодяної оцтової кислоти. Після цього пул концентрували приблизно до 4,0 мг/мл білка. До пулу додавали 12:1 або 8:1 мольний надлишок гідроксиламіну PEG:bG-CSF. Суміш інкубували при температурі 28°C впродовж 48-72 год. Після цього суміш розбавляли водою у 8-10 разів (<8 м/С) з подальшим завантаженням до SP HP колонки (компанія GE Healthcare), зрівноваженої у буфері A (20 мМ розчин NaAc, pH 4,5). Пегільований bG-CSF елюювали лінійним градієнтом (більше 40 об'ємів колонки) до 100 % буфера B (20 мМ NaAc, pH 4,5; 500 мМ NaCl). На Фіг. 5 зображені результати SDS-PAGE 50 аналізу пікових фракцій з SP HP колонки пегільованого bG-CSF-T133pAF. У елюювальному буфері також може застосовуватись, наприклад, 5 % розчин етиленгліколю.

[659] Фракції пегільованого bG-CSF змішували, і діалізували проти буфера для одержання лікарської форми bG-CSF (4,26 мМ NaAc, pH 4,0; 0,565 мМ NaCl; 0,0033 % твін 20; 5 % сорбіту). Пегільований матеріал концентрували приблизно до 6-8 мг/мл білка з подальшим

стерилізуванням фільтрацією за допомогою 0,22 мкм фільтра PES. Білок зберігали при температурі 4°C або піддавали миттєвому заморожуванню для тривалого зберігання при температурі -80°C. На Фіг. 6 зображені результати SDS-PAGE аналізу b-GCSF перед та після пегілування. Смуга 1: bG-CSF-T133pAF; Смуга 2: bG-CSF-T133pAF-20KPEG; Смуга 3: Дивись маркер молекулярної маси Blue Plus 2.

Картування пептидів (трипсин/ендопротеїназа Glu-C) bG-CSF

[660] Картування пептидів проводили для підтвердження введення пара-ацетилфенілаланіну (pAF) до поліпептиду bG-CSF. Очищений bG-CSF T133pAF перед пегілуванням та bG-CSF дикого типу розбавляли до одержання кінцевого 6 М розчину гуанідину-HCl, 50 мМ розчину трис-буферу, pH 7,8 і відновлювали за допомогою 10 мМ розчину DTT (дитіотреїтол) при температурі 37°C впродовж 1 год. Зразок алкілували 20 мМ розчином IAA (індолілоцтова кислота) впродовж 40 хв у темряві при кімнатній температурі, і реакційну суміш різко охолоджували доданням холодного 20 мМ розчину DTT. Матеріал діалізували до 100 мМ розчину бікарбонату амонію, pH 7,7, і обробляли розчином трипсину 1:50 (білок:фермент) впродовж 4 год. при температурі 37°C. Після цієї реакції проводили реакцію з доданням розчину Glu-C 1:20 впродовж ночі при температурі 25°C. Реакцію гідролізу різко припиняли шляхом додання холодного розчину TFA (трифтороцтова кислота) до кінцевої концентрації 0,1 %. Зразок вносили до хроматографічної колонки з оберненою фазою Grace Vydac C8 з послідовно підключеним мас-спектрометром ThermoFinnigan LCQ Deca з іонною пасткою. Градієнт розпочинався з 98 % рухомої фази А (0,05 % розчин TFA у воді) ізокротично впродовж 8 хв з подальшою лінійною зміною до 60 % рухомої фази В (0,05 % розчин TFA у ацетонітрилі) впродовж 90 хв з детекцією при 214 нм та 250 нм. Процес проводили при швидкості 0,2 мл/хв та при температурі колонки 40°C. Напруга на капілярах була встановлена на рівні 15 В з діапазоном повного сканування у межах 100-2000 m/z. Напруга при зіткненні для мас-спектрометрії/мас-спектроскопії дорівнювала 42 % від номінальної.

[661] На Фіг. 7a зображений триптичний/Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детекція при 214 нм). На Фіг. 7b представлено триптичний/Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детекція при 214 нм). Показана підвищена гідрофобність в результаті заміни треоніну на pAF (пара-ацетилфенілаланін). У разі bG-CSF дикого типу час утримування пептиду, який містив T133, дорівнював 42,79 хв; у разі bG-CSF T133pAF, пептид, який містив T133pAF, був зсунутим і мав час утримування 46,89 хв.

[662] На Фіг. 8a зображений триптичний/Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детекція при 250 нм). На Фіг. 8b зображений триптичний/Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детекція при 250 нм). У разі проведення аналізу при 250 нм, сигнали білок/пептид є слабкими, але сигнал, обумовлений pAF, є сильним. Пептид, який містить T133 pAF, показаний на Фіг. 8b з часом утримування 46,89 хв.

Картування пептидів (ендопротеїназа Glu-C) bG-CSF

[663] Очищений bG-CSF T133pAF перед пегілуванням розбавляли до одержання кінцевого 6 М розчину гуанідину-HCl, 50 мМ розчину трис-буферу, pH 7,8, і відновлювали за допомогою 10 мМ розчину DTT при температурі 37°C впродовж 1 год. Зразок алкілували 20 мМ розчином IAA впродовж 40 хв у темряві при кімнатній температурі, і реакційну суміш різко охолоджували шляхом додання холодного 20 мМ розчину DTT. Матеріал діалізували до 100 мМ розчину бікарбонату амонію, pH 7,7, і обробляли розчином Glu-C 1:20 (білок:фермент) впродовж ночі при температурі 25°C. Реакцію гідролізу різко припиняли доданням холодного розчину TFA до кінцевої концентрації 0,1 %. Зразок вносили до хроматографічної колонки з оберненою фазою Grace Vydac C8 з послідовно підключеним мас-спектрометром ThermoFinnigan LCQ Deca з іонною пасткою. Градієнт розпочинався з 98 % рухомої фази А (0,05 % розчин TFA у воді) ізокротично впродовж 8 хв з подальшою лінійною зміною до 60 % рухомої фази В (0,05 % розчин TFA у ацетонітрилі) впродовж 90 хв з детекцією при 214 нм та 250 нм. Процес проводили при швидкості 0,2 мл/хв та при температурі колонки 40°C. Напруга на капілярах була встановлена на рівні 15 В з діапазоном повного сканування у межах 100-2000 m/z. Напруга при зіткненні для мас-спектрометрії/мас-спектроскопії дорівнювала 42 % від номінальної.

[664] На Фіг. 9a зображений Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детекція при 214 нм). На Фіг. 9b зображений Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детекція при 214 нм). У разі bG-CSF дикого типу час утримування пептиду, який містив T133, дорівнював 52,04 хв; у разі T133pAF bG-CSF пептид, який містив T133pAF, мав час утримування 53,95 хв.

[665] На Фіг. 10a зображений Glu-C гідролізат bG-CSF дикого типу (детекція при 250 нм). На Фіг. 10b зображений Glu-C гідролізат bG-CSF T133pAF (детекція при 250 нм). У разі проведення аналізу при 250 нм сигнали білок/пептид є слабкими, але сигнал, обумовлений pAF, є сильним. Пептид, який містить T133 pAF, зображений на Фіг. 10b із часом утримування 53,95 хв.



## RP-HPLC та SEC-HPLC аналіз поліпептидів bG-CSF

[666] RP-HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія з оберненою фазою) та SEC-HPLC (гель-хроматографія за розміром молекул) застосовували для аналізу чистоти та визначення ідентичності зразків після очищення. Очищений 20K PEG-bG-CSF T133pAF розбавляли до 1 мг/мл за допомогою буфера для одержання лікарської форми (4,26 мМ ацетату натрію, рН 4,0, 0,565 мМ хлориду натрію, 0,0033 % твін-20 та 5 % сорбіту), і 10 мкл вводили у хроматографічну колонку J.T. Baker (4,6×100 мм, 5 мкм) з широкопористим сорбентом Октил (C8) для обернено-фазової хроматографії. Градієнт розпочинався з 50 % рухомої фази А (0,1 % розчин TFA у воді) з подальшою лінійною зміною до 70 % рухомої фази В (0,1 % розчин TFA у ацетонітрилі) впродовж 26 хв. Колонку регенерували за допомогою 90 % рухомої фази В впродовж 4 хв, і повторно зрівноважували за допомогою 50 % рухомої фази А впродовж 5 хв. Процес здійснювали при швидкості 1,5 мл/хв, при температурі колонки 60°C з детекцією при 214 нм. Аналіз проводили із застосування програми Agilent Chemstation software. Таблиця 3 показує головний пік (20K PEG-bG-CSF T133pAF) із часом утримування 8,50 хв. За результатами обчислення відсотка (%) площі, 91,2 % зразка становив пегільований b-GCSF.

Таблиця 3

Час (хв)	Площа	% площі
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
8,5	7245,0	91,2
9,3	87,9	1,1
9,7	31,9	0,4
10,1	135,5	1,7

[667] Непегільований bG-CSF також аналізували за допомогою RP-HPLC. Таблиця 4 показує головний пік (bG-CSF T133pAF) із часом утримування 8,893 хв. За результатами обчислення відсотка(%) площі, 64,3 % зразка становив bG-CSF T133pAF.

Таблиця 4

Час (хв)	Площа	% площі
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
8,9	4622,1	64,3
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

[668] Очищений 20K PEG-bG-CSF T133pAF також аналізували засобами SEC-HPLC. Нерозбавлений зразок (2 мкл) ізократичним градієнтом впродовж 25 хв вводили у гель-хроматографічну колонку Tosohaas TSK Super SW3000 (4,6×300 мм, 4 мкм, 250 Е). Рухома фаза містила 97 % 63 мМ розчину фосфату натрію, рН 7,0, та 3 % розчин 2-пропанолу. Процес здійснювали при швидкості 0,3 мл/хв при температурі колонки 25°C з детекцією при 214 нм. Аналіз проводили із застосування програми Agilent Chemstation software. Таблиця 5 показує головний пік із часом утримування 9,157 хв. За результатами обчислення відсотка (%) площі 98,3 % зразка становив мономерний пегільований bG-CSF. Результати SEC-HPLC аналізу пегільованого поліпептиду дивись на Фіг. 11.

Таблиця 5

Час (хв)	Площа	% площі
7,0	50,3	0,1
8,2	228,0	0,6
9,2	36454,5	98,3
10,1	361,4	1,0

[669] Непегільований bG-CSF також аналізували за допомогою SEC-HPLC. Таблиця 6 показує головний пік із часом утримування 13,125 хв. За результатами обчислення відсотка (%) площі 99,0 % зразка становив мономерний bG-CSF T133pAF. Результати SEC-HPLC аналізу поліпептиду дивись на Фіг. 12.

Таблиця 6

Час (хв)	Площа	% площі
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

[670] Для підтвердження ідентичності поліпептиду bG-CSF був також проведений аналіз із високоточною електронно-стимульованою іонізацією із часопротітним аналізатором (ESI-TOF) (компанія Agilent Technology) поліпептиду bG-CSF. Очищений bG-CSF T133pAF діалізували до 0,1 % розчину мурашиної кислоти. Зразок наносили на капсулу для хроматографічної колонки C18 на 1 хв з водою, після чого елюювали 50 % розчином ацетонітрилу у воді. Сумарний робочий час становив 3 хв при швидкості 0,3 мл/хв. Напруга на капілярах ESI була виставлена на 4 кВ; напруга MStOF (мас-спектрометр із часопротітним аналізатором) була виставлена на 300 В. Сканована оболонка зарядового стану була розгорнута з одержанням значення MH<sup>+</sup>. Очікуване значення MH<sup>+</sup>MW становило 19145. Значення MH<sup>+</sup>MW, яке спостерігалось, становило 19146.

#### Аналіз проліферації M-NFS60

[671] Для визначення ефективності молекул bG-CSF аналіз проліферації проводили на лінії клітин M-NFS60. Ця лінія клітин була закуплена від ATCC (номер за каталогом CRL-1838). Клітини відтаювали та підтримували на RPMI 1640+10 % FBS (сироватка плода корови) + пеніцилін/стрептоміцин + 50 мкМ розчин 2-меркаптоетанолу +20 нг/мл mIL-3 (компанія Invitrogen, Carlsbad, штат Каліфорнія; mIL3 від компанії BD Pharmingen, номер за каталогом 554579). Клітини розділяли кожні два дні, і висівали з розрахунку  $0,02 \times 10^6$  клітин/мл.

[672] За день до проведення аналізу клітини розділили до рівня  $0,1 \times 10^6$  клітин/мл. Через 16-24 год. клітини висіали на аналітичне середовище на 96-лункові планшети чорного кольору з плоским дном з розрахунку 10000 клітин/лунка з повторним доданням послідовних розведень сполук bG-CSF. Сумарний об'єм на лунку становив 100 мкл; аналітичне середовище мало такий склад: RPMI 1640+10 % FBS+P/S (пеніцилін/стрептоміцин). До кожного планшета також з подвоєнням додавали стандарти, такі як Neupogen<sup>®</sup> та bG-CSF дикого типу. Після цього планшети інкубували при температурі 37°C у 5 % CO<sub>2</sub> впродовж 42 год. Після 42 год. інкубування додавали 10 мкл/лунка аламарового синього (компанія Biosource, номер за каталогом: DAL1100), і планшети додатково інкубували впродовж 6 год. при температурі 37°C, 5 %CO<sub>2</sub>. Після цього планшети центрифугували при 4000 об/хв впродовж 2 хв при кімнатній температурі для того, щоб позбавитись будь-яких повітряних пухирців. Після цього планшети зчитували за допомогою флуорометра Тесла зі збудженням при 535 нм і емісією при 590 нм. Планшети обгортали фольгою для запобігання світловій експозиції світлочутливого барвника аламарового синього.

[673] Для аналізу даних подвійні серійні розведення кожної сполуки усереднювали, і значення EC<sub>50</sub> обчислювали за допомогою програми SigmaPlot. Невиправлені значення EC<sub>50</sub> для усіх сполук табулювали з обчисленням кратності різниць (пегільовані сполуки бичачого GCSF порівнювали з bG-CSF дикого типу). Експерименти багато разів повторювали для визначення внутрішньоаналітичного коефіцієнта варіації (CV) <20 % та міжаналітичного коефіцієнта варіації <30 %. Фіг. 13/Таблиця 7 = аналіз проліферації M-NFS60 – невивіршені значення EC<sub>50</sub> 20K пегільованого бичачого G-CSF T133pAF та bG-CSF дикого типу.

Фіг. 14/Таблиця 8 = аналіз проліферації M-NFS60 – кратність різниць  $EC_{50}$  20K пегільованого бичачого G-CSF T133pAF у зіставленні з bG-CSF дикого типу.

[674] Аналізували інші молекули bG-CSF, які містили заміни штучно закодованими амінокислотами. Таблиця 9 показує середні одержані значення  $EC_{50}$ .

5

Таблиця 7

		Neupogen	Neulasta	bG-CSF дикого типу	20K PEG-bT133 [партія NK2]
Узагальнення	Середнє значення $EC_{50}$ [нг/мл]	0,025	0,077	0,053	0,270
	Середнє квадратичне відхилення	0,005	0,004	0,005	0,042
	Коефіцієнт варіації	18 %	5 %	9 %	16 %
	Кількість (N)	14	5	16	2

Таблиця 8

		Neupogen	Neulasta	bG-CSF дикого типу	20K PEG-bT133 [партія NK2]
Узагальнення	Кратність різниць $EC_{50}$ [X]	1,0	3,2	1	5,1
	Середнє квадратичне відхилення	0,0	0,7	0	0,5
	Коефіцієнт варіації	0 %	23 %	0 %	9 %
	Кількість (N)	14	5	12	2

Таблиця 9

	Середні значення $EC_{50}$	Середнє квадратичне відхилення	Коефіцієнт варіації
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 %

Забарвлювання CD11b нейтрофілів великої рогатої худоби

- 10 [675] 50 мкл крові великої рогатої худоби наносили на необроблений полістироловий 96-лунковий планшет (компанія Cal Poly Pomona). Клітини стимулювали додаванням 50 мкл Neupogen®, Neulasta® або bG-CSF-T133pAcF-20K PEG, розведеного у PBS (фосфатно-буферний фізіологічний розчин) (200 нг/мл до кінцевої концентрації 0,001 нг/мл). Розчин обережно перемішували та інкубували впродовж 30 хв при температурі 39°C у CO<sub>2</sub>-інкубаторі.
- 15 До клітин додавали перше антитіло (20 мг/мл) (мишаче антибічаче CD11b: MM12A, компанія VMRD). Клітини інкубували при температурі 4°C впродовж 30 хв. Аналітичний планшет центрифугували при 800×g впродовж 2 хв, і супернатант видаляли. Еритроцити піддавали лізису впродовж 1 хв шляхом додавання 150 мкл холодного лізисного розчину (0,15 М розчин фосфату, pH 7,2), і ізотонічність відновлювали шляхом додавання 50 мкл відновлювального розчину (0,15 М розчин фосфату, 0,5 М розчин NaCl, pH 7,4). Планшет знову центрифугували, і супернатант видаляли. Процедуру лізису повторювали доти, доки не були видалені усі видимі
- 20

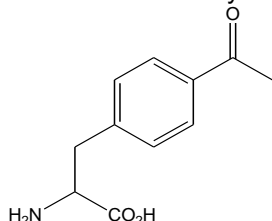
еритроцити. Клітини двічі промивали 200 мкл FACS буфера (1×PBS, 2,5 мМ розчин гепес-буфера, 0,1 % розчин азиду натрію, 2,0 % розчин FBS), і ресуспендували у 100 мкл FACS буфера. Додавали 20 мкг/мл другого антитіла (козяче антимишаче IgG1, Human ads-PE), та інкубували при температурі 4°C впродовж 30 хв у темряві. Клітини осаджували, двічі промивали, і ресуспендували у 200 мкл FACS буфера. Для реєстрації 50000 явищ та підрахунку CD11 позитивних клітин застосовувати прилад BD FACS Array.

