

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 030886

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.10.31

(21) Номер заявки
201390254

(22) Дата подачи заявки
2011.08.17

(51) Int. Cl. C07K 14/64 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ РЕЛАКСИНА, СОДЕРЖАЩИЕ
НЕКОДИРУЕМУЮ В ПРИРОДЕ АМИНОКИСЛОТУ, СВЯЗАННУЮ С ПОЛИМЕРОМ, И
ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/374,582

(32) 2010.08.17

(33) US

(43) 2013.08.30

(86) PCT/US2011/048157

(87) WO 2012/024452 2012.02.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМБРКС, ИНК. (US)

(56) US-A-5145962
US-A1-20070004619
US-A1-20050170404
US-A1-20100075866

(72) Изобретатель:
Крайнов Вадим, Кнудсен Ник, Хевет
Амха, Де Диос Кристин, Пинкстафф
Джейсон, Салливан Лоррейн (US)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н. (RU)

(57) Предложены модифицированные полипептиды релаксина, содержащие неcodируемую в природе аминокислоту, связанную с полимером, и их применение для повышения артериальной эластичности.

030886 B1

030886 B1

030886

B1

Область техники

Данное изобретение относится к модифицированным полипептидам релаксина по меньшей мере с одной неcodируемой в природе аминокислотой.

Уровень техники

Зрелый человеческий релаксин является пептидным гормоном с массой около 6000 Да. Известно, что он отвечает за изменение репродуктивного тракта перед родами для облегчения процесса рождения. Этот белок появляется, чтобы регулировать реструктуризацию соединительных тканей в органах-мишенях для получения необходимых изменений в структуре органа во время беременности и родов. См. Hisaw, F.L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 23: 661-663 (1926); Schwabe, C., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 75: 503-570 (1977); Jmues, R., et al., Nature, 267: 544-546 (1977). A concise review of relaxin was provided by Sherwood, D. in The Physiology of Reproduction, Chapter 16, "Relaxin", Knobil, E. and Neill, I., et al. (eds.), (Raven Press Ltd., New York), pp. 585-673 (1988). Уровень циркулирующего релаксина повышен во время всех девяти месяцев беременности и быстро падает после родов.

Релаксин является преимущественно гормоном беременности, в то же время он также был обнаружен у небеременных женщин, а также у мужчин. В обзорах Bryant-Greenwood, G.D., Endocrine Reviews, 3: 62-90 (1982) and Weiss, G., Ann. Rev. Physiol., 46:43-52 (1984), а также в более недавних публикациях была показана возможность применения при лечении сердечной недостаточности.

Сердечная недостаточность определяется как неспособность сердечного насоса перекачивать кровь с эффективностью, необходимой для обеспечения метаболических потребностей тканей тела. Снижение насосной способности возникает чаще всего от потери или повреждения тканей миокарда. В результате опорожнение желудочков суппрессируется, что приводит к увеличению вентрикулярного давления наполнения, стрессу стенок желудочков и снижению сердечного выхода. Как физиологическая реакция на снижение сердечного выхода активизируются многочисленные рефлексы нейроэндокринной системы, которые вызывают системную вазоконстрикцию, симпатическую стимуляцию сердца и удержание жидкости. Хотя эти рефлекторные реакции, как правило, повышают сердечный выброс на начальном этапе, они вредны в долгосрочной перспективе. В результате увеличения периферического сопротивления увеличивается постнагрузка на сердце и увеличивается объем крови с дальнейшим увеличением давления заполнения желудочков. Эти изменения вместе с увеличением симпатической стимуляции сердца приводят к дальнейшей и часто некомпенсированной нагрузке на остальные функции миокарда.

Застойная сердечная недостаточность, которая является общей конечной точкой для многих сердечно-сосудистых заболеваний, возникает, когда сердце не в состоянии обеспечивать адекватную перфузию периферических тканей. Согласно недавним оценкам в Соединенных Штатах насчитывается приблизительно 4 миллиона человек, у которых диагностировано это заболевание, причем более 50% из этих случаев приводят к летальному исходу в течение 5 лет после постановки диагноза [Taylor, M.D. et al., Annual Reports in Med. Chem. 22, 85-94 (1987)].

Современная терапия при сердечной недостаточности, в том числе застойной сердечной недостаточности, основное внимание уделяет увеличению сердечного выброса, которая не оказывала бы чрезмерной нагрузки на миокард. Для достижения этих целей используют различные комбинации диуретиков, вазодилаторов и инотропных препаратов, чтобы уменьшить объем крови, снизить периферическое сопротивление, а также увеличить силу сердечных сокращений. Соответственно, решение клинических проблем отдельных пациентов с использованием существующей терапии зависит от баланса эффектов нескольких препаратов и ограничивается побочными реакциями на используемые препараты.

Например, диуретики снижают концентрацию калия и магния в плазме и повышают встречаемость аритмии у пациентов, получающих дигиталис. Мочегонные средства могут усиливать влияние нитратов на кровообращение через уменьшение объема жидкости и привести к снижению давления наполнения сердца, сердечного выброса и системного артериального давления.

Антагонисты α -адренергических рецепторов могут привести к заметному падению системного артериального давления, что ухудшает коронарную перфузию. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента могут оказывать подобное действие на артериальное давление и дополнительно привести к чрезмерному увеличению концентрации калия в плазме крови.

Лекарства, которые приводят к положительному инотропному эффекту, такие как дигиталис и антагонисты β -адренергических рецепторов могут спровоцировать аритмию. Кроме того, дигиталис имеет узкий терапевтический индекс, и все аналоги катехоламинов имеют тенденцию быстро терять эффективность вследствие подавления рецептора.

Таким образом, существует потребность в терапевтических агентах, которые обеспечивают физиологически интегрированные ответы расширения и артериальных, и венозных сосудов и инотропное действие на сердце и свободны от недостатков используемых в настоящее время терапевтических агентов.

Релаксин был выделен из различных видов, включая свиней, мышей, лошадей, акулу, тигров, крысы, акулы и человека, и демонстрирует, по меньшей мере, первичную и вторичную структурную гомологию в отношении инсулина и инсулиноподобного фактора роста, однако гомология между видами может быть весьма низкой. У человека релаксин в больших количествах обнаруживается в желтых телах (CL)

беременности. Однако некоторые ядра в мозге имеют рецепторы релаксина, а другие ядра содержат матричную РНК для релаксина. Несколько ядер с клетками, несущими рецепторы релаксина, находятся в области гипоталамуса.

Были идентифицированы две формы человеческих генов, (H1) и (H2). Hudson, P., et al., *Nature*, 301: 628-631 (1983); Hudson, P., et al., *The EMBO Journal*, 3: 2333-2339 (1984); и патенты США №№ 4758516 и 4871670. Было обнаружено, что только одна из форм гена, (H2), транскрибируется в CL. Остается неясным: форма (H1) экспрессируется в другом участке ткани, или же она представляет собой псевдоген. Когда синтетический релаксин человека (H2) и некоторые аналоги релаксина человека проверяли на биологическую активность, тесты выявили основную часть релаксина, необходимую для биологической активности, а также некоторых метиониновых аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность. Johnston, et al., в *Peptides: Structure and Function*, Proc. Ninth American Peptide Symposium, Deber, C.M., et al. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985).

Способы получения релаксина описаны также в патентных публикациях США № 4835251 и в рассматриваемой одновременно заявке США № 07/908766 (PCT US 90/02085) и 08/080354 (PCT US 94/0699). Способы применения релаксина в сердечно-сосудистой терапии и лечении нейродегенеративных заболеваний описаны в патентных публикациях США № 5166191 и в заявке США № 07/902637 (PCT US 92/06927). Некоторые препараты релаксина человека описаны в заявке США № 08/050745.