[676] На Фіг. 15 показані результати експерименту, при проведенні якого нейтрофіли великої рогатої худоби забарвлювали антитілом CD11b для визначення їхньої реактивності до різних молекул. Для визначення рівня презентації CD11b на поверхні клітин застосовували середню інтенсивність флуоресценції (MFI) для гранулоцитів. Відсоток (%) MFI являє собою нормалізоване значення відносно нестимульованої контрольної групи. Криві залежності "доза-ефект" та значення EC<sub>50</sub> для Neupogen<sup>®</sup>, Neulasta<sup>®</sup> та bG-CSF T133pAF-20K PEG були визначені на основі 4-параметричної підгонки. Значення EC<sub>50</sub> для Neupogen<sup>®</sup> становило 3,18 нг/мл. Для Neulasta<sup>®</sup> значення EC<sub>50</sub> дорівнювало 2,84 нг/мл, і для bG-CSF T133pAF-20K PEG значення EC<sub>50</sub> дорівнювало 6,23 нг/мл.

#### Приклад 3

Введення карбонільвмісної амінокислоти і подальша реакція з амінооксидвмісним PEG

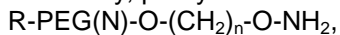
[677] Цей Приклад демонструє спосіб одержання поліпептиду bG-CSF, який містить кетонвмісну штучно закодовану амінокислоту, який у подальшому реагує з амінооксидвмісним PEG з приблизною молекулярною масою 5000. Кожен із залишків перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 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 (тобто на карбоксильному кінці білка) та будь-якій їхній комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF) незалежно один від одного замінюють штучно закодованою амінокислотою, яка має наведену нижче структуру:



[678] Послідовностями, застосованими для сайт-специфічного введення п-ацетилфенілаланіну до bG-CSF, є послідовності SEQ ID NO: 3 або 4 (bG-CSF), послідовності

SEQ ID NO: 23 або 5 (muttRNA, M. jannaschii<sup>Tyr</sup> mRNA<sup>CUA</sup>) та послідовності SEQ ID NO: 22, 24, 17, 18, 19 (TyrRS LW1, 5 або 6), опис яких було наведений у Прикладі 2 вище.

[679] Після модифікації варіант поліпептиду bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, реагує з амінооксидвмісною похідною PEG наведеної нижче форми:



де R – метил, n – 3, а молекулярна маса (MW) N дорівнює приблизно 5000. Очищений bG-CSF, який містить п-ацетилфенілаланін, розчинений (10 мг/мл) у 25 мМ розчині MES буфера (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 6,0, 25 мМ розчині гепес-буфера (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 7,0, або у 10 мМ розчині ацетату натрію (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 4,5, реагує з 10-100-кратним надлишком амінооксидвмісного PEG з подальшим перемішуванням впродовж 10-16 год. при кімнатній температурі (Jencks W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, p. 475). Після цього PEG-b-GCSF розбавляють у відповідному буфері для негайного очищення та аналізу.

#### Приклад 4

Кон'югування з PEG, який містить гідроксиламінову групу, сполучену з PEG за допомогою амідного зв'язку

[680] PEG, який має наведену нижче структуру, сполучають з кетонвмісною штучно закодованою кислотою за процедурою, описаною у Прикладі 3:



де R – метил, n=4, а молекулярна маса N дорівнює приблизно 20000. Умови проведення реакції, очищення та аналізу відповідають опису, наведеному у Прикладі 3.

#### Приклад 5

Введення двох різних штучно закодованих амінокислот до поліпептидів bG-CSF

[681] Цей Приклад демонструє спосіб одержання поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, яка містить кетонову функціональну групу, у двох положеннях з числа наведених нижче залишків: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), та у будь-якій їхній комбінації (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF). Поліпептид bG-CSF одержують, як описано у Прикладі 1 та Прикладі 2, за виключенням того, що селекторний кодон вводять на двох різних ділянках у межах нуклеїнової кислоти.

#### Приклад 6

Кон'югування поліпептиду bG-CSF з гідрозидвмісним PEG і подальше in situ відновлення

[682] Поліпептид bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, одержують за процедурою, опис якої наведено у Прикладі 2 та Прикладі 3. Після модифікації гідрозидвмісний PEG, який має наведену нижче структуру, кон'югують із поліпептидом bG-CSF:

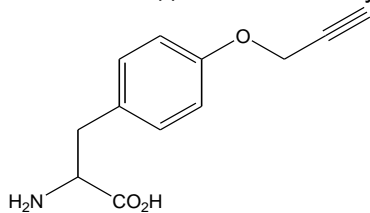
$R\text{-PEG(N)-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(O)(CH}_2\text{)}_n\text{-X-NH-NH}_2$ ,

де R – метил, n=2, N=10000 MW, X – карбонільна (C=O) група. Очищений b-GCSF, який містить п-ацетилфенілаланін, розчинений (0,1-10 мг/мл) у 25 мМ розчині MES буфера (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 6,0, 25 мМ розчині гепес-буфера (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 7,0, або у 10 мМ розчині ацетату натрію (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), pH 4,5, вводять в реакцію з 1-100-кратним надлишком гідрозидвмісного PEG, а відповідний гідрозон відновлюють in situ шляхом додання концентрованого 1 М розчину NaCNBH<sub>3</sub> (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі), розчиненого у H<sub>2</sub>O, до кінцевої концентрації 10-50 мМ. Реакції проводять у темряві при температурі від 4°C до кімнатної впродовж 18-24 год. Реакції припиняють доданням 1 М розчину трис-буфера (компанія Sigma Chemical, St. Louis, штат Міссурі) з приблизним значенням pH 7,6 до одержання кінцевої 50 мМ концентрації трис-буфера або розбавляють у відповідному буфері для негайного очищення.

#### Приклад 7

Введення алкінвмісної амінокислоти до поліпептиду bG-CSF і дериватизація мПЕГ-азидом

[683] Наведені нижче залишки, перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка) та будь-яку їхню комбінацію (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF) (кожний (кожну) незалежно від іншого (інших)) замінюють наведеною нижче штучно закодованою амінокислотою:

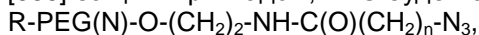


[684] Послідовностями, застосованими для сайт-специфічного введення п-пропаргілтирозиу до bG-CSF, є послідовності SEQ ID NO: 3 або 4, послідовності SEQ ID NO: 5

(muttRNA, M. jannaschii<sup>mtRNA<sup>Tyr</sup></sup><sub>CUA</sub>) та 10, 11, 12, опис яких було наведений у Прикладі 2 вище. Поліпептид bG-CSF, який містить пропаргілтирозин, експресують у E. coli і очищають за умов, опис яких був наведений у Прикладі 3.

[685] Очищений b-GCSF, який містить пропаргілтирозин, розчинений (0,1-10 мг/мл) у РВ буфері (100 мМ розчин фосфату натрію, 0,15 М розчин NaCl, pH=8), та 10-1000-кратний надлишок азидвмісного PEG додають до реакційної суміші. Після цього до реакційної суміші додають каталітичну кількість CuSO<sub>4</sub> та мідного дроту. Після інкубування суміші (у тому числі, але без обмеження, впродовж приблизно 4 год. при кімнатній температурі або при температурі 37 °C чи впродовж ночі при температурі 4 °C), додають H<sub>2</sub>O, і суміш фільтрують через діалізну мембрану. Зразок можна аналізувати на додання, у тому числі, але без обмеження, за подібними процедурами, опис яких наведено у Прикладі 3.

[686] За цим Прикладом, PEG буде мати наведену нижче структуру:

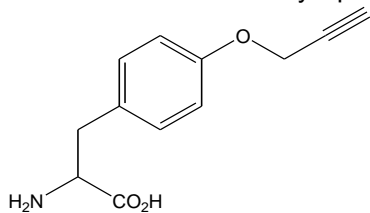


де R – метил, n – 4, N – 10000 MW.

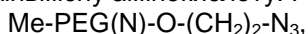
Приклад 8

Заміна великої гідрофобної амінокислоти у поліпептиді bG-CSF пропаргілтирозином

[687] Залишок Phe, Trp або Tyr, присутній у межах однієї з наведених нижче ділянок bG-CSF: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), або будь-яку їхню комбінацію (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF SEQ ID NO: 1) замінюють наведеною нижче штучно закодованою амінокислотою як описано у Прикладі 7:



[688] Після модифікації PEG приєднують до варіанта поліпептиду bG-CSF, який містить алкінвмісну амінокислоту. PEG буде мати наведену нижче структуру:

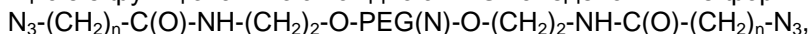


і процедури сполучення будуть відповідати процедурам, наведеним у прикладі 7. Подібним чином буде одержаний варіант поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, яка є приблизно ізостеричною з однією з природних великих гідрофобних амінокислот, які модифікуються похідною PEG на іншій ділянці у межах поліпептиду.

Приклад 9

Одержання гомодимеру, гетеродимеру, гомомультимеру або гетеромультимеру поліпептиду bG-CSF, відокремленого одним або декількома сполучними агентами PEG

[689] Алкінвмісний варіант поліпептиду bG-CSF, який одержали за Прикладом 7, вводять в реакцію з біфункціональною похідною PEG наведеної нижче форми:



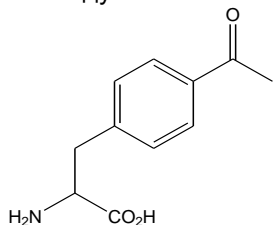
де n – 4, а середня молекулярна маса PEG дорівнює приблизно 5000, з одержанням відповідного гомодимеру поліпептиду PEG, де дві молекули bG-CSF є фізично відокремленими PEG. Аналогічним чином поліпептид bG-CSF можна сполучати з одним або декількома іншими поліпептидами з утворенням гетеродимерів, гомомультимерів або гетеромультимерів. Сполучення, очищення та аналіз будуть здійснюватись за Прикладом 7 та Прикладом 3.

Приклад 10

Сполучення сахаридної складової з поліпептидом bG-CSF

[690] Один із наведених нижче залишків замінюють наведеною нижче штучно закодованою амінокислотою: перед положенням 1 (тобто на N-кінці), 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 (тобто на карбоксильному кінці білка), або будь-яку їхню комбінацію (послідовність SEQ ID NO: 1 або відповідні амінокислоти послідовності SEQ ID NO: 2 чи відповідні амінокислоти іншого поліпептиду bG-CSF SEQ ID NO: 1) як описано у Прикладі 3.

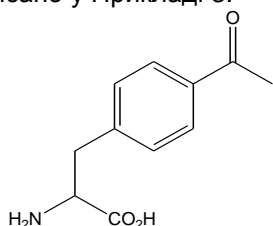


[691] Після модифікації варіант поліпептиду bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, вводять в реакцію з  $\beta$ -зв'язаним амінооксіаналогом N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc). Згаданий варіант поліпептиду bG-CSF (10 мг/мл) та амінооксисахарид (21 mM) змішують у водному 100 mM розчині натрійацетатного буфера (pH 5,5), та інкубують при температурі 37°C впродовж 7-26 год. Другий сахарид сполучають із першим ферментативним способом шляхом інкубування поліпептиду bG-CSF, сполученого із сахаридом (5 мг/мл) з UDP-галактозою (16 mM) та  $\beta$ -1,4-галацитозилтрансферазою (0,4 одиниці/мл) у 150 mM розчині гепес-буфера (pH 7,4) впродовж 48 год. при температурі навколишнього середовища (Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

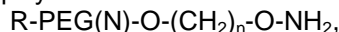
#### Приклад 11

Одержання пегільованих антагоністів поліпептиду bG-CSF

[692] Залишок, у тому числі, але без обмеження, залишок, який приймає участь у зв'язуванні рецептора bG-CSF, замінюють наведеною нижче штучно закодованою амінокислотою як описано у Прикладі 3.



[693] Після модифікації варіант поліпептиду bG-CSF, який містить карбонільвмісну амінокислоту, буде реагувати з амінооксидвмісною похідною PEG, яка має наведену нижче форму:



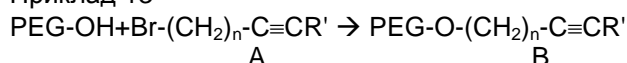
де R – метил, n – 4, N – 20,000 MW, з одержанням антагоніста поліпептиду bG-CSF, який містить штучно закодовану амінокислоту, яка модифікується похідною PEG на одній ділянці у межах поліпептиду. Сполучення, очищення та аналіз здійснюють за Прикладом 3.

#### Приклад 12

Одержання гомодимеру, гетеродимеру, гомомультимеру або гетеромультимеру поліпептиду bG-CSF, де молекули bG-CSF є безпосередньо сполученими

[694] Варіант поліпептиду bG-CSF, який містить алкінвмісну амінокислоту, може бути безпосередньо сполучений з іншим варіантом поліпептиду bG-CSF, який містить азидвмісну амінокислоту. Аналогічним чином, поліпептид bG-CSF може бути сполучений з одним або декількома іншими поліпептидами з одержанням гетеродимерів, гомомультимерів або гетеромультимерів. Сполучення, очищення та аналіз здійснюють за Прикладом 3, Прикладом 6 та Прикладом 7.

#### Приклад 13



[695] Поліалкіленгліколь (P-OH) вводять в реакцію з алкілгалогенідом (A) з одержанням простого ефіру (B). У цих сполуках n – ціле число від одного до дев'яти, а R' може бути C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкільною або гетероалкільною групою з прямим або розгалуженим, насиченим або ненасиченим ланцюгом. R' може також бути C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> насиченою або ненасиченою циклічною

алкільною або циклічною гетероалкільною, заміщеною або незаміщеною арильною або гетероарильною групою чи заміщеною або незаміщеною алкарильною (алкіл являє собою C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> насичений або ненасичений алкіл) або гетероалкарильною групою. Як правило, PEG-OH являє собою поліетиленгліколь (PEG) або монометоксиполіетиленгліколь (mPEG), який має

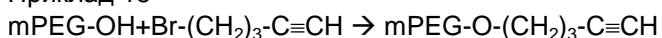
молекулярну масу від 800 Да до 40000 Да (дальтонів).

Приклад 14



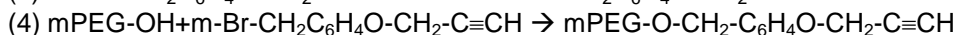
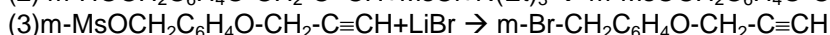
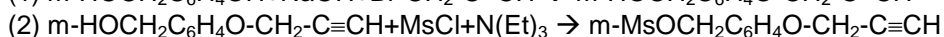
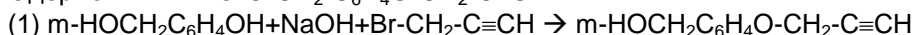
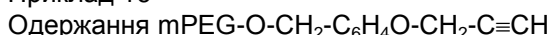
[696] mPEG-OH з молекулярною масою 20000 Да (mPEG-OH 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, компанія Sunbio) обробляли розчином NaN (12 мг, 0,5 ммоль) у THF (тетрагідрофуран) (35 мл). Після цього до згаданого розчину додавали розчин пропаргілброміду (який одержали шляхом розчинення 80 % (мас.) розчину у ксилолі (0,56 мл, 5 ммоль, 50 екв., компанія Aldrich)) та каталітичну кількість KI, і одержану суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 2 год. Після цього додавали воду (1 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. До залишку додавали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл), органічний шар відділяли, сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і об'єм зменшували до приблизно 2 мл. Цей розчин CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> краплями додавали до діетилового ефіру (150 мл). Одержаний осад збирали, промивали декількома порціями холодного діетилового ефіру, і сушили з одержанням пропаргіл-O-PEG.

Приклад 15



[697] mPEG-OH з молекулярною масою 20000 Да (mPEG-OH 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, компанія Sunbio) обробляли розчином NaN (12 мг, 0,5 ммоль) у THF (35 мл). Після цього до згаданої суміші додавали 50 екв. 5-бромо-1-пентину (0,53 мл, 5 ммоль, компанія Aldrich)) та каталітичну кількість KI. Одержану суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 16 год. Після цього додавали воду (1 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. До залишку додавали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл), органічний шар відділяли, сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і об'єм зменшували до приблизно 2 мл. Цей розчин CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> краплями додавали до діетилового ефіру (150 мл). Одержаний осад збирали, промивали декількома порціями холодного діетилового ефіру, і сушили з одержанням відповідного алкіну. У подібній реакції можна застосовувати 5-хлоро-1-пентин.

Приклад 16



[698] До розчину 3-гідроксибензилового спирту (2,4 г, 20 ммоль) у THF (50 мл) та воді (2,5 мл) спочатку додають порошковий гідроксид натрію (1,5 г, 37,5 ммоль), потім розчин пропаргілброміду, який одержали шляхом розчинення 80 % (мас.) розчину у ксилолі (3,36 мл, 30 ммоль). Реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 6 год. До згаданої суміші додавали 10 % розчин лимонної кислоти (2,5 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. Залишок екстрагували етилацетатом (3×15 мл), змішані органічні шари промивали насиченим розчином NaCl (10 мл), сушили над MgSO<sub>4</sub>, і концентрували з одержанням 3-пропаргілоксибензилового спирту.