Рекомбинантный релаксин человека (H2) в настоящее время находится в фазе I клинических испытаний на пациентах со склеродермией. Склеродермия является заболеванием, связанным с дисбалансом в перестройке тканей, который приводит к гиперпродукции коллагена, и в конечном итоге приводит к опуханию и затвердеванию кожи (и пораженных органов). В настоящее время процедуры введения релаксина требуют постоянных и длительных инфузий.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам релаксина, необязательно модифицированным по меньшей мере одной не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В настоящем описании приведены некоторые варианты осуществления, однако следует иметь в виду, что эти варианты осуществления служат для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения, определяемого формулой изобретения.

В другом аспекте настоящего изобретения полипептиды релаксина, в которых по меньшей мере одна не кодируемая в природных условиях аминокислота присоединена по меньшей мере к одному водорастворимому полимеру.

В одном аспекте изобретение относится к способу стимулирования ангиогенеза у млекопитающего, нуждающегося в этом, путем введения терапевтически эффективного количества релаксина. В другом варианте осуществления релаксин вводят в количестве, достаточном для поддержания концентрации в сыворотке по меньшей мере приблизительно 1 нг/мл. В еще одном варианте осуществления полипептид релаксина представляет собой релаксин человека (hR2).

Настоящее изобретение относится к способам лечения лиц с пониженной растяжимостью артерий путем введения эффективного количества композиции, содержащей агонист рецептора релаксина. В предпочтительном варианте осуществления агонист рецепторов релаксина является рекомбинантным релаксином человека, например релаксином человека H2.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложен способ повышения растяжимости артерий у субъекта, причем указанный способ включает измерение общей растяжимости артерий у указанного субъекта, определение того, что указанная общая растяжимость артерий у указанного субъекта понижена по сравнению с общей растяжимостью артерий у здорового субъекта, и введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей релаксин, что обеспечивает повышение растяжимости артерий у указанного субъекта. Общая растяжимость артерий может быть измерена в одном варианте осуществления по диастолическому спаду аортального давления с использованием метода площадей. В другом воплощении общая растяжимость артерий может быть рассчитана как соотношение систолического объема к пульсовому давлению, где систолический объем определяется как отношение сердечного выброса к ЧСС.

В связанных вариантах осуществления может быть измерена местная растяжимость артерий или региональная растяжимость артерий у субъекта в дополнение или в качестве альтернативы измерению общей растяжимости артерий, и если местная или региональная растяжимость артерий снижена относительно местной или региональной растяжимости артерий, ожидаемой в аналогичной ситуации у здорового человека, релаксин можно вводить для увеличения растяжимости артерий у этого человека.

В других вариантах осуществления субъект, которому вводят релаксин, страдает от одного или нескольких из следующих заболеваний: атеросклероз, сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа, ишемическая болезнь сердца, склеродермия, инсульт, диастолическая дисфункция, семейная гиперхолестеринемия, изолированная систолическая гипертензия, гипертоническая болезнь, вторичная артериальная гипертензия, гипертрофия левого желудочка, артериальная жесткость, связанная с долгосрочным курением, артериальная жесткость, связанная с ожирением, возрастная артериальная жесткость, системная красная волчанка, преэклампсия и гиперхолестеринемия. В соответствующих вариантах осуществле-

ния изобретение относится к способам повышения растяжимости артерий в перименопаузе, менопаузе и постменопаузе у женщин и у лиц, которые находятся под угрозой одного из вышеупомянутых нарушений.

В дополнительном варианте осуществления изобретения введение релаксина повышает артериальную эластичность по меньшей мере на 10, 15, 20% или более по отношению к измеренной растяжимости артерий перед введением. В еще одном варианте осуществления изобретение обеспечивает введение релаксина лицу с пониженной растяжимостью артерий с заданной скоростью, которая позволяет поддерживать концентрацию релаксина в крови от 0,5 до 80 нг/мл. В одном варианте осуществления релаксин представляет собой рекомбинантный релаксин человека с одной не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В еще одном варианте осуществления релаксин представляет собой релаксин с более чем одной не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения релаксин содержит не кодируемую в природных условиях аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером. В соответствующих вариантах осуществления релаксин можно вводить ежедневно в композиции для инъекций, с замедленным высвобождением или в форме продолжительной инфузии.