[699] Метансульфонілхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) та триетиламін (2,8 мл, 20 ммоль) додавали до розчину сполуки 3 (2,0 г, 11,0 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при температурі 0°C, і реакційну суміш вміщували до холодильника на 16 год. Шляхом звичайної обробки одержали мезилат у вигляді масла блідо-жовтого кольору. Це масло (2,4 г, 9,2 ммоль) розчиняли у THF (20 мл), і додавали LiBr (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 1 год., після чого охолоджували до кімнатної температури. До згаданої суміші додавали воду (2,5 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. Залишок екстрагували етилацетатом (3×15 мл), змішані органічні шари промивали насиченим розчином NaCl (10 мл), сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і концентрували з одержанням необхідного броміду.

[700] mPEG-OH 20 кДа (1,0 г, 0,05 ммоль, компанія Sunbio) розчиняли у THF (20 мл), і розчин охолоджували на льодяній бані. NaN (6 мг, 0,25 ммоль) додавали з енергійним перемішуванням впродовж декількох хвилин з подальшим доданням броміду, який одержали як описано вище (2,55 г, 11,4 ммоль), та каталітичної кількості KI. Охолоджувальну баню відстороняли, одержану суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 12 год. До суміші додавали воду (1,0 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. До залишку додавали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл), органічний шар відділяли, сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і об'єм зменшували до приблизно 2 мл. Результатом



додання краплями до розчину простого ефіру (150 мл) було утворення осаду білого кольору, який збирали з одержанням похідної PEG.

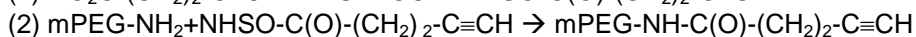
#### Приклад 17



- 5 [701] Кінцеві алкінвмісні полімери полі(етиленгліколю) можуть також бути одержані шляхом сполучення полімеру полі(етиленгліколю), який містить кінцеву функціональну групу, з реакційноздатною молекулою, яка містить алкінову функціональну групу як показано вище. n знаходиться у межах від 1 до 10. R' може бути H або невеликою алкільною групою від C<sub>1</sub> до C<sub>4</sub>.

#### Приклад 18

- 10 Одержання mPEG-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C≡CH



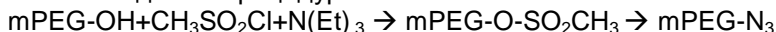
- 15 [702] 4-пентиноєву кислоту (2,943 г, 3,0 ммоль) розчиняли у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл). Додавали N-гідроксисукцинімід (3,80 г, 3,3 ммоль) та DCC (дициклогексилкарбодіімід) (4,66 г, 3,0 ммоль), і розчин перемішували при кімнатній температурі впродовж ночі. Одержаний неочищений N-гідроксисукцинімідний складний ефір 7 застосовували у подальшій реакції без додаткового очищення.

- 20 [703] mPEG-NH<sub>2</sub> з молекулярною масою 5000 Да (mPEG-NH<sub>2</sub>, 1 г, компанія Sunbio) розчиняли у THF (50 мл), і суміш охолоджували до температури 4°C. Порціями з енергійним перемішуванням додавали N-гідроксисукцинімідний складний ефір 7 (400 мг, 0,4 ммоль). Перемішування здійснювали впродовж 3 год. з одночасним нагріванням до кімнатної температури. Після цього додавали воду (2 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. До залишку додавали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл), органічний шар відділяли, сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і об'єм зменшували до приблизно 2 мл. Розчин CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> додавали краплями до ефіру (150 мл).
- 25 Одержаний осад збирали, і сушили у вакуумі.

#### Приклад 19

Одержання метансульфонату або мезилату полі(етиленгліколю)

- 30 [704] Цей приклад стосується одержання метансульфонілового складного ефіру полі(етиленгліколю), який може також називатись метансульфонатом або мезилатом полі(етиленгліколю). Відповідний тозилат і галогеніди можуть також бути одержані за допомогою подібних процедур.

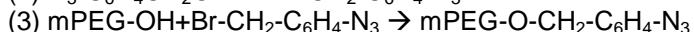
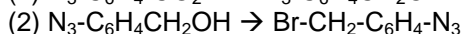
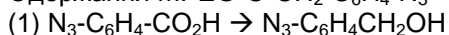


- 35 [705] Розчин mPEG-OH (MW=3400, 25 г, 10 ммоль) у 150 мл толуолу піддавали азеотропній дистиляції впродовж 2 год. у атмосфері азоту, і розчин охолоджували до кімнатної температури. До згаданого розчину додавали 40 мл сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> та 2,1 мл сухого триетиламіну (15 ммоль). Розчин охолоджували на льодяній бані, і краплями додавали 1,2 мл дистильованого метансульфонілхлориду (15 ммоль). Розчин перемішували при кімнатній температурі у атмосфері азоту впродовж ночі, і реакційну суміш різко охолоджували шляхом додання 2 мл холодного абсолютного етанолу. Суміш випарювали під вакуумом для видалення розчинників, головним чином, окрім толуолу, фільтрували, знову концентрували під вакуумом, після чого осаджували у 100 мл діетилового ефіру. Фільтрат промивали декількома порціями холодного діетилового ефіру, і сушили у вакуумі з одержанням мезилату.

- 40 [706] Мезилат (20 г, 8 ммоль) розчиняли у 75 мл THF, і розчин охолоджували до температури 4°C. До охолодженого розчину додавали азид натрію (1,56 г, 24 ммоль). Реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником у атмосфері азоту впродовж 2 год. Розчинники випарювали, і залишок розбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл). Органічну фракцію промивали розчином NaCl, і сушили над безводним MgSO<sub>4</sub>. Об'єм зменшували до 20 мл, і продукт осаджували шляхом додання до 150 мл холодного сухого ефіру.

#### Приклад 20

- 50 Одержання mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>



- 55 [707] 4-азидобензиловий спирт можна одержати за методом, опис якого наведений у патенті США № 5,998,595, включеному до цього опису шляхом посилання. Метансульфонілхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) та триетиламін (2,8 мл, 20 ммоль) додавали до розчину 4-азидобензинового спирту (1,75 г, 11,0 ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при температурі 0°C, і реакційну суміш вмішували до холодильника на 16 год. Шляхом звичайної обробки одержали мезилат у вигляді масла блідо-жовтого кольору. Це масло (9,2 ммоль) розчиняли у THF (20 мл), і додавали LiBr (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 1 год., після чого

охолоджували до кімнатної температури. До згаданої суміші додавали воду (2,5 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. Залишок екстрагували етилацетатом (3×15 мл), змішані органічні шари промивали насиченим розчином NaCl (10 мл), сушили безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і концентрували з одержанням необхідного броміду.

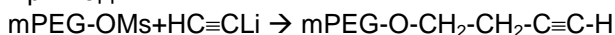
- 5 [708] mPEG-OH 20 кДа (2,0 г, 0,1 ммоль, компанія Sunbio) обробляли розчином NaN (12 мг, 0,5 ммоль) у THF (35 мл), і до суміші додавали бромід (3,32 г, 15 ммоль) разом із каталітичною кількістю KI. Одержану суміш нагрівали зі зворотним холодильником впродовж 12 год. До згаданої суміші додавали воду (1,0 мл), і розчинник видаляли під вакуумом. До залишку додавали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл), органічний шар відділяли, сушили над безводним Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і об'єм зменшували до приблизно 2 мл. Результатом додання краплями до розчину простого ефіру (150 мл) було утворення осаду, який збирали з одержанням mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>.

Приклад 21



- 15 [709] NH<sub>2</sub>-PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H (MW 3400 Да, 2,0 г) розчиняли у насиченому водному розчині NaHCO<sub>3</sub> (10 мл), і одержаний розчин охолоджували до температури 0°C. 3-азидо-1-N-гідроксисукцинімідопропіонат (5 еквівалентів) додавали з енергійним перемішуванням. Через 3 год. додавали 20 мл H<sub>2</sub>O, і суміш додатково перемішували впродовж 45 хв при кімнатній температурі. pH доводили до 3 за допомогою 0,5 н. розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і додавали NaCl до концентрації приблизно 15 % (мас.). Реакційну суміш екстрагували CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і концентрували. Після осадження холодним діетиловим ефіром продукт відфільтровували, і сушили під вакуумом з одержанням похідної омега-карбоксіязид PEG.

Приклад 22



- 25 [710] До розчину ацетиліду літію (4 екв.), який було одержано як відомо у цій галузі, і охолоджено до температури -78°C, у THF краплями додають розчин mPEG-OMs, який було розчинено у THF без енергійного перемішування. Через 3 год. реакційна суміш нагрівалась до рівня кімнатної температури, і її різко охолоджували шляхом додання 1 мл холодного бутанолу. Після цього додавали 20 мл H<sub>2</sub>O, і суміш додатково перемішували впродовж 45 хв при кімнатній температурі. pH доводили до 3 за допомогою 0,5 н. розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і додавали NaCl до концентрації приблизно 15 % (мас.). Реакційну суміш екстрагували CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і концентрували. Після осадження холодним діетиловим ефіром продукт відфільтровували, і сушили під вакуумом з одержанням 1-(бут-3-інілокси)метоксиполіетиленгліколю (mPEG).

Приклад 23

- 35 Введення азид- та ацетиленвмісних амінокислот

[711] Азид- та ацетиленвмісні амінокислоти можна вводити сайт-селективним шляхом до білків із застосуванням методів, опис яких наведений у L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin et al., Science 301:964-967 (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; та L. Wang, & P.G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11. Після введення амінокислоти здійснюють реакцію циклоприєднання з 0,01 М розчином білка у фосфатному буфері (PB), pH 8, у присутності 2 мМ розчину похідної PEG, 1 мМ розчину CuSO<sub>4</sub> та ~1 мг мідного дроту впродовж 4 год. при температурі 37 °C.

- 45 Приклад 24

Синтез п-ацетил-D, L-фенілаланіну (pAF) та похідних m-PEG-гідроксиламіну

[712] Рацемічний pAF синтезують за процедурою, яка була раніше описана у Zhang Z., Smith B.A.C., Wang L., Brock A., Cho C. & Schultz P.G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746.

- 50 [713] Для синтезування похідної m-PEG-гідроксиламіну, здійснюють наведені нижче процедури. До розчину N-t-Вос-амінооксипропіонової кислоти (0,382 г, 2,0 ммоль) та 1,3-діізопропілкарбодііміду (0,16 мл, 1,0 ммоль) у дихлорметані (DCM, 70 мл), який перемішують при кімнатній температурі (RT) впродовж 1 год., додають метоксиполіетиленгліколь-амін (m-PEG-NH<sub>2</sub>, 7,5 г, 0,25 ммоль, молекулярна маса 30 кДа, від компанії BioVectra) та діізопропілетиламін (0,1 мл, 0,5 ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі впродовж 48 год., після чого концентрують до приблизно 100 мл. Згадану суміш краплями додають до холодного простого ефіру (800 мл). t-Вос-захищений продукт випадає до осаду, його відфільтровують і промивають простим ефіром (3×100 мл). Продукт додатково очищають шляхом повторного розчинення у DCM (100 мл) з подальшим подвійним осадженням у простому ефірі (800 мл). Продукт сушать у вакуумі з одержанням 7,2 г (96 %), що підтверджується ЯМР та нінгідриновою пробою.

[714] Відщеплення захисної групи від продукту (7,0 г), який одержали вище, здійснюють у 50 % розчині 50 % TFA/DCM (40 мл) при температурі 0°C впродовж 1 год., потім при кімнатній температурі впродовж 1,5 год. Після видалення більшої частини TFA у вакуумі, сіль TFA похідної гідроксиламіну перетворюють на хлористоводневу сіль шляхом додання до залишку 4 н. розчину HCl у діоксані (1 мл). Осад розчиняють у DCM (50 мл) з подальшим повторним осадженням у простому ефірі (800 мл). Кінцевий продукт (6,8 г, 97 %) відфільтровують, промивають простим ефіром (3×100 мл), висушують під вакуумом, і зберігають у атмосфері азоту. Інші гідроксиламінові похідні PEG (5 кДа, 20 кДа) синтезують за тією самою процедурою.

#### Приклад 25

In vitro та in vivo активність пегільованого bG-CSF

[715] PEG-bG-CSF, немодифікований bG-CSF та буферний розчин вводять мишам або пацюкам. Результати показали чудову активність та подовжений період напіввиведення пегільованого bG-CSF за цим винаходом у порівнянні з немодифікованим bG-CSF, на що вказує значно підвищена кількість нейтрофілів та зсув максимальної кількості лейкоцитів у разі застосування тієї самої дози на мишу.

#### Фармакокінетичний аналіз

[716] Поліпептид bG-CSF за цим винаходом вводять мишам внутрішньовенним або підшкірним шляхами. У тварин відбирають проби крові перед або через певні періоди часу після введення дози. Плазму збирають з кожної проби і піддають радіоімуноаналізу. Період напіввиведення з плазми можна обчислювати і порівнювати між поліпептидами bG-CSF, які містять штучно закодовану амінокислоту, bG-CSF дикого типу або різними формами поліпептидів bG-CSF за цим винаходом. Аналогічним чином поліпептиди bG-CSF за цим винаходом можна вводити макакам-крабоїдам. У тварин відбирають проби крові перед або через певні періоди часу після введення дози. Плазму збирають із кожної проби, і піддають радіоімуноаналізу.

[717] Поліпептиди за цим винаходом можна вводити у тваринну модель захворювання. На тваринах можна проводити такі дослідження як дослідження великої рогатої худоби з контрольним зараженням *Pasteurella hemolytica* та дослідження великої рогатої худоби з бактеріальним зараженням молочних залоз/контрольним зараженням маститом (*Klebsiella pneumoniae*). При проведенні інших досліджень можна оцінювати заходи боротьби, кількість випадків захворювань, тривалість респіраторних захворювань великої рогатої худоби або запобігання коліформного маститу. Способи оцінювання стану здоров'я тварин, молочної продуктивності, кількості нейтрофілів та інших параметрів є відомими фахівцю у цій галузі. До інших моделей, які можна застосовувати для оцінювання поліпептидів bG-CSF за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, тваринні моделі інфекції або контакту з інфекцією, такі як хом'якова модель пневмонії (*Pseudomonas aeruginosa*), пацюча модель пієлонефриту (*Candida albicans*), моделі, в яких використовують новонароджених лошат, та моделі, в яких використовують поросят на дорощуванні. Деякі із цих моделей описані у патенті США № 5,849,883 та у WO 89/10932. Моделі, подібні до згаданих, є відомими фахівцям у цій галузі.

[718] <sup>3</sup>H-тимідиновий аналіз. <sup>3</sup>H-тимідиновий аналіз здійснюють за стандартними методами. Кістковий мозок одержують від умертвлених мишей-самиць лінії Balb C або від інших тварин. Клітини кісткового мозку впродовж нетривалого періоду часу суспендують, центрифугують, і повторно суспендують у ростовому живильному середовищі. До кожної лунки 96-лункового титраційного мікропланшета вносять 160 мкл аліквоту, яка містить приблизно 10000 клітин. До кожної лунки додають зразки очищеного аналога bG-CSF (який одержують, як описано вище) та інкубують впродовж 68 год. До лунок додають мічений тритієм тимідин, і додатково інкубують впродовж 5 год. Після завершення п'ятигодинної інкубації клітини збирають, фільтрують, і ретельно промивають. Фільтри вносять до флакона, який вміщує сцинтиляційну рідину. Визначають рівень бета-випромінювання (сцинтиляційний лічильник LKB Betaplate). Стандарти та аналоги піддають потрійному аналізу; зразки, показники яких виявляються значно вище або нижче стандартної кривої, піддають повторному аналізу з відповідним розведенням. Результати представляють як усереднене значення потрійних аналогових даних у зіставленні з незмінними стандартними результатами для bG-CSF.

[719] Індукцію проліферації клітин людського кісткового мозку аналізують на основі підвищеного включення <sup>3</sup>H-тимідину. Людський кістковий мозок від здорових донорів розділяють на фракції у градієнті густини Ficoll-Huраque (1,077 г/мл, компанія Pharmacia), і клітини з низьким рівнем густини суспендують у середовищі Іскова (компанія GIBCO), яке містить 10 % сироватки зародка великої рогатої худоби та розчин Glutamine pen-strep. Після цього 2×10<sup>4</sup> клітин людського кісткового мозку інкубують із контрольним середовищем або з bG-CSF з

рекомбінантних *E. coli* у 96-лункових планшетах із плоским дном при температурі 37°C у атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> впродовж 2 днів. Зразки аналізують із повторенням і зміною концентрації у 10000-кратному діапазоні. Після цього культури опромінюють впродовж 4 год. <sup>3</sup>H-тимідином (0,5 мкКюрі/лунка) (компанія New England Nuclear, Boston, штат Массачусетс). Поглинання <sup>3</sup>H-тимідину визначають як описано у Venuta, et al., Blood, 61, 781 (1983).

[720] Індукція диференціації WEHI-3B D<sup>+</sup>. Здатність поліпептидів bG-CSF за цим винаходом індукувати диференціацію лінії мишачих лейкозних мієломоніцитарних клітин WEHI-3B D<sup>+</sup> аналізують на напівтвердому агаровому середовищі як описано у Metcalf, Int. J. Cancer, 25, 225 (1980). Рекомбінантний bG-CSF та контрольні середовища інкубують з приблизно 60 WEHI-3B D<sup>+</sup> клітин/лунка при температурі 37°C у атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> впродовж 7 днів. Зразки аналізують на 24-лункових планшетах із плоским дном і зміною концентрації у 2000-кратному діапазоні. Колонії класифікують як недиференційовані, частково диференційовані або повністю диференційовані, і кількість клітин у колоніях підраховують за допомогою мікроскопа.

[721] Аналіз CFU-GM (гранулоцитарно-макрофагальна колонієтвірна одиниця), BFU-E (еритроїдна бурстотвірна одиниця) та CFU-GEMM (колонієтвірна одиниця гранулоцитів-еритроцитів-макрофагів-мегакаріоцитів). Встановлено, що природні ізоляти людського G-CSF та bG-CSF спричиняють проліферацію та диференціацію клітин людського кісткового мозку. Цю активність визначають аналізом CFU-GM [Broxmeyer, et al., Exp. Hematol., 5, 87, (1971)], BFU-E та CFU-GEMM [Lu, et al., Blood, 61, 250 (1983)] із застосуванням неприкріплених клітин кісткового мозку низької густини від здорових волонтерів-людей. Можна застосовувати клітини з інших джерел. Порівняння біологічної активності у CFU-GM, BFU-E та CFU-GEMM здійснюють із застосуванням 500 одиниць поліпептидів G-CSF або bG-CSF за цим винаходом.

[722] Аналіз колоній здійснюють із застосуванням неприкріплених клітин кісткового мозку низької густини. Клітини людського кісткового мозку розділяють на фракції у градієнті густини Ficoll-Нураке (густина 1,077 г/см<sup>3</sup>, компанія Pharmacia). Після цього клітини з низьким рівнем густини ресуспендують у середовищі Дульбекко, модифікованому за способом Ісков, яке містить сироватку зародка великої рогатої худоби, і вміщують для прикріплення на чашки Петрі Falcon (№ 3003, компанія Becton Dickinson, Cockeysville, штат Меріленд) на 1,5 год. при температурі 37°C.

[723] Контрольне середовище являє собою середовище Дульбекко, модифіковане за способом Ісков, плюс 10 % FCS, 0,2 мМ розчин геміну та 1 Од. рекомбінантного еритропоєтину. Для проведення аналізу CFU-GM клітини-мішені висівають із розрахунку  $1 \times 10^5$  у 1 мл 0,3 % агарового культурального середовища, яке містить доповнене середовище Маккоя 5A і 10 % інактивованої теплою сироватки зародка великої рогатої худоби. Культури оцінюють за кількістю колоній (більше 40 клітин на агрегат) та морфологією на 7 день культивування. Кількість колоній представлена як середнє  $\pm$  SEM (середня квадратична помилка середнього) за визначенням на чотирьох чашках.

[724] Для проведення аналізів BFU-E та CFU-GEMM клітини ( $1 \times 10^5$ ) додають до 1 мл суміші середовища Дульбекко, модифікованого за способом Ісков (компанія Gibco), 0,8 % метилцелюлози, 30 % сироватки зародка великої рогатої худоби та 0,05 нМ меркаптоетанолу, 0,2 мМ геміну та 1 Од. рекомбінантного еритропоєтину. Чашки інкубують у зволоженій атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> та 5 % O<sub>2</sub>. Низький тиск кисню забезпечують завдяки застосуванню відновника кисню від компанії Reming Bioinstruments (Syracuse, штат Нью-Йорк). Кількість колоній визначають після 14 днів інкубації. Кількість колоній представлена як середнє  $\pm$  SEM (середня квадратична помилка середнього) за визначенням на двох чашках.

[725] Очікується, що усі колонії, які одержали при проведенні аналізу CFU-GM, є хлорацетатестераза-позитивними та неспецифічна естераза (альфа-нафтилацетатестераза)-негативними, що відповідає колоніям, гранулоцитарним за своїм типом. Очікується, що як природні поліпептиди G-CSF, так і поліпептиди bG-CSF за цим винаходом будуть мати питому активність приблизно  $1 \times 10^8$  Од/мг чистого білка, у разі аналізування шляхом послідовних розведень при проведенні аналізу CFU-GM. Важливо звернути увагу на те, що bG-CSF за цим винаходом може бути надзвичайно чистим та вільним від інших потенційних факторів росту ссавців завдяки його продукуванню у *E. coli*. Таким чином, bG-CSF може підтримувати утворення змішаних колоній (CFU-GEMM) та BFU-E, у разі додання у присутності рекомбінантного еритропоєтину.

[726] Визначення *in vivo* періоду напіввиведення кон'югованого та некон'югованого bG-CSF та його варіантів. Застосовують пацюків-самців лінії Sprague Dawley (віком приблизно 7 тижнів). У день введення визначають масу кожної тварини. Трьом пацюкам внутрішньовенним шляхом (до хвостової вени) вводять зразки як кон'югованого, так і некон'югованого bG-CSF з розрахунку 100 мкг на кг маси тіла. Через 1 хв, 30 хв, 1 год., 2 год., 4 год. та 24 год. після ін'єкції від кожного

пацюка відбирають 500 мкл крові з CO<sub>2</sub>-анестезуванням. Проби крові зберігають при кімнатній температурі впродовж 1,5 год. з подальшим виділенням сироватки шляхом центрифугування (4°C, впродовж 5 хв). Зразки сироватки зберігають при температурі -80°C до дня проведення аналізу. Кількість активного bG-CSF у зразках сироватки визначають шляхом проведення *in vitro* аналізу активності bG-CSF після відтаювання зразків на льоду.

[727] Визначення *in vivo* біологічної активності кон'югованого та некон'югованого bG-CSF і його варіантів на здорових пацюках. Визначення *in vivo* біологічних ефектів bG-CSF на пацюках лінії Sprague Dawley (які не містять специфічних патогенів) застосовують для визначення біологічної ефективності кон'югованого та некон'югованого bG-CSF і його варіантів. У день

прибуття пацюків довільно розподіляють на групи з 6 голів. Тварини відпочивають впродовж 7 днів. За цей час вибраковують індивідуумів, які знаходяться у поганому стані або мають граничні вагові показники. Ваговий діапазон пацюків на початку періоду відпочинку становить 250-270 г.

[728] У день введення пацюки не одержують корму впродовж 16 год. з подальшою підшкірною ін'єкцією bG-CSF або його варіанта у дозі 100 мкг/кг маси тіла. Кожен зразок bG-CSF вводять групі з 6 довільно вибраних пацюків. Проби крові (300 мкл крові, стабілізованої EDTA) відбирають із хвостової вени пацюків перед введення дози та через 6 год., 12 год., 24 год., 36 год., 48 год., 72 год., 96 год., 120 год. та 144 год. після введення дози. Проби крові аналізують на наведені нижче гематологічні параметри: гемоглобін, кількість еритроцитів, гематокрит, середній об'єм клітин, середня клітинна концентрація гемоглобіну, середній клітинний гемоглобін, кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити). На основі цих даних визначають біологічну ефективність кон'югованого та некон'югованого bG-CSF і його варіантів.

[729] Визначення *in vivo* біологічної активності кон'югованого та некон'югованого bG-CSF і його варіантів у пацюків з нейтропенією, індукованою хіміотерапевтичним шляхом. Для цього аналізу застосовують пацюків лінії Sprague Dawley (які не містять специфічних патогенів). У день прибуття пацюків довільно розподіляють на групи з 6 голів. Тварини відпочивають впродовж 7 днів. За цей час вибраковують тварин, які знаходяться у поганому стані або мають граничні вагові показники. Ваговий діапазон пацюків на початку періоду відпочинку становить 250-270 г.

[730] За 24 год. перед введенням зразків bG-CSF пацюкам внутрішньоочеревинним шляхом вводять циклофосфамід (CPA) у дозі 50 мг/кг маси тіла для індукування нейтропенії, що імітує нейтропенію, спричинену протираковою хіміотерапією. У день 0 підшкірним шляхом вводять bG-CSF або його варіант у дозі 100 мкг/кг маси тіла. Кожен зразок bG-CSF вводять групі з 6 довільно вибраних пацюків. Проби крові (300 мкл крові, стабілізованої EDTA) відбирають з хвостової вени пацюків перед введення дози та через 6 год., 12 год., 24 год., 36 год., 48 год., 72 год., 96 год., 120 год., 144 год. та 168 год. після введення дози. Проби крові аналізують на наведені нижче гематологічні параметри: гемоглобін, кількість еритроцитів, гематокрит, середній об'єм клітин, середня клітинна концентрація гемоглобіну, середній клітинний гемоглобін, кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити). На основі цих даних визначають біологічну ефективність кон'югованого та некон'югованого bG-CSF і його варіантів.

#### Приклад 26

*In vivo* дослідження з визначення впливу варіанту bG-CSF-T133pAF 20K PEG на гематологічні реакції великої рогатої худоби

[731] Рекомбінантний bG-CSF, який містить одне pAF заміщення у положенні T133 (bG-CSF T133pAF-20K PEG), продукували у *E. coli*. Цей білок мав N-кінцевий метіонін (послідовність SEQ ID NO: 2), а треонін у положенні 134 послідовності SEQ ID NO: 2 був заміщений парацетилфенілаланіном. Згаданий білок був пегільований на ділянці введення pAF за допомогою 20 кДа оксіаміноПЕГ і очищений засобами катіонообмінної хроматографії до >98 % рівня чистоти. Кінцева лікарська форма містила 7,377 мг/мл пегільованого bG-CSF у буфері для одержання лікарської форми, який містив 4,26 мМ розчин NaAc; 5 % розчин сорбіту; 0,0033 % розчин твін 20; 0,565 мМ розчин NaCl; pH 4,0.

[732] Англійські або континентальні м'ясні кросбредні бички-кастрати ринкової категорії масою приблизно 150 кг були закуплені і привезені до науково-дослідної установи, де кожен із них одержав ідентифікаційну вушну бірку і де вони знаходились впродовж 7-денного періоду акліматизації перед початком дослідження. Тваринам не вводили антибіотики і вакцини ні під час закупки, ні впродовж періоду акліматизації. Під час проведення дослідження тваринам одночасно не вводили жодних лікарських препаратів. Тварин утримували у загонах із бетонним

щільним полом при температурі навколишнього середовища. Тварин годували *ad libitum* один раз на добу повним гранульованим раціоном (Rumilab® 5508).

[733] Дослідження проводили за рандомізованим повноблочним планом, де телята були блоковані у боксах. До складу експериментальної та негативної контрольної (буфер для лікарської форми без білка) груп входило дванадцять тварин (6 тварин на групу). Тварин доволіно розподіляли до блоків та обробок у межах блоків.

[734] У день -1 телят оглядав ветеринарний лікар на клінічні ознаки захворювання. Огляд включав визначення частоти пульсу, дихання, ректальної температури, а також загального стану. Визначали масу тіла, ректальну температуру, і для гематологічного оцінювання відбирали проби крові, оброблені антикоагулянтом (проби крові перед проведенням експериментальних обробок). Для проведення досліджень відбирали тварин певного вагового діапазону з нормальними гематологічними профілями (на основі довідкових літературних даних) та без клінічних ознак захворювання.

[735] У день 0 телятам робили одноразову підшкірну ін'єкцію пегільованого bG-CSF T133pAF (40 мкг/кг) або буфера для лікарської форми (1 мл/125 кг). Ін'єкції робили на передлопатковій ділянці з лівого боку шиї.

[736] Проби цільної венозної крові (~30 мл) збирали у стерильні пробірки з EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) для визначення абсолютного вмісту лейкоцитів або з ACD (кисла цитрат-декстроза) для визначення абсолютного вмісту нейтрофілів. Абсолютний вміст лейкоцитів визначали за допомогою аналізатора крові Beckman Coulter ACT<sub>10</sub><sup>™</sup>. Визначення абсолютного вмісту нейтрофілів (ANC) здійснювали шляхом протоковцитометричного визначення відсотка нейтрофілів у пробах цільної крові, забарвлених CD45, із застосуванням біоаналізатора Becton Dickinson FACSarray<sup>™</sup>. Абсолютний вміст нейтрофілів обчислювали шляхом перемножування абсолютного вмісту лейкоцитів на відсоток нейтрофілів.

[737] Окрім проб крові, які відбирались у день -1 перед проведенням експериментальних обробок, проби крові відбирали через 4 год., 8 год. та 12 год. у день 0, через 24 год. та 36 год. після обробки і один раз на добу у дні 3-14.

[738] Результати впливу введення пегільованого bG-CSF на ANC показані на Фіг. 16. Тварини, яким вводили лише буфер для лікарської форми, демонстрували на протязі періоду проведення досліджень відносно постійні значення ANC. У протилежність до цього, тварини, які одержали пегільований bG-CSF, демонстрували явно виражене підвищення ANC через 8 год. після експериментальної обробки. Максимальні значення ANC (приблизно у 10 разів більші за рівні перед проведенням експериментальної обробки) спостерігали через 72 год. після обробки. Абсолютний вміст нейтрофілів знизився приблизно до 4-5-кратного у порівнянні з рівнем до проведення експериментальної обробки на день 5 після обробки і залишався на цьому рівні до дня 10. До дня 11-14 значення додатково знизились до приблизно 3,5-кратних, порівняно з рівнем перед експериментальною обробкою.

[739] Ці результати вказують на те, що сайтспецифічне пегілування bG-CSF у положенні T133 надає нам можливість одержання сильнодіючої кровотворної активності, які зберігається впродовж щонайменше двох тижнів у телят, які одержали одноразову ін'єкцію білка.

#### Приклад 27

Узагальнення даних гематологічних досліджень із пегільованим варіантом bG-CSF T-133

[740] *In vivo* дослідження провели з метою визначення впливу варіанту bG-CSF-T133pAF 20K PEG на гематологічні реакції великої рогатої худоби.

[741] Рекombінантний bG-CSF, який містить одне pAF заміщення у положенні T133, продукували у *E. coli*. Згаданий білок був пегільованим на ділянці введення pAF за допомогою 20 кДа оксіаміноПЕГ і очищеним засобами високоефективної рідинної гель-хроматографії за розміром молекул до >98 % рівня чистоти. Кінцева лікарська форма містила 7,377 мг/мл пегільованого bG-CSF у буфері для одержання лікарської форми, який містив 4,26 мМ розчин NaAc; 5 % розчин сорбіту; 0,0033 % розчин твін 20; 0,565 мМ розчин NaCl; pH 4,0.

[742] Англійські або континентальні м'ясні кросбредні бички-кастрати ринкової категорії масою приблизно 150 кг були закуплені і привезені до науково-дослідної установи, де кожен із них одержав ідентифікаційну вушну бірку і де вони знаходились впродовж 7-денного періоду акліматизації перед початком дослідження. Тваринам не вводили антибіотики і вакцини ні під час закупки, ні впродовж періоду акліматизації. Під час проведення дослідження тваринам одночасно не вводили будь-яких лікарських препаратів. Тварин утримували у загонах з бетонним щільним полом при температурі навколишнього середовища. Тварин годували *ad libitum* один раз на добу повним гранульованим раціоном (Rumilab® 5508).

[743] Дослідження проводили за рандомізованим повноблочним планом, де телята були блоковані у боксах. До складу експериментальної та негативної контрольної (буфер для

лікарської форми без білка) груп входило дванадцять тварин (6 тварин на групу). Тварин доволіно розподіляли до блоків та обробок у межах блоків.

[744] У день -1 телят оглядав ветеринарний лікар на клінічні ознаки захворювання. Огляд включав визначення частоти пульсу, дихання, ректальної температури, а також загального стану. Визначали масу тіла, ректальну температуру, і для гематологічного оцінювання відбирали проби крові, оброблені антикоагулянтном (проби крові перед проведенням експериментальних обробок). Для проведення досліджень відбирали тварин певного вагового діапазону з нормальними гематологічними профілями (на основі довідкових літературних даних) та без клінічних ознак захворювання.

[745] У день 0 телятам робили одноразову підшкірну ін'єкцію пегільованого bG-CSF (40 мкг/кг) або буфера для лікарської форми (1 мл/125 кг). Ін'єкції робили на передлопатковій ділянці з лівого боку шиї.

[746] Проби цільної венозної крові (~30 мл) збирали до стерильних пробірок з EDTA (етиленадіамінтетраоцтова кислота) для визначення абсолютного вмісту лейкоцитів або з ACD (кисла цитрат-декстроза) для визначення абсолютного вмісту нейтрофілів. Абсолютний вміст лейкоцитів визначали із застосуванням аналізатора крові Beckman Coulter ACT<sub>10</sub><sup>™</sup>. Визначення абсолютного вмісту нейтрофілів (ANC) здійснювали шляхом протоковиметричного визначення відсотка нейтрофілів у пробах цільної крові, забарвлених CD45, за допомогою біоаналізатора Becton Dickinson FACSarray<sup>™</sup>. Абсолютний вміст нейтрофілів обчислювали шляхом перемножування абсолютного вмісту лейкоцитів на відсоток нейтрофілів.

[747] Окрім проб крові, які відбирали у день -1 перед проведенням експериментальних обробок, проби крові відбирали через 4 год., 8 год. та 12 год. у день 0, через 24 год. та 36 год. після обробки і один раз на добу у дні 3-14.

[748] Результати впливу введення пегільованого bG-CSF на ANC наведені на Фіг. 17. Тварини, яким вводили лише буфер для лікарської форми, демонстрували на протязі періоду проведення досліджень відносно постійні значення ANC. У протилежність до цього тварини, які одержали пегільований bG-CSF, демонстрували явно виражене підвищення ANC через 8 год. після експериментальної обробки. Максимальні значення ANC (приблизно у 10 разів більші за рівні перед проведенням експериментальної обробки) спостерігались через 72 год. після обробки. Абсолютний вміст нейтрофілів знизився приблизно до 4-5-кратного у порівнянні з рівнем до проведення експериментальної обробки на день 5 після обробки і залишався на цьому рівні до дня 10. До дня 11-14 значення додатково знизились до приблизно 3,5-кратних у порівнянні з рівнем перед експериментальною обробкою (дивись Фіг. 17).