В другом аспекте изобретение относится к лечению инфекций или ишемической раны путем введения терапевтически эффективного количества релаксина. В особенно предпочтительном варианте осуществления инфекция или ишемическая рана является результатом одной травмы в результате нехватки кислорода из-за плохого кровообращения.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ применения полипептидов релаксина по настоящему изобретению для изготовления повязок, пропитанных лекарственным средством, для лечения инфекции или ишемической раны или для изготовления повязок, пропитанных лекарственным средством, для стимуляции ангиогенеза. В другом аспекте настоящее изобретение относится к лечению остеодегенеративной дисфункции суставов, и в другом аспекте лечение остеодегенеративной дисфункции суставов включает применение hR2 в комбинации с одним или более вспомогательными средствами, включая, но не ограничиваясь этим, глюкозамин. В другом аспекте настоящее изобретение относится к лечению болезни Альцгеймера, и в другом аспекте лечение болезни Альцгеймера включает применение hR2 в комбинации с одним или более вспомогательными средствами, включая, но не ограничиваясь этим, эстроген. В другом воплощении данное изобретение относится к способу модуляции физиологии репродуктивной системы млекопитающих, включающему введение млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции, описанной в настоящей заявке.

Кроме того, изобретение относится к способам лечения ангиотензин-II (AngII)-опосредованной вазоконстрикции. Эти способы обычно включают введение состава, содержащего количество релаксина, которое эффективно обращает, замедляет или уменьшает сосудосуживающие эффекты AngII.

Кроме того, изобретение относится к способам лечения эндотелин-1 (ET-1)-опосредованной вазоконстрикции. Эти способы обычно включают введение состава, содержащего количество релаксина, которое эффективно обращает, замедляет или уменьшает сосудосуживающий эффект ET-1. В некоторых вариантах осуществления способы включают увеличение активации рецепторов эндотелина типа В в клетке кровеносного сосуда путем введения релаксина индивидууму.

Кроме того, изобретение относится к способам лечения ишемического состояния, обычно включающим введение состава, содержащего количество релаксина, эффективного для стимуляции или ускорения ангиогенеза и/или вазодилатации, и, соответственно, лечения ишемического состояния. Способы пригодны для лечения различных ишемических состояний. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения ишемического состояния, которое возникает в результате инфаркта миокарда. В других вариантах осуществления предложены способы лечения ишемического состояния, связанного с раной. Таким образом, изобретение также относится к способам стимуляции заживления ран.

Кроме того, изобретение относится к способам стимулирования ангиогенных и/или сосудорасширяющих цитокинов, в целом, включающим введение состава, содержащего количество релаксина, эффективно расширяющее кровеносные сосуды и/или стимулирующее или содействующее продукции цитокинов в кровеносных сосудах. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают стимулирование экспрессии основного фактора роста фибробластов (bFGF) и/или фактора роста эндотелия клеток сосудов (VEGF). Такие способы можно применять в лечении широкого спектра заболеваний, которые можно лечить с помощью увеличения притока крови в пораженном участке или рядом с ним.

Кроме того, изобретение относится к способу увеличения вазодилатации и гиперфильтрации в почках, обычно включающему введение состава, содержащего некоторое количество релаксина. Эти способы можно применять в лечении различных почечных патологий. Таким образом, изобретение также относится к способам лечения почечной патологии, связанной с вазоконстрикцией.

Кроме того, изобретение относится к способу снижения легочной гипертензии, обычно включающему введение состава, содержащего некоторое количество релаксина.