[749] Ці результати вказують на те, що сайтспецифічне пегілування bG-CSF у положенні T133 надає нам можливість одержання сильнодіючої кровотворної активності, яка зберігається впродовж щонайменше двох тижнів у телят, які одержали одноразову ін'єкцію білка.

[750] Зрозуміло, що приклади та варіанти здійснення, опис яких наведено, призначені лише для ілюстративних цілей, і що різні модифікації або зміни зрозумілі фахівцям у цій галузі, які ознайомились із цією заявкою, і повинні бути включені до суті та сфери дії цієї заявки та обсягу пунктів формули винаходу, що додається. Всі публікації, патенти, заявки на патенти та/або інші документи, на які у цьому описі є посилання, включені до нього у повному обсязі для усіх цілей так, якби вказівку про включення шляхом посилання для усіх цілей було зроблено по відношенню до кожної окремої публікації, патенту, заявки на патент та/або іншого документу.

#### Приклад 28

Узагальнення даних дослідження ефективності застосування пегільованого варіанту bG-CSF T-133 проти маститу

[751] Ефективність метафілактичного лікування варіантом bG-CSF-T133pAF 20K PEG природних запальних інфекцій, пов'язаних із ключовими маститними патогенами, визначали на моделі індукованої маститної інфекції.

[752] Рекомбінантний bG-CSF, який містить одне pAF заміщення у положенні T133, продукували у *E. coli*. Згаданий білок був пегільований на ділянці введення pAF за допомогою 20 кДа оксіаміноПЕГ і очищений засобами вискоєфективної рідинної гель-хроматографії за розміром молекул. Кінцева лікарська форма містила пегільований bG-CSF у буфері для одержання лікарської форми, який містив 10 мМ розчин NaAc; 5 % розчин сорбіту та 0,0033 % розчин твін 20 при рН 4,0.

[753] Передродових корів голштино-фризської породи, які повторно народжують, вагою приблизно 600-800 кг, вибирають з промислової череди. Впродовж 30 днів, які передують залученню до досліджень, корів не піддають антибактеріальним обробкам. Тварини одержували відповідний раціон для сухостійних корів перед отеленням і перехідний раціон, розпочинаючи з дня отелення і впродовж періоду проведення досліджень. Тварини мали доступ ad libitum до

свіжої питної води. Виконувались повсякденні звичайні хазяйські технологічні операції, і корів видоювали двічі на день.

[754] Здорових корів залучали до дослідження приблизно за сім днів до гаданої дати отелення, виходячи з даних племінного обліку та оцінки їх готовності до отелення на думку чередника. Корів розподіляли до досліджуваних груп за повністю рандомізованою схемою. Кожна експериментальна група складалась приблизно з п'ятдесяти корів.

[755] Корови одержували стерильний фізіологічний розчин (негативний контроль) або щоденні ін'єкції (від дня -7 до дня 6) непегільованого bG-CSF-T133pAF чи різні дози варіанта bG-CSF-T133pAF 20K PEG у день залучення до досліджень та у день отелення. Експериментальні обробки здійснювали шляхом підшкірної ін'єкції у передлопаткову ділянку шиї.

[756] Тварин оглядали на клінічні ознаки маститу під час кожного доїння у дні 0-28 індивідуумом, який не мав інформації стосовно досліджуваних груп. Специфічне спостереження включало виставляння клінічної оцінки у балах зовнішньому вигляду молока та стану молочної залози. У разі виявлення будь-якого відхилення від норми, уражену(-і) чверть(-і) піддавали каліфорнійському маститному тесту з реєстрацією ректальної температури тварини. Будь-яку тварину, яка загинула під час проведення досліджень, піддавали аутопсії для визначення причини загибелі, якщо це було можливим.

[757] Удій молока реєстрували під час кожного доїння у дні 0-28, і змішані зразки молока збирали зі здорових чвертей у дні 3, 5, 7 та 10 для проведення аналізу складу молока з визначенням, у тому числі: кількості соматичних клітин, молочного жиру, молочного білка, лактози та твердих речовин. Збирали також додаткові зразки молока з чвертей, які демонстрували клінічні відхилення від норми для ідентифікації бактеріальних патогенів.

[758] Дані стосовно відсотків народження живих телят та показники запліднення при першому осіменінні з подальшим повторним осіменінням шляхом штучного запліднення збирали для усіх корів, які були включені до дослідження, для визначення впливу експериментальних обробок на репродуктивне здоров'я. Реєстрували також дані щоденних спостережень за станом здоров'я усіх телят впродовж перших 30 днів їхнього життя, і усі відхилення від норми документували для визначення впливу обробок досліджуваним засобом на стан здоров'я телят.

[759] Ефективність визначали шляхом порівняння коефіцієнтів захворюваності між експериментальними групами як корів, так і окремих чвертей. Інші кінцеві точки включали оцінку впливу експериментальних обробок на коефіцієнт смертності, молочну продуктивність, склад молока та показники запліднення після першого осіменіння.

[760] Дані щодо впливу різних обробок досліджуваним засобом на кількість випадків клінічного маститу та смертність узагальнені у Таблиці 10.

Таблиця 10

Опис експериментальних обробок	Захворюваність	Смертність
Стерильний фізіологічний розчин (SID×2 День -7 та День 0)	26/50 (52 %)	4
bG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SID×14, День -7 – День 6)	16/49 (33 %)	6
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	6/53 (11 %)	2
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	7/52 (13 %)	3

[761] Щоденне введення доз непегільованого bG-CSF T-133 pAF значно зменшило кількість нових випадків клінічних маститних інфекцій у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин. Введення тієї або іншої дози bG-CSF T133-pAF 20K PEG значно зменшило кількість нових випадків клінічних маститних інфекцій у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин, або із щоденними введеннями непегільованого bG-CSF T133-pAF. Введення тієї або іншої дози bG-CSF T133-pAF 20K PEG забезпечило невелике кількісне зменшення коефіцієнта смертності у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин.

[762] Дані щодо впливу експериментальних обробок на добовий надій молока від здорових корів узагальнені на Фіг. 18. Рівні молочної продуктивності були однаковими для корів, яких обробляли стерильним фізіологічним розчином, непегільованим bG-CSF T133-pAF та зменшеною дозою bG-CSF T133-pAF 20K PEG. Ці тварини демонстрували підвищення надоїв



молока впродовж періоду проведення досліджень, що, як правило, спостерігається за нормальних умов впродовж першого місяця лактації. Тварини, яким вводили більшу дозу bG-CSF T133-pAF 20K PEG, демонстрували значно знижену добову молочну продуктивність у порівнянні з іншими експериментальними обробками впродовж періоду проведення досліджень.

[763] Дані щодо впливу обробок досліджуваним засобом на кількість соматичних клітин узагальнені на Фіг. 19. Тварини, яких обробляли непегільованим bG-CSF T133-pAF або bG-CSF T133 pAF 20K PEG, демонстрували кількість соматичних клітин, яка була подібною до кількості або нижчою за кількість, яка спостерігалась у контрольних тварин, яким вводили фізіологічний розчин, у дні 3, 5 та 7 після отелення. У день 10 після отелення, кількість соматичних клітин у тварин, яким вводили непегільований bG-CSF T133-pAF або bG-CSF T133 pAF 20K PEG, була значно нижчою за відповідний показник у контрольних тварин, яким вводили фізіологічний розчин, що дозволяє висунути припущення про ймовірність того, що ці обробки досліджуваним засобом могли знизити кількість випадків неклінічного маститу, на додаток до випадків клінічного маститу.

[764] Результати мікробіологічних аналізів показали, що у хворих корів спостерігався типовий набір бактеріальних патогенних мікроорганізмів, у тому числі коліформ, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp та *Bacillus* spp. Ці результати дозволяють зробити припущення про те, що введення bG-CSF T133-pAF 20K PEG було ефективним щодо зниження захворюваності по відношенню як до грампозитивних, так і до грамнегативних видів бактерій.

[765] Дані щодо впливу обробок досліджуваним засобом на народження живих телят та показники запліднення після першого осіменіння узагальнені у Таблиці 11. Значущих різниць відсотків народження живих телят між обробками досліджуваним засобом не спостерігалось, що дозволяє припустити, що обробки досліджуваним засобом не мали впливу на життєздатність телят *in utero*. Спостерігалось кількісне поліпшення показників запліднення після першого осіменіння серед тварин, яких обробляли непегільованим bG-CSF T133-pAF або bG-CSF T133 pAF 20K PEG, та контрольних тварин, яким вводили фізіологічний розчин. Ці результати дозволяють зробити припущення про те, що обробки досліджуваним засобом не чинили негативного впливу на репродуктивне здоров'я.

Таблиця 11

Опис експериментальних обробок	% народження живих телят	Показники запліднення після першого осіменіння
Стерильний фізіологічний розчин (SID×2 День -7 та День 0)	94 %	25,6 %
BG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SID×14, День -7 - День 6)	98 %	41,2 %
BG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	92 %	34,2 %
BG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	93 %	34,2 %

[766] Дані стосовно *in utero* впливу експериментальних обробок на стан здоров'я телят, народжених тваринами, які були залучені до проведення досліджень, узагальнені у Таблиці 12. Ці результати вказують на те, що жодна з обробок досліджуваним засобом не зменшила кількості випадків кишкових або респіраторних захворювань у порівнянні з тваринами, яким вводили фізіологічний розчин, впродовж перших тридцяти днів життя. Однак як непегільований bG-CSF T133-pAF, так і bG-CSF T133 pAF 20K PEG значно зменшили коефіцієнт смертності у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили фізіологічний розчин. Ці результати дозволяють зробити припущення про те, що обробки досліджуваним засобом мали позитивний вплив на тяжкість захворювання.

Таблиця 12

Опис експериментальних обробок	Кількість випадків кишкових захворювань	Кількість випадків респіраторних захворювань	Смертність
Стерильний фізіологічний розчин (SID×2 День -7 та День 0)	28	1	6

Продовження таблиці 12

Опис експериментальних обробок	Кількість випадків кишкових захворювань	Кількість випадків респіраторних захворювань	Смертність
bG-CSF T133-pAF (3 мкг/кг, SID×14, День -7 - День 6)	32	1	1
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	30	2	0
BG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 мкг/кг, SID×2, День -7 та День 0)	34	2	1

## Приклад 29

bG-CSF T-133 PEGylated variant Respiratory Disease

5 [767] Узагальнення результатів дослідження ефективності

[768] Ефективність метафілактичного лікування природних респіраторних захворювань великої рогатої худоби із застосуванням різних доз варіанта bG-CSF-T133 pAF 20K PEG визначають в умовах загороди для відгодовування промислового типу.

10 [769] Рекомбінантний bG-CSF, який містить одне pAF заміщення у положенні T133, продукують у E. coli. Згаданий білок пегілюють на ділянці введення pAF за допомогою 20 кДа оксіаміноПЕГ, і очищають засобами вискоєфективної рідинної гель-хроматографії за розміром молекул. Кінцева лікарська форма містить пегільований bG-CSF у буфері для одержання лікарської форми, яка містить 10 мМ розчин NaAc; 5 % розчин сорбіту та 0,0033 % розчин твін 20 при pH 4,0.

15 [770] Англійські або континентальні м'ясні кросбредні бички-кастрати ринкової категорії масою приблизно 227 кг, які є типовими телятами-фідерами ринкової категорії, були закуплені у одному або декількох аукційних залах південно-східної частини США. Після прибуття до місця змішування, тварин у індивідуальному порядку ідентифікують та оглядає ветеринарний лікар на ознаки клінічних відхилень від норми. Реєструють також ректальну температуру, і тварин, які не

20 мають клінічних ознак захворювань і ректальна температура яких дорівнює  $\leq 104^{\circ}\text{F}$  ( $40^{\circ}\text{C}$ ), вибирають для залучення до досліджень. Перед проведенням експериментальних обробок відбирають проби крові для визначення повної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули.

[771] Тварин довільно розподіляють на досліджувані групи як представлено у Таблиці 13.

Таблиця 13

Експериментальна обробка	Схема приймання лікарського засобу	Кількість тварин
1) Стерильний фізіологічний розчин	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

25

[772] Стерильний фізіологічний розчин або bG-CSF-T133 pAF 20K PEG вводять шляхом підшкірної ін'єкції на передлопатковій ділянці шиї.

30 [773] Наступного ранку телят завантажують на вантажівки і перевозять приблизно на 1400 миль до загороди для відгодовування промислового типу у північній частині штату Колорадо. Після прибуття телят розвантажують до загород для новоприбулих тварин і надають їм доступ до корму та води. Через чотири години після прибуття тварин переганяють до підготовчої ділянки, де їх зважують, і у перших десяти телят, призначених до кожної досліджуваної групи, відбирають проби крові для визначення повної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули. Ці дані застосовують на підтвердження того, що тварини реагують на обробку досліджуваним

35 засобом, про що свідчить зростання абсолютної кількості нейтрофілів. Телят довільно розподіляють до дослідних загонів, у кожному з яких знаходиться по п'ять тварин з кожної досліджуваної групи (у загальній кількості 20 тварин на загін).

40 [774] За телятами впродовж 14 днів після прибуття щоденне спостереження для виявлення клінічних ознак захворювання веде ветеринарний лікар, який не має інформації стосовно призначення обробок досліджуваним засобом. Стан здоров'я кожної тварини оцінюють у балах від 0 (здорова) до 4 (вмираюча). Тварин з оцінкою стану здоров'я  $>0$  переводять до підготовчої

ділянки, де реєструють їх ректальну температуру. Тварин з оцінкою стану здоров'я  $>0$  і ректальною температурою  $\geq 104^{\circ}$  ( $40^{\circ}\text{C}$ ) відносять до категорії хворих, повертають до відповідного дослідного загону і лікують схваленим антибіотиком. Ідентифікаційні номери тварин, які загинули у період проведення досліджень, реєструють, і загиблу тварину розтинають для визначення причини смерті.

[775] Головною кінцевою точкою для визначення ефективності є відносні коефіцієнти захворюваності між експериментальними групами. Другорядними кінцевими точками для визначення ефективності є коефіцієнти смертності, середньодобовий приріст ваги та середньодобова оцінка стану здоров'я для кожної досліджуваної групи.

[776] Зрозуміло, що приклади та варіанти здійснення, опис яких наведено, призначені лише для ілюстративних цілей, і що різні модифікації або зміни у цих варіантах здійснення зрозумілі фахівцям у цій галузі, які ознайомилися з цим винаходом, і ці модифікації або зміни повинні бути включені до суті та сфери дії цієї заявки та обсягу пунктів формули винаходу, яка додається. Всі публікації, патенти, заявки на патенти та/або інші документи, на які у цьому описі є посилання, включені до нього у повному обсязі для усіх цілей так, якби вказівку про включення шляхом посилання для усіх цілей було зроблено по відношенню до кожної окремої публікації, патенту, заявки на патент та/або іншого документу.

SEQ ID #	Тип і назва послідовності	Послідовність
1	Амінокислотна послідовність бичачого CSF	TPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLC AAHKLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLT SCLNQLHGGLFLYQGGLLQALAGISPELAPTLDTLQLD VTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQ RRAGGVLVASQLHRFLELAYRGLRYLAEP
2	Амінокислотна послідовність бичачого CSF метіоніном на N-кінці	MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLC CAAHKLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSSQSLQLT TSCLNQLHGGLFLYQGGLLQALAGISPELAPTLDTLQLD DVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQ QRRAGGVLVASQLHRFLELAYRGLRYLAEP
3	Нуклеотидна послідовність бичачого CSF	Actccattaggtcctgcacgtagcctgcctcaaagtttctgctgaaatgcctggagcaggtccgcaaaattc aagctgatggtgcggaactgcaggagcgtctgtgtgccgcacataaactgtgccacccggaagaactga tgctgctgcgccattcactgggaatcccacaggctcctctgtcctcgtgtagctctcaaagtctgcagctgac tcatgcctgaatcaactgcacggaggcctgttcctgtatcagggctgtgtgcaggcgctggccgggatttc cccggagctggcaccgacactggacacccctgcaactggatgaacggactttgctactaacatctggctg cagatggaagatctgggagcgccccagcagtgcaacctacacagggcgctatgccgaccttcacgtc ggcggttcagcgtcgccgggtggcggttctggtcgcaagccaactgcatcggttctggagctggcggtacc gcggtctgcgttatctggctgaaccgtaa
4	Нуклеотидна послідовність бичачого CSF метіоніном на N-кінці	Atgactccattaggtcctgcacgtagcctgcctcaaagtttctgctgaaatgcctggagcaggtccgcaaa attcaagctgatggtgcggaactgcaggagcgtctgtgtgccgcacataaactgtgccacccggaagaa ctgatgctgtcgcgccattcactgggaatcccacaggctcctctgtcctcgtgtagctctcaaagtctgcagc tgacttcatgcctgaatcaactgcacggaggcctgttcctgtatcagggctgtgtgcaggcgctggccggga ttccccggagctggcaccgacactggacacccctgcaactggatgaacggactttgctactaacatctgg ctgcagatggaagatctgggagcgccccagcagtgcaacctacacagggcgctatgccgaccttca cgctggcggttcagcgtcgccgggtggcggttctggtcgcaagccaactgcatcggttctggagctggc gtaccgcggtctgcgttatctggctgaaccgtaa

## ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Hays Putnam, Anna-Maria  
 Knudsen, Nick  
 Norman, Thea  
 Koder, Alan  
 Kraynov, Vadim  
 Ho, Lillian  
 Canning, Peter

<120> МОДИФІКОВАНІ ПОЛІПЕПТИДИ ВИЧАЧОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО  
 КОЛОНІЄСТИМУЛЮВАЛЬНОГО ФАКТОРА (G-CSF) ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> AMBX-0154.00PCT

<150> 61/083,132

<151> 2008-07-23

<160> 24

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> Bos taurus

<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

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> PRT  
<213> Bos taurus

<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 taurus

<400> 3  
actccattag gtccctgcacg tagcctgcct caaagttttc tgctgaaatg cctggagcag 60  
gtccgcaaaa ttcaagctga tgggtgcggaa ctgcaggagc gtctgtgtgc cgcacataaa 120  
ctgtgccacc cggaagaact gatgctgctg cgccattcac tgggaatccc acaggctcct 180  
ctgtcctcgt gtagctctca aagtctgcag ctgacttcat gcctgaatca actgcacgga 240  
ggcctgttcc tgtatcaggg tctgctgcag gcgctggccg ggatttcccc ggagctggca 300  
ccgacactgg acaccctgca actggatgta acggactttg ctactaacat ctggctgcag 360  
atggaagatc tgggagcggc cccagcagtg caacctacac agggcgctat gccgaccttc 420  
acgtcggcgt ttcagcgtcg cgccggtggc gttctggtcg caagccaact gcacgctttc 480  
ctggagctgg cgtaccgagg tctgcgttat ctggctgaac cgtaa 525

<210> 4  
<211> 528  
<212> ДНК  
<213> Bos taurus

<400> 4  
atgactccat taggtcctgc acgtagcctg cctcaaagtt ttctgctgaa atgcctggag 60  
caggtccgca aaattcaagc tgatggtgag gaactgcagg agcgtctgtg tgccgcacat 120

```

aaactgtgcc acccggaaga actgatgctg ctgcgccatt cactgggaat cccacaggct 180
cctctgtcct cgtgtagctc tcaaagtctg cagctgactt catgcctgaa tcaactgcac 240
ggaggcctgt tcctgtatca gggctctgctg caggcgctgg ccgggatttc cccggagctg 300
gcaccgacac tggacaccct gcaactggat gtaacggact ttgctactaa catctggctg 360
cagatggaag atctgggagc ggccccagca gtgcaaccta cacagggcgc tatgccgacc 420
ttcacgtcgg cgtttcagcg tcgcgccggt ggcgttctgg tcgcaagcca actgcatcgt 480
ttcctggagc tggcgtaccg cggctctgct tatctggctg aaccgtaa 528

<210> 5
<211> 77
<212> ДНК
<213> Methanococcus jannaschii

<400> 5
ccggcggttag ttcagcaggc cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60
tccggccccg cggacca 77

<210> 6
<211> 88
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> An optimized amber supressor tRNA

<400> 6
cccagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60
gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 7
<211> 89
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Оптимізована супресорна тРНК зсуву рамки AGGA

```

<400> 7  
 gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt 60  
 cgagggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 8  
 <211> 307  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидо-L-фенілаланіну

<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  
 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> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-бензоїл-L-фенілаланіну

<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
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

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> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргілфенілаланіну

<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

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> .PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргілфенілаланіну

&lt;400&gt; - 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

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> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення пропаргілфенілаланіну

<400> 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  
 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> 13  
 <211> 306

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

<400> 13

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

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 Asn 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  
 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> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

<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  
 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	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

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

&lt;400&gt; 15

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 Thr 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 Val 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> 16  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

<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
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

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-ацетилфенілаланіну

<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

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> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-ацетилфенілаланіну

<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

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> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-ацетилфенілаланіну

<400> 19

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 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

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> PRT

```

&lt;213&gt; Штучна

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

&lt;400&gt; 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> PRT  
<213> Штучна

<220>

<223> Аміноацил-тРНК-синтетаза для введення л-азидофенілаланіну

<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  
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 Thr 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 Tyr Tyr
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

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290             295             300

```

Arg Leu

305

<210> 22

<211> 921

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна синтетаза, яку одержали з синтетази *Methanococcus jannaschii*

<400> 22

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa ttatcagcga ggaagagtta	60
agagagggttt taaaaaaga tgaaaaatct gctgttatag gttttgaacc aagtggtaaa	120
atacatttag ggcattatct ccaataaaaa aagatgattg atttacaaaa tgctggattt	180
gatataatta tatatttggc tgatttacac gcctatttaa accagaaagg agagttggat	240
gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca	300
aaatatgttt atggaagtga acatggtctt gataaggatt atacactgaa tgtctataga	360
ttggctttta aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag	420
gatgaaaatc caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa tgggattcat	480
tatgagggcg ttgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca	540
agggagcttt taccaaaaaa ggttggttgt attcacaacc ctgtcttaac gggtttggat	600
ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa	660
gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgttga aggaaatcca	720
ataatggaga tagctaaata ctcccttgaa taccctttta ccataaaaaag gccagaaaaa	780
tttggtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag	840
gaattgcac caatggattt aaaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gatttttagag	900
ccaattagaa agagattata a	921

<210> 23

```

<211> 77
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна тРНК, яку одержали з тРНК Methanococcus jannaschii

<400> 23
ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccgс сggacca 77

<210> 24
<211> 306
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна синтетаза, яку одержали з синтетази Methanococcus jannaschii

<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

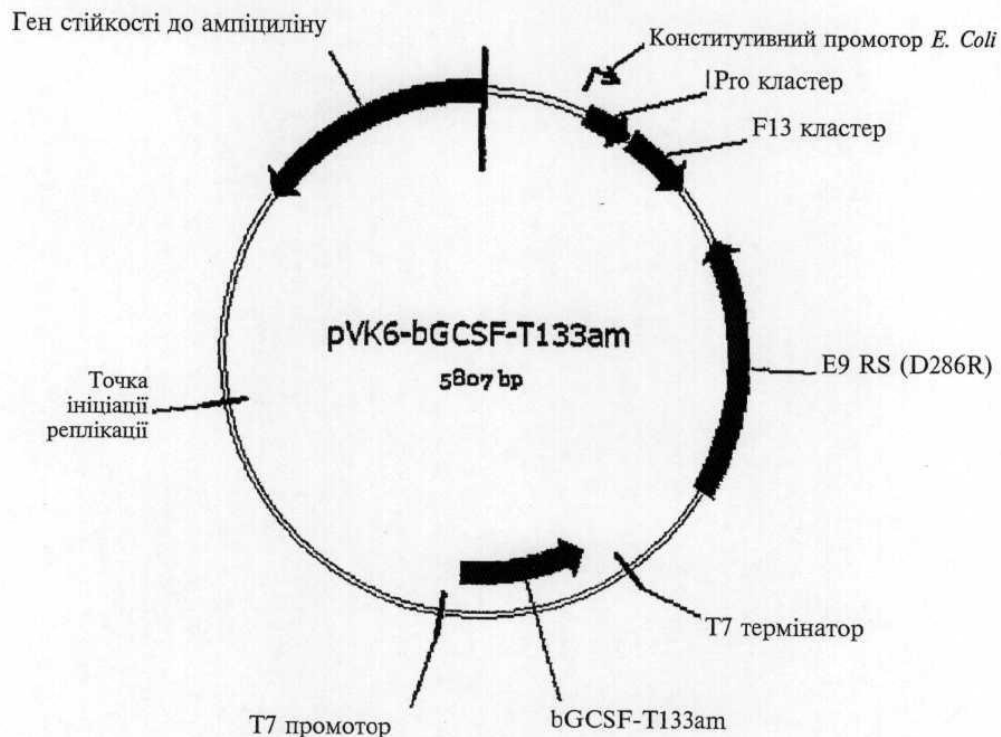
```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Поліпептид bG-CSF, який містить містить послідовність SEQ ID NO:1 або послідовність SEQ ID NO:2, де положення 133 послідовності SEQ ID NO:1 або положення 134 послідовності SEQ ID NO:2 заміщене пара-ацетилфенілаланіном, і цей поліпептид сполучений із водорозчинним полімером, який містить полі(етиленгліколеву) складову.
- 10 2. Поліпептид bG-CSF за п. 1, де згаданий водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа.
3. Поліпептид bG-CSF за п. 1, де згаданий водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа.



4. Поліпептид bG-CSF за п. 1, де згаданий водорозчинний полімер має молекулярну масу 20 кДа.
5. Ізольована нуклеїнова кислота, яка кодує поліпептид bG-CSF за п. 1.
6. Вектор, який містить ізольовану нуклеїнову кислоту за п. 5.
- 5 7. Вектор за п. 6, який додатково містить нуклеїнову кислоту, яка кодує ортогональну tPHK-синтетазу та ортогональну tPHK, специфічні для введення пара-ацетилфенілаланіну у bG-CSF.
8. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 5 або вектор за п. 6 або п. 7.
9. Клітина-хазяїн за п. 8, яка додатково містить ортогональну tPHK-синтетазу та ортогональну tPHK, специфічні для введення пара-ацетилфенілаланіну у bG-CSF.
- 10 10. Спосіб одержання поліпептиду bG-CSF, що містить штучно закодовану амінокислоту, який включає: культивування клітин-хазяїв за п. 8 за умов, що уможливають експресію поліпептиду bG-CSF; очищення поліпептиду bG-CSF; та пегілювання поліпептиду bG-CSF.
11. Композиція, яка містить поліпептид bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4 та фармацевтично прийнятний носій.
- 15 12. Поліпептид bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4 або композиція за п. 11 для застосування як фармацевтичний продукт.
13. Спосіб лікування тварини, окрім людини, яка має інфекційне захворювання, модульоване bG-CSF, який включає введення цій тварині терапевтично ефективної кількості поліпептиду bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4.
- 20 14. Спосіб за п. 13, який відрізняється тим, що твариною є велика рогата худоба.
15. Спосіб за п. 13, який відрізняється тим, що інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.
16. Спосіб запобігання інфекційному захворюванню у тварини, окрім людини, який включає введення цій тварині терапевтично ефективної кількості поліпептиду bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4.
- 25 17. Спосіб за п. 16, який відрізняється тим, що твариною є велика рогата худоба.
18. Спосіб за п. 16, який відрізняється тим, що інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.
19. Застосування поліпептиду bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4 у виготовленні фармацевтичного продукту для лікування інфекційного захворювання, модульованого bG-CSF.
- 30 20. Застосування за п. 19, причому інфекційним захворюванням є інфекційне захворювання великої рогатої худоби.
21. Застосування за п. 19, причому інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.
- 35 22. Застосування поліпептиду bG-CSF за будь-яким із пп. 1-4 у виготовленні фармацевтичного продукту для запобігання інфекційному захворюванню, модульованому bG-CSF.
23. Застосування за п. 22, причому інфекційним захворюванням є інфекційне захворювання великої рогатої худоби.
24. Застосування за п. 22, причому інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.
- 40 25. Застосування композиції за п. 11 у виготовленні фармацевтичного продукту для лікування інфекційного захворювання, модульованого bG-CSF.
26. Застосування за п. 25, причому інфекційним захворюванням є інфекційне захворювання великої рогатої худоби.
- 45 27. Застосування за п. 25, причому інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.
28. Застосування композиції за п. 11 у виготовленні фармацевтичного продукту для запобігання інфекційному захворюванню, модульованому bG-CSF.
29. Застосування за п. 28, причому інфекційним захворюванням є інфекційне захворювання великої рогатої худоби.
- 50 30. Застосування за п. 28, причому інфекційним захворюванням є мастит великої рогатої худоби.



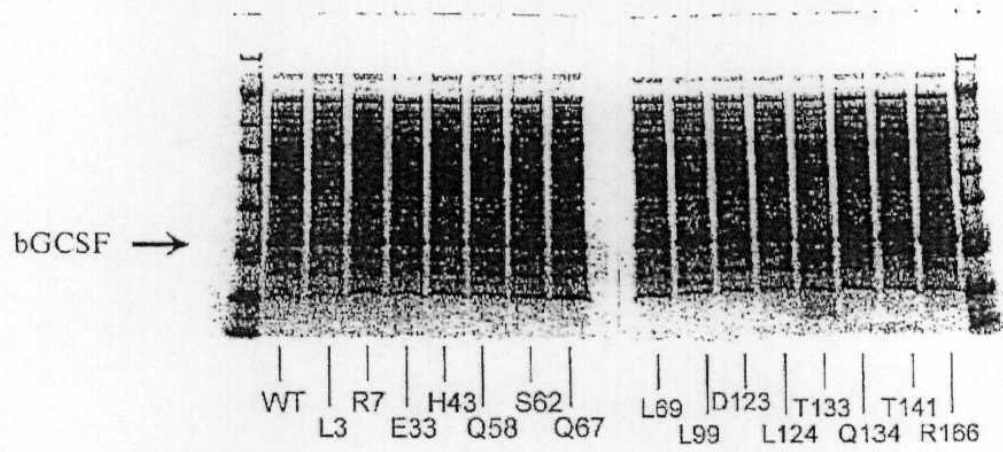
ФІГ. 1

Штам: похідна *E. coli* штаму *E. coli* K12-W3110

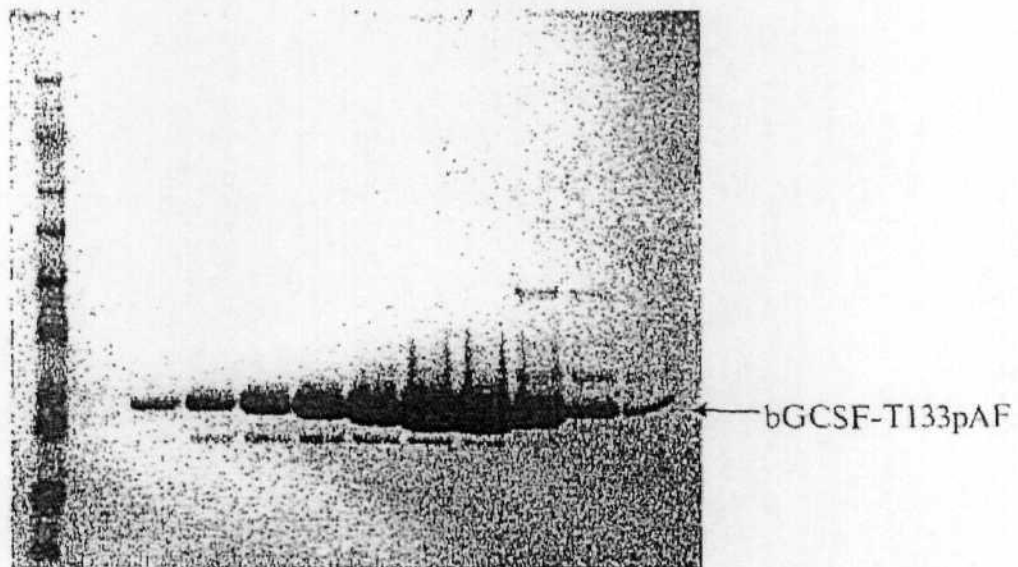
Генотип: F-1-*rph*-1 INV(*rnnD*-*rnnE*) *araB*::*gI tetA*

Генотип	Пояснення
F	хазяїн, якому бракує F'-епісоми
λ-	нелізогенний — фаг не інтегрується до хромосоми
<i>rph</i> -1	зсув рамки на <i>rph</i> (рибонуклеаза РН), що впливає на рівні експресії <i>pyrE</i> (оротатфосфорибозилтрансфераза)
INV( <i>rnnE</i> - <i>rnnD</i> )	частина хромосоми (785 т.п.н.) між генами <i>rnnE</i> та <i>rnnD</i> є інвертованою
<i>araB</i> :: <i>gI tetA</i>	ген <i>gI</i> РНК-полімерази бактеріофагу Т7 під контролем промотору <i>araB</i> . Маркером інсерції є <i>tetA</i> (стійкість до тетрацикліну)