В патентах США, принадлежащих Connetics Corporation и BAS Medical, Inc., №№ 6211147 и 6780836, соответственно, которые включены в настоящее описание путем ссылки, раскрыты способы стимулирования ангиогенеза с использованием релаксина. В патенте, принадлежащем Genentech, Inc.,

5759807, который включен в настоящее описание путем ссылки, раскрывает способ прокаротиотической продукции релаксина из прорелаксина. В патенте США 6251863 раскрыты способы лечения остеодегенеративной дисфункции суставов и способы лечения болезни Альцгеймера путем введения релаксинового медикамента, дополнительно включающего глюкозаминсульфат и эстроген, соответственно, для каждого из состояний, и описание этого патента, также включено в настоящее описание в полном объеме путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или несколько посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с линкером, полимером или биологически активной молекулой. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с бифункциональным полимером, бифункциональным линкером или по меньшей мере одним дополнительным полипептидом релаксина.

В некоторых вариантах осуществления не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер содержит полиэтиленгликолевую группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с водорастворимым полимером через линкер или связана с водорастворимым полимером напрямую. В некоторых вариантах осуществления молекула полиэтиленгликоля представляет собой бифункциональный полимер, в некоторых вариантах осуществления бифункциональный полимер связан со вторым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид является полипептидом релаксина.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит по меньшей мере две аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, содержащим полиэтиленгликолевую группу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота не является кодируемой в природных условиях аминокислотой.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит по меньшей мере две аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, содержащим полиэтиленгликолевую группу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота не является кодируемой в природных условиях аминокислотой.

В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одном или более из положений в любом из полипептидов релаксина или полипептида, аналога релаксина, прорелаксина, А-цепи релаксина, В-цепи релаксина AlalAsp релаксина, или полипептидов релаксина в А-цепь перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (т.е. на карбоксильном конце белка), и любых их комбинациях (SEQ ID NO: 4) и/или в В-цепи перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (SEQ ID NO: 5 или соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одном или более из положений в любом из полипептидов релаксина или прорелаксина В-цепь перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка), и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1 или соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 2 или 3). В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одном или более из положений в релаксине перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 (т.е. на карбоксильном конце белка SEQ ID NO: 3).

В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в А-цепь в положении аминокислоты 1 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в А-цепь в положении аминокислоты 5 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в В-цепь в положении аминокислоты 7 (SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в А-цепь в положении аминокислоты 2 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в А-цепь в положении аминокислоты 13 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в В-цепь в положении аминокислоты 5 (SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в А-цепь в положении аминокислоты 18. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в В-цепь в положении аминокислоты 5. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в В-цепь в положении аминокислоты 28. В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном из следующих положений в полипептиде релаксина: в А-цепи в положении аминокислоты 1, 2, 5,

В одном из вариантов осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в один из следующих положений в полипептидах релаксина: в А-цепи в положениях аминокислот 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 или в соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO 1, 2, 3), в В-цепи в положениях аминокислот 7, 5 (SEQ ID NO: 5 или 6 или соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3). В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одно из следующих положений в полипептидах релаксина: в А-цепи в положениях аминокислот 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 или в соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO 1, 2, 3), в В-цепи в положениях аминокислот 7, 5 (SEQ ID NO: 5 или 6 или соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3).

- 5 -

жениях аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3) связана с водорастворимым полимером.

В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одном или более из положений в любом из полипептидов релаксина или прорелаксина: в В-цепи в положениях 5, 7 (SEQ ID NO: 5 или 6 или соответствующие положения аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3), и в А-цепи в положениях 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 или соответствующих положений аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3). В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в одном или более из следующих положений в любом из полипептидов релаксина или прорелаксина: в положениях В-цепи 5, 7 (SEQ ID NO: 5 или 6, или соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3), и в А-цепи в положениях 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 или в соответствующих положениях аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2, 3), и не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с водорастворимым полимером.

Способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для стимуляции ангиогенеза, стимуляции вазодилатации, стимуляции не гипотензивной вазодилатации, для лечения гипертонической болезни, в том числе, но не ограничиваясь этим, почечной гипертензии, легочной гипертензии и сердечной гипертензии (патенты США №№ 6723702 и 6780836, включенные в настоящее описание путем ссылки в полном объеме описывают получение и применение кристаллов аналогов релаксина).

Составы.

В широкой практике настоящего изобретения также предполагается, что состав может содержать смесь двух или более из перечисленного: релаксина, димера релаксина, аналога релаксина, ацилированного релаксина или ацилированного аналога релаксина, где по меньшей мере один из компонентов смеси содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложены составы, содержащие смесь двух или из перечисленного: релаксина, димера релаксина, аналога релаксина, ацилированного релаксина или ацилированного аналога релаксина, где по меньшей мере один из компонентов смеси содержит содержащей не кодируемые в природных условиях аминокислоты и дополнительно содержит по меньшей мере один водорастворимый полимер, присоединенный к по меньшей мере одной из не кодируемых в природных условиях аминокислот.

Настоящее изобретение также включает гетерогенные смеси, в которых полипептиды релаксина и аналоги релаксина получают способами согласно настоящему изобретению, а затем смешивают таким образом, чтобы обеспечить возможность введения пациенту, нуждающемуся в этом, препарата, который содержит, например, 25% полипептида релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту в положении 28 В-цепи, которая была пегилирована, 25% полипептида релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту в положении 10 цепи В, причем указанная не кодируемая в природных условиях аминокислота связана с водорастворимым полимером, и 50% полипептид релаксина, который содержит не кодируемую в природных условиях аминокислоту в положении 31 В-цепи релаксина (SEQ ID NO: 2; в альтернативном варианте SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 или 12). Все различные смеси с различным вариантами процентного содержания полипептида релаксина, в которых полипептиды релаксина включают различные (1) разного размера ПЭГ, или (2) ПЭГ присоединены в различных положениях последовательности. Данная информация приведена в качестве примера и ни в коем случае не предполагает ограничения составов, которые можно осуществить в рамках настоящего изобретения, и будут очевидны специалистам в данной области. В дополнительном варианте осуществления варианты полипептида релаксина, включенные в состав смеси, выбирают на основании различий во времени диссоциации, благодаря чему композиция может обеспечить продолжительное высвобождение релаксина для пациента, нуждающегося в этом.

Составы согласно настоящему изобретению могут включать глюкогон.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения, включая составы для ингаляций

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения можно использовать технологии, описанные здесь, для получения аналогов релаксина с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами для введения пациентам в легкие, что приводит к повышенным уровням релаксина в крови, в течение по меньшей мере 6 ч и более типично по меньшей мере 8, 10, 12, 14, 18, 24 ч или более после введения. Другой вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает улучшенные смеси аналогов релаксина, подходящие для терапевтических составов, предназначенные для введения пациентам в форме ингаляций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения следующие сайты в нативной молекуле релаксина могут быть использованы для замены на не кодируемые в природных условиях аминокислоты и, возможно, дополнительно модифицированы ковалентно присоединенным водорастворимым полимером, таким как ПЭГ: 2 С- концы А и В-цепей, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B и Glu21B.

В дополнение к нативному релаксину настоящее изобретение относится к не нативным полипептидам релаксина и аналогам релаксина, содержащим одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, введенных путем замены или встроенных в сигнальную последовательность, которые могут также обеспечивать сайт для встраивания одного или более водорастворимых полимеров, таких как ПЭГ. Этот вариант осуществления изобретения особенно полезен для введения дополнительных, адап-