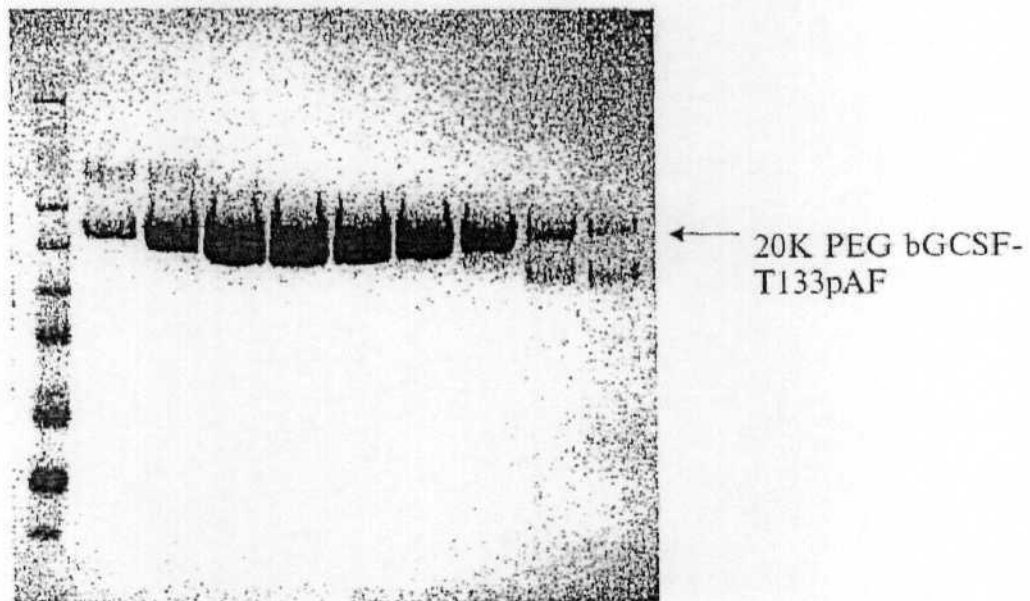
ФІГ. 2



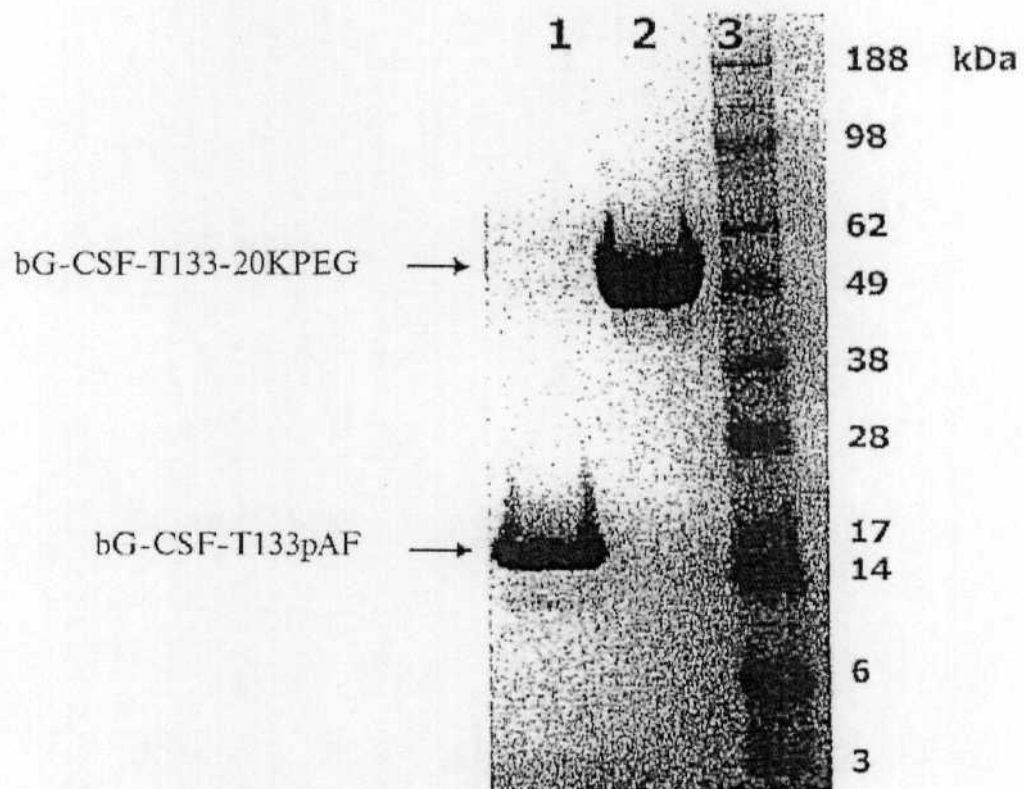
ΦΙΓ. 3



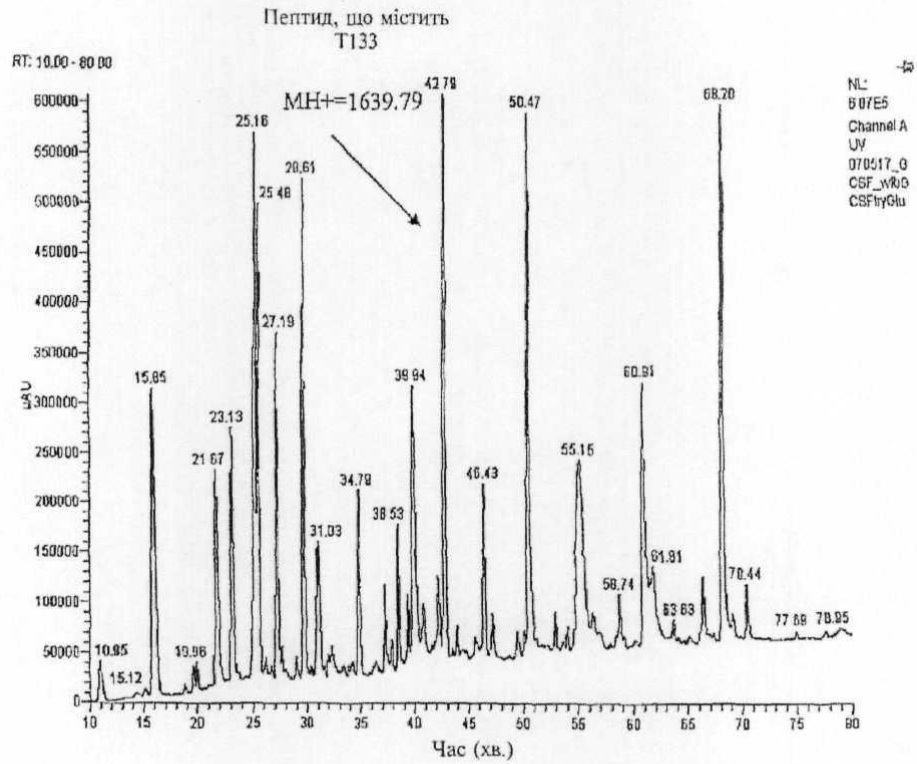
ΦΙΓ. 4



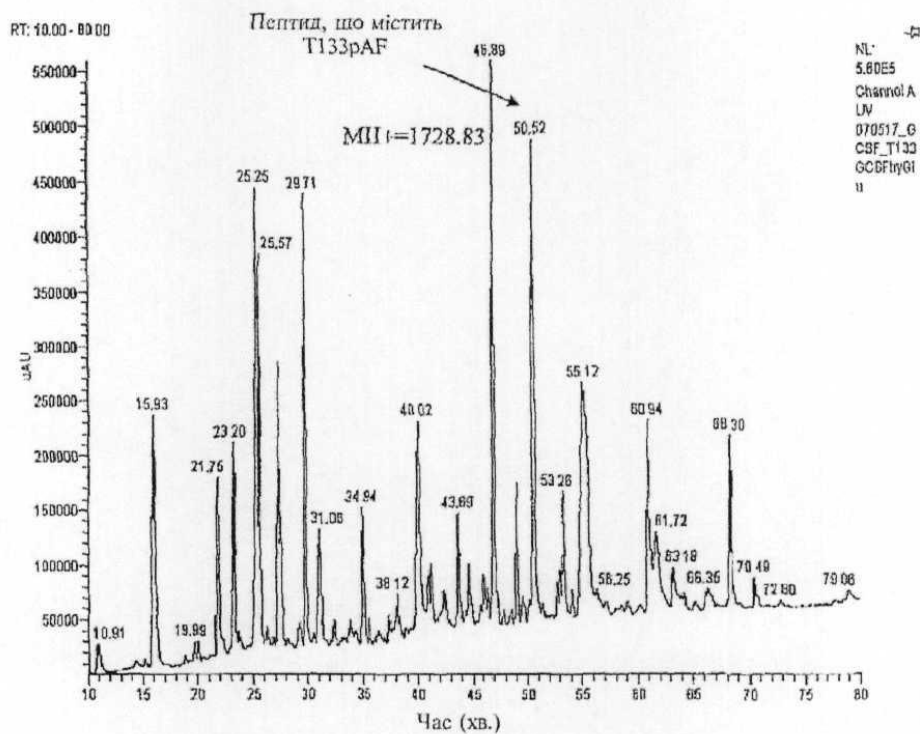
ΦΙΓ. 5



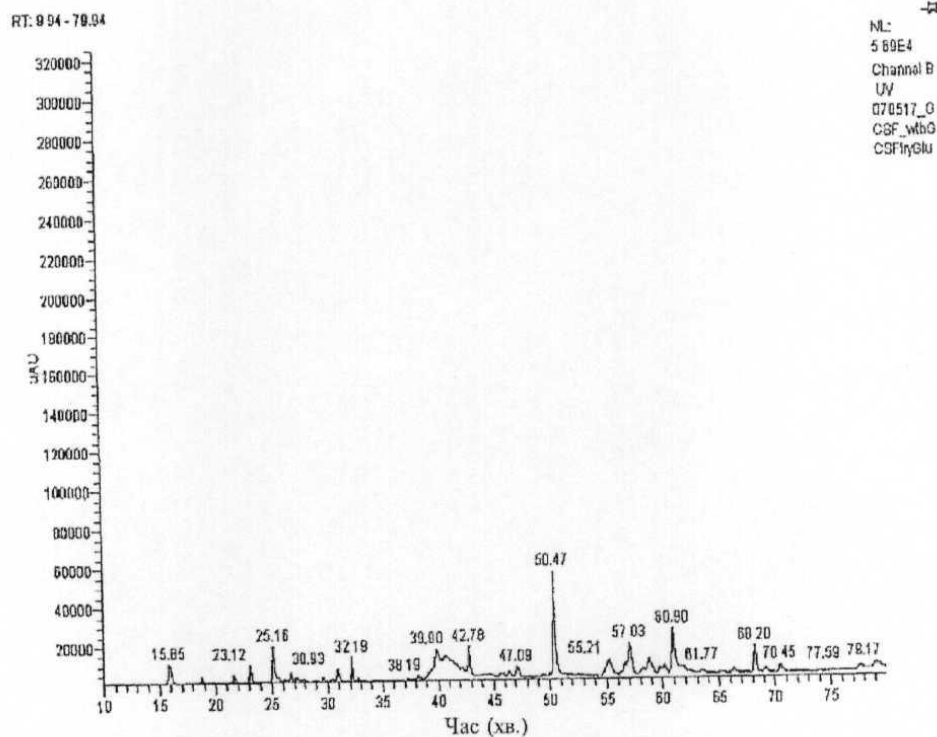
ΦΙΓ. 6



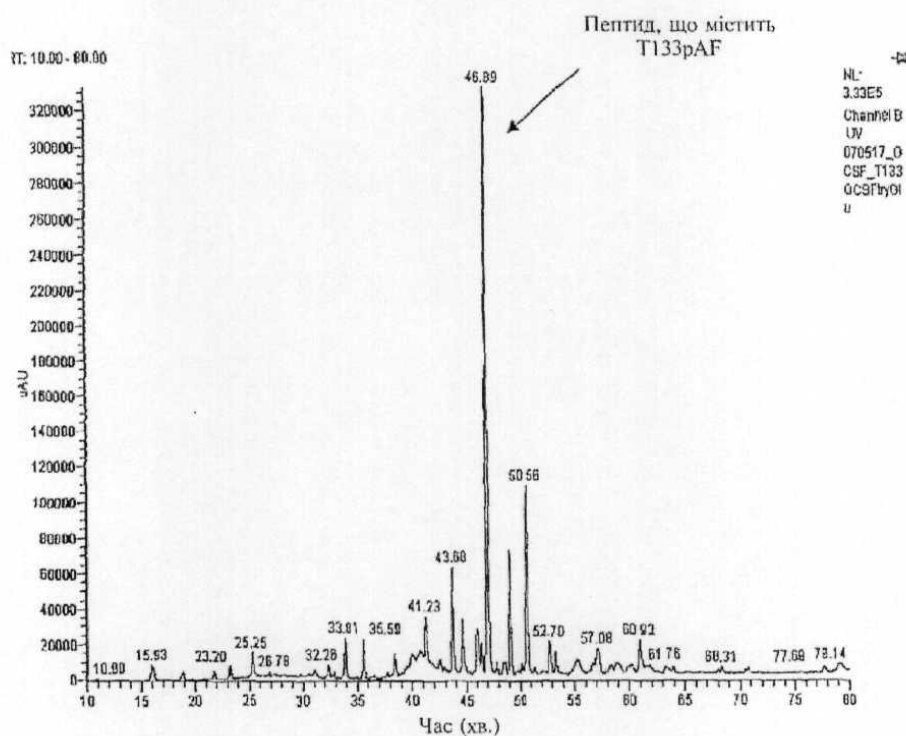
ФІГ. 7a



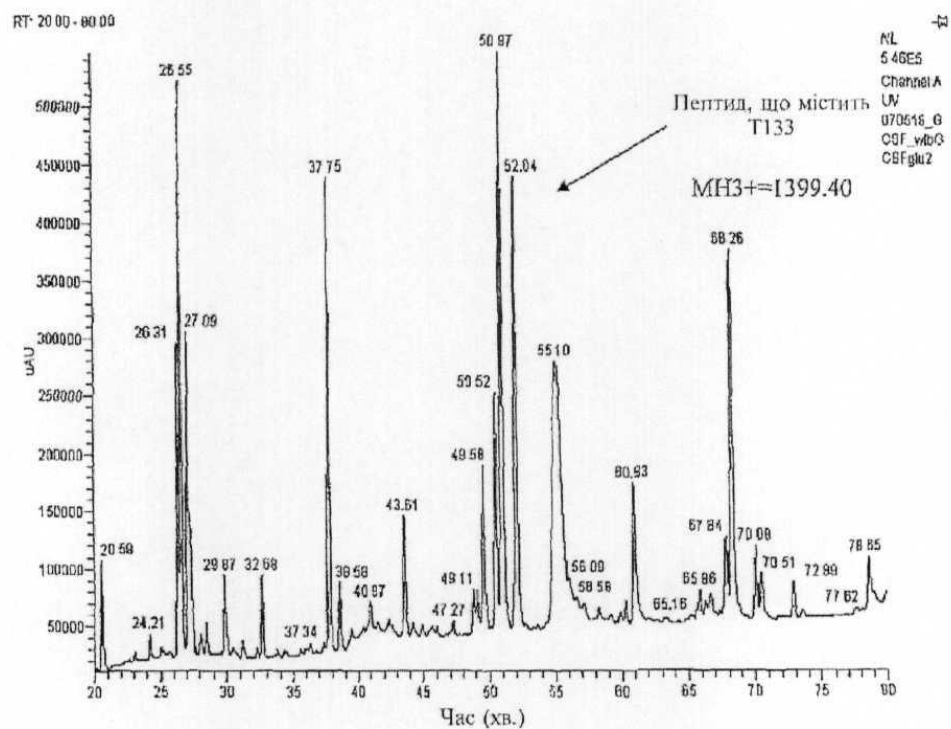
ФІГ. 7b



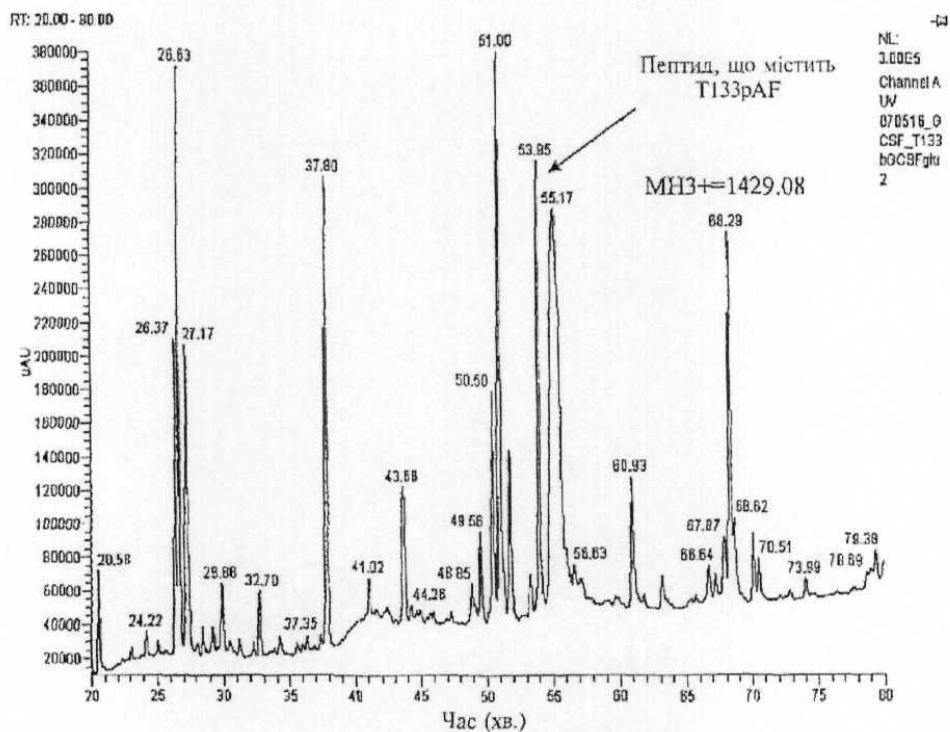
ФІГ. 8a



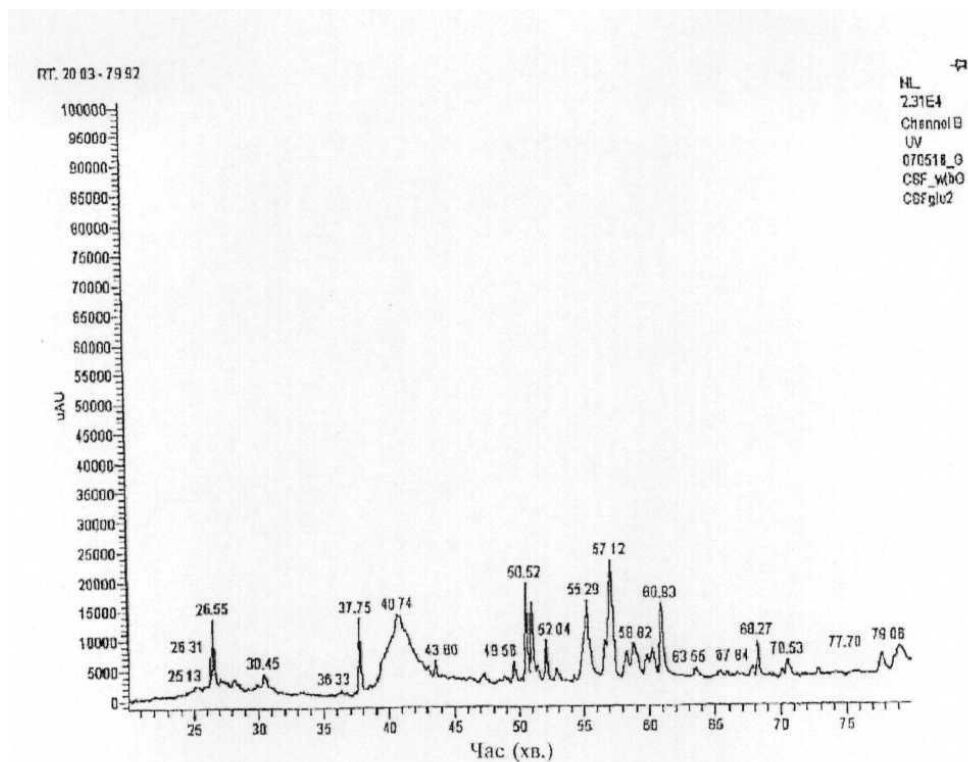
ФІГ. 8b



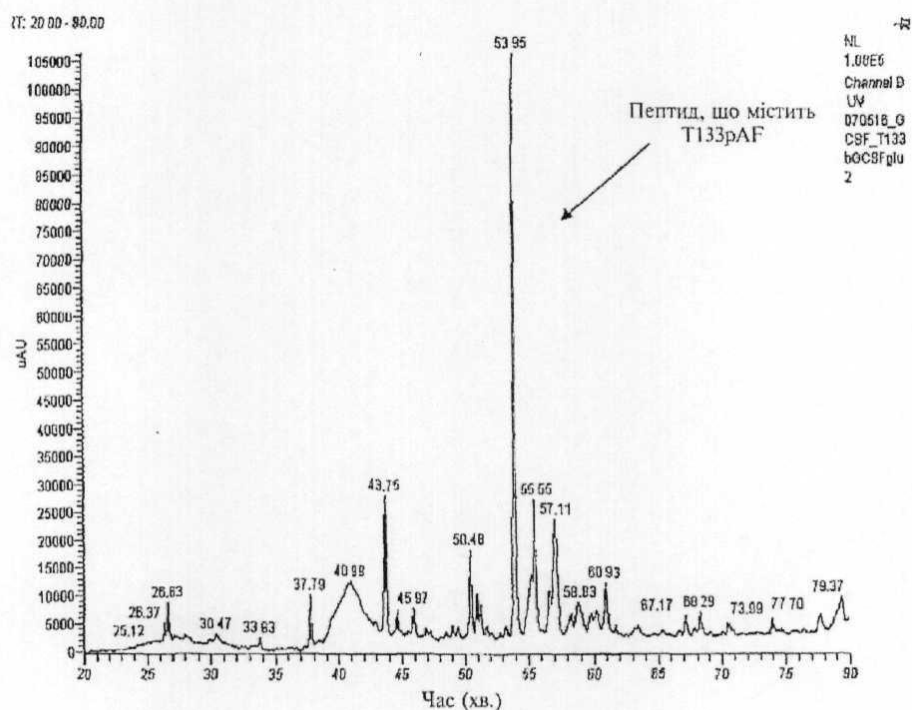
ФІГ. 9a



ФІГ. 9b

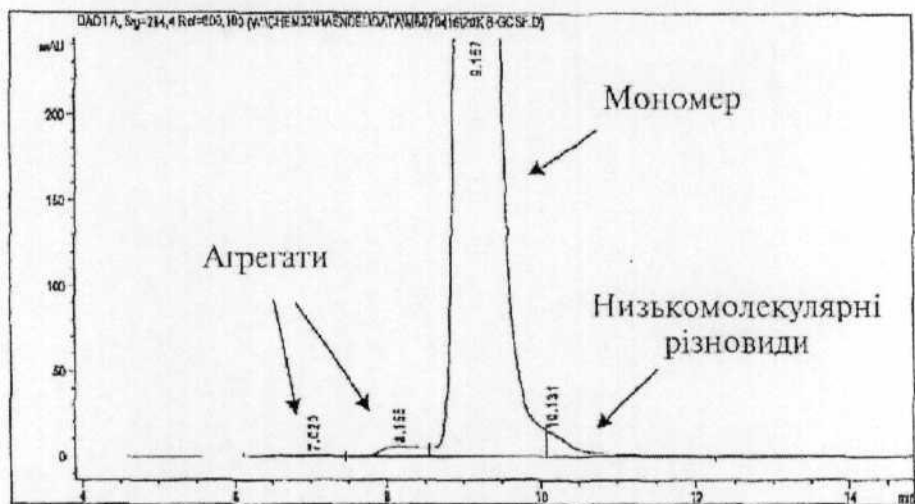


ФІГ. 10a

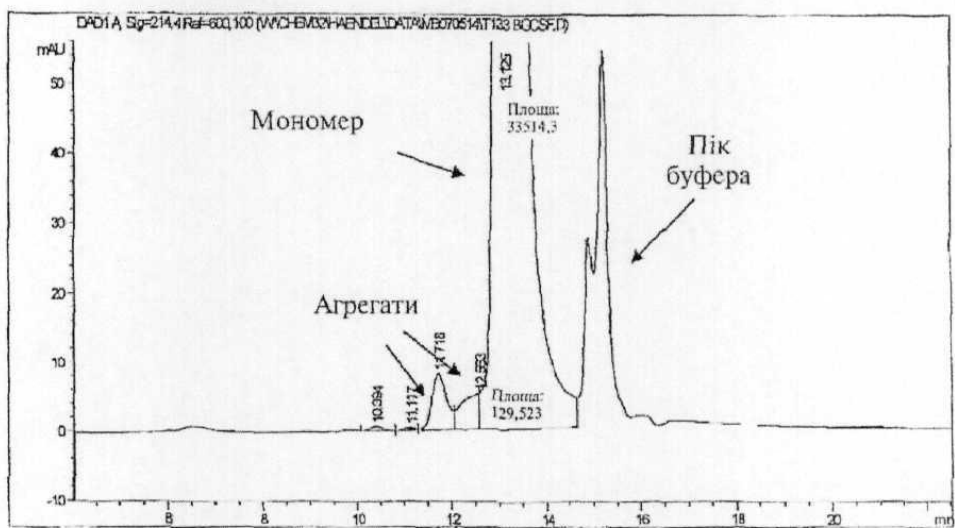


ФІГ. 10b