тированных для конкретных нужд сайтов пегилирования в молекулу релаксина, например, для формирования молекул ПЭГ-релаксина, имеющих повышенную устойчивость к ферментативному расщеплению. Такой подход обеспечивает большую гибкость в дизайне оптимизированных конъюгатов релаксина, дает желаемый баланс активности, стабильности, растворимости и фармакологических свойств. Могут быть осуществлены мутации, например, путем сайт-специфического мутагенеза в любом количестве положений в молекуле релаксина. Молекулы ПЭГ для использования в настоящем изобретении могут иметь различные структуры: линейные, раздвоенные, разветвленные, гантели и тому подобное. Как правило, ПЭГ активируют подходящей активирующей группой, подходящей для соединения с целевым сайтом или сайтами, в молекуле релаксина. Активированный ПЭГ будет содержать реакционную группу на конце для реакции с релаксином. Представительные активированные производные ПЭГ и способы соединения этих агентов с лекарственным средством, таким как релаксин, известны в данной области и подробно описаны в Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" в Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), и в Advanced Drug Reviews, 16:157-182 (1995).

В одном конкретном варианте осуществления изобретения в полиэтиленгликолевой части конъюгата отсутствует одна или несколько липофильных групп, способных в значительной степени изменять водорастворимую природу полимера или конъюгата полимер-релаксин. То есть полимерная или нерелаксиновая часть конъюгата согласно настоящему изобретению может содержать группу атомов, которая считается более липофильной, чем гидрофильной (например, углеродные цепи, имеющие от 2 до 8-12 атомов углерода), однако, если присутствие такой группы или групп может существенно изменить гидрофильность полимера или конъюгата, то такой фрагмент может содержаться конъюгатах согласно изобретению. То есть в результате сайт-специфических мутаций релаксина, полипептидов релаксина и аналогов релаксина, конъюгаты релаксина согласно изобретения могут быть более гидрофильными, чем липофильными или амфифильными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где может присутствовать липофильный фрагмент, фрагмент предпочтительно расположен не на конце цепи ПЭГ.

Разветвленные ПЭГ для использования в конъюгатах по изобретению включают описанные в международной патентной публикации WO 96/21469, содержание которой включено в настоящий документ в полном объеме путем ссылки. Как правило, разветвленные ПЭГ могут быть представлены формулой $R(\text{ПЭГ-ОН})_n$, где R представляет собой центральное "ядро" молекулы и n представляет собой число боковых цепей. Разветвленные ПЭГ имеют центральное ядро, от которого отходит 2 или более "боковых цепей" ПЭГ. В разветвленной конфигурации разветвленный основной полимер содержит один реактивный сайт для присоединения к релаксину. Разветвленные ПЭГ для использования в настоящем изобретении обычно содержат менее 4 ветвей ПЭГ и более предпочтительно будут включать менее 3 ветвей ПЭГ. Разветвленные ПЭГ обладают тем преимуществом, обеспечения одного реактивного сайта, связанного с более крупным, более плотным облаком полимера, чем линейные аналоги ПЭГ. Один конкретный тип разветвленного ПЭГ можно представить в виде $(\text{MeO-ПЭГ-})_p \text{R-X}$, где p равно 2 или 3, R является центральной структурой, ядром, такой как лизин или глицерин, несущий 2 или 3 боковые цепи ПЭГ, присоединенных к нему, и X представляет любую подходящую функциональную группу, или которые могут быть активированы для соединения с релаксином. Одним из наиболее предпочтительных разветвленных ПЭГ является mПЭГ 2-NHS (корпорация Shearwater, штат Алабама), имеющий структуру mПЭГ 2-лизин-сукцинимид.

В еще одной из разветвленных архитектур "боковой ПЭГ" имеет реакционноспособные группы для связывания с белком, остова ПЭГ, а не в конце цепи ПЭГ. Реакционноспособные группы, отходящие от ядра ПЭГ, для присоединения к релаксину, могут быть одинаковыми или разными. Боковые ПЭГ могут быть полезны, но обычно менее предпочтительны, особенно для ингаляционных композиций.

Кроме того, ПЭГ-части конъюгата ПЭГ-конъюгата могут иметь раздвоенные структуры, имеющие разветвленную группу на одном конце полимерной цепи и две свободные реакционноспособные группы (или любое кратное 2 число), связанные с разветвленной группой, для соединения с релаксином. Примеры раздвоенных ПЭГ описаны в Международной патентной публикации WO 99/45964, содержание которой специально включено в настоящий документ путем ссылки. Раздвоенный полиэтиленгликоль может необязательно включать алкил или R-группы на противоположном конце полимерной цепи. Более конкретно, раздвоенный конъюгат ПЭГ-релаксин в соответствии с изобретением, имеет формулу $R\text{-ПЭГ-L}(\text{Y-релаксин})_n$, где R представляет собой алкил, L представляет собой устойчивые к гидролизу точки ответвления и Y является связывающей группой, которая обеспечивает химическую связь раздвоенного полимера с релаксином, и n кратно 2. L может представлять собой одно "ядро" группы, такое как "--CH--", или может содержать длинную цепочку атомов. Примерные группы L включают лизин, глицерин, пентаэритрит или сорбит. Типично, конкретным атомом ответвления во фрагменте ответвления является углерод.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения связь раздвоенного ПЭГ с молекулой релаксина, (Y), представляет собой устойчивую к гидролизу связь. В предпочтительном варианте осуществления n=2. Подходящие фрагменты Y до сопряжения с реактивным сайтом на релаксине включают, но не ограничиваются перечисленным, активные сложные эфиры, активные карбонаты, альдегиды, изо-

цианаты, изотиоцианаты, эпоксиды, спирты, малеимиды, винилсульфоны, гидразиды, дитиопиридины и йодацетамиды. Выбор подходящей активирующей группы будет зависеть от предполагаемого места присоединения к молекуле релаксина и может быть легко определен специалистом в данной области. Соответствующая группа Y в результате ПЭГ-релаксин сопряжения представляет собой результат реакции активированного раздвоенного полимера с подходящим реактивным сайтом на релаксине. Конкретный характер такой окончательной связи будет очевиден специалистам в данной области. Например, если реактивный раздвоенный ПЭГ содержит активированный сложный эфир, такой как сукцинимид или сложный эфир малеимида, конъюгирование через амины в сайте релаксина приведет к образованию соответствующих амидных связей. Именно эти раздвоенные полимеры являются особенно привлекательными, поскольку они обеспечивают конъюгирование с молярным отношением релаксина к ПЭГ 2:1 или больше. Такие конъюгаты могут быть менее склонны блокировать сайт рецепторов релаксина, в то же время обеспечивая гибкость в дизайне защиты релаксина против ферментативного расщепления, например релаксин-разрушающим ферментом.

В близком варианте осуществления в настоящем изобретении может быть использован конъюгат раздвоенный ПЭГ-релаксин, представленный формулой: $R-[P\text{ЭГ-L}(Y\text{-релаксин})_2]_n$. В этом случае R представляет собой не кодируемые в природных условиях аминокислоты, имеющие присоединенный к ним по меньшей мере один конъюгат ПЭГ-ди-релаксин. В частности, предпочтительными раздвоенными полимерами в соответствии с этим аспектом изобретения являются те, в которых n выбран из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6. В альтернативном варианте осуществления химическая связь между не встречающимися в природных условиях аминокислотами в релаксине, полипептиде релаксина или аналога релаксинах и точка ответвления полимера могут быть деградируемыми (например, гидролитически неустойчива). Кроме того, одна или более разлагаемых связей могут быть включены в основную полимерную цепь, чтобы обеспечить возможность получения *in vivo* конъюгата ПЭГ-релаксин с меньшей цепью ПЭГ, чем в первоначально вводимом конъюгате. Например, возможно вводят большой и относительно инертный конъюгат (т.е. к которому присоединены одна или более высокомолекулярных цепей ПЭГ, например одна или несколько цепей ПЭГ с молекулярной массой более 10000, где конъюгат, по существу, не обладает биологической активностью), который затем в легких или в крови подвергается гидролизу с образованием биологически активных конъюгатов, несущих часть