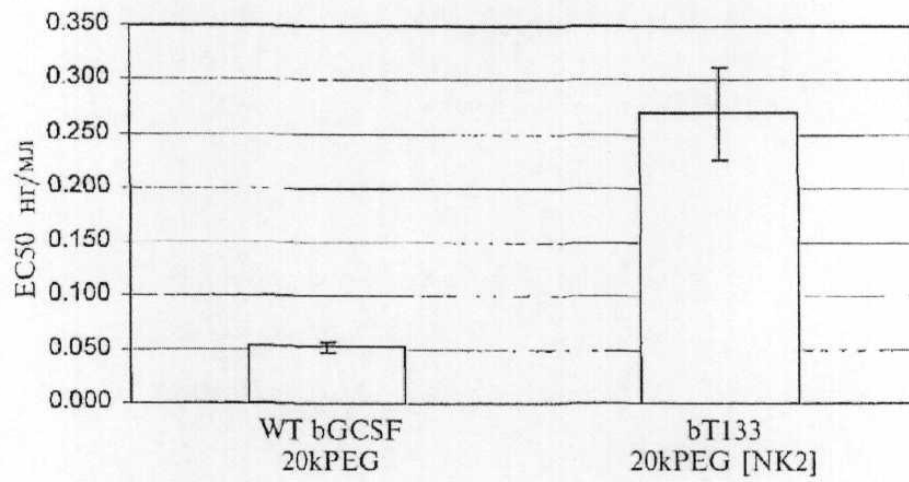


ФІГ. 11



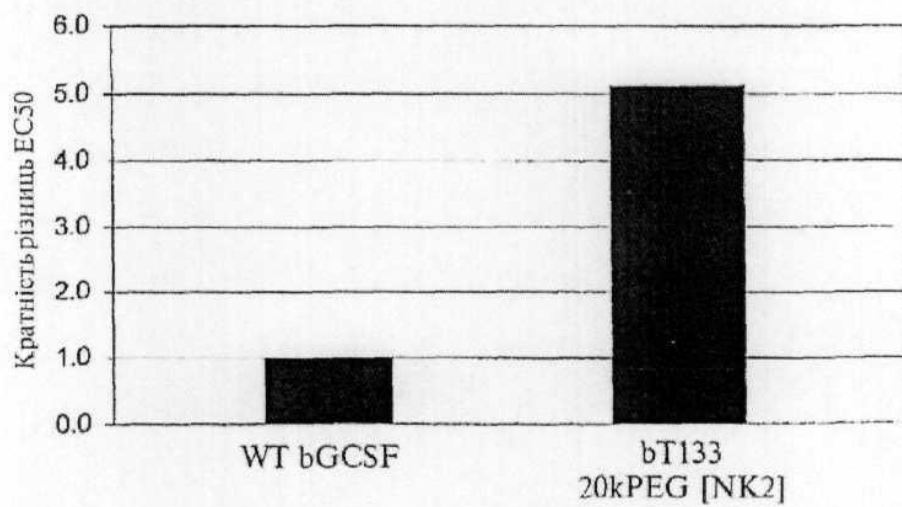
ФІГ. 12

Аналіз проліферації NFS60 - Невиправлені значення  
EC<sub>50</sub> 20К пегільованих сполук

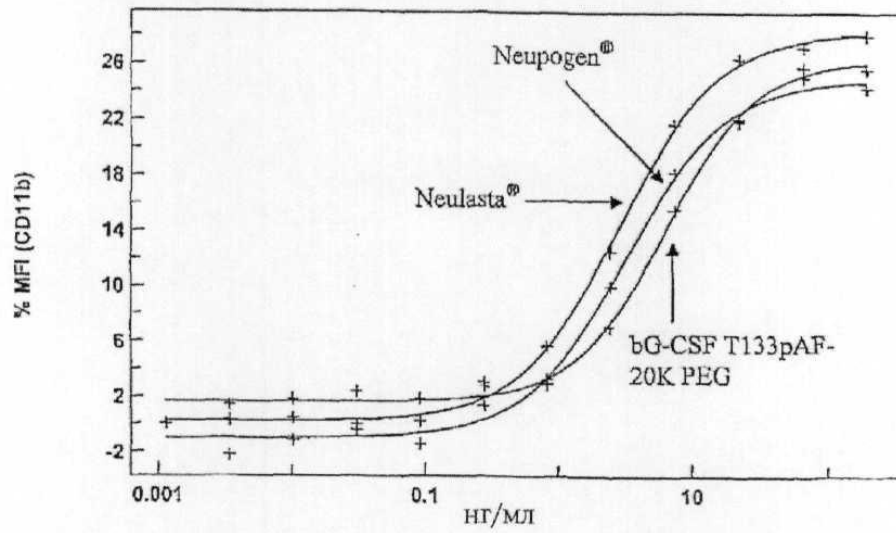


ФІГ. 13

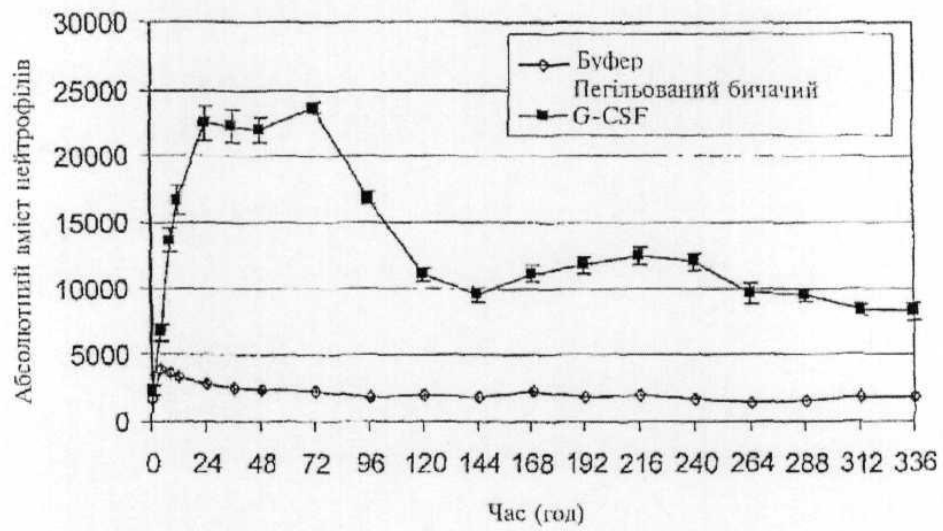
Аналіз проліферації NFS60 - Кратність різниць EC<sub>50</sub> у  
зіставленні з bG-CSF дикого типу



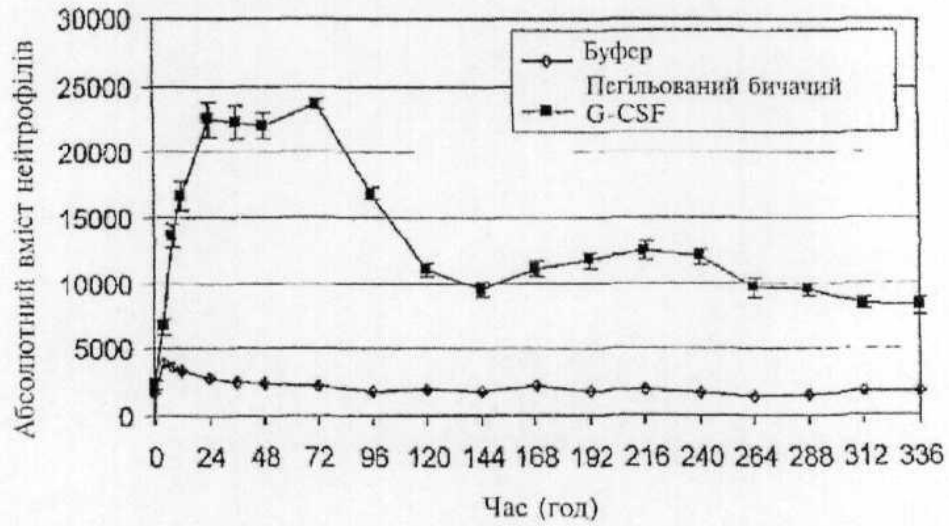
ФІГ. 14



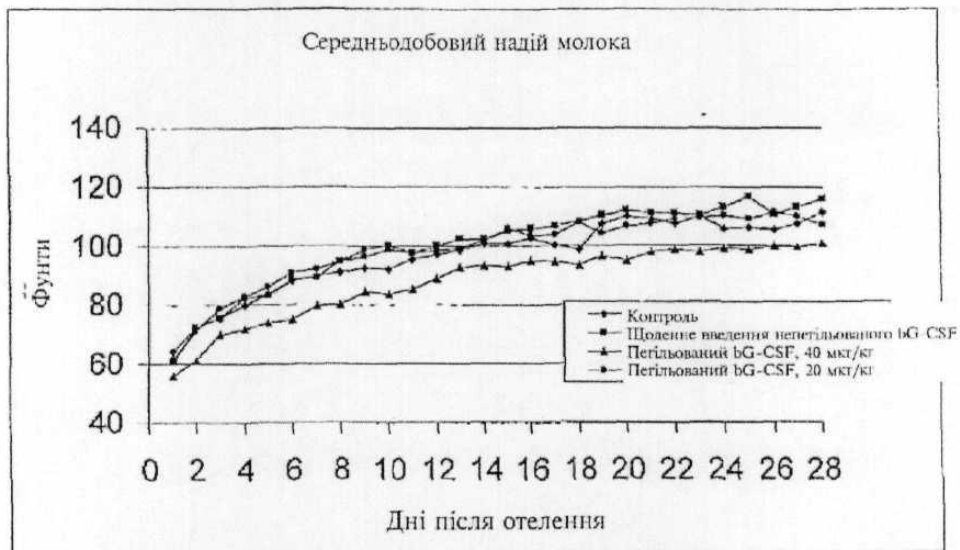
ФІГ. 15



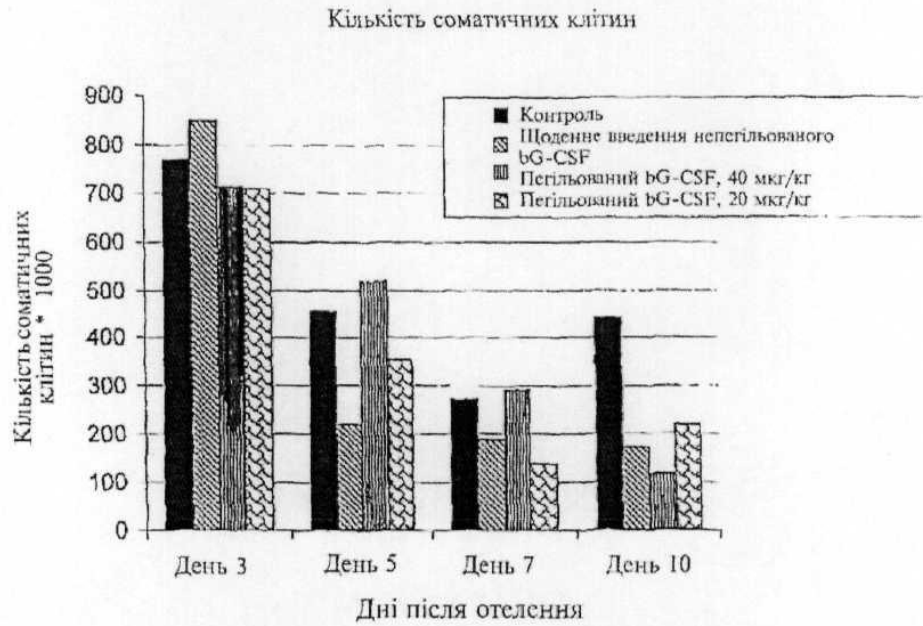
ФІГ. 16



ФІГ. 17



ФІГ. 18



ФІГ. 19

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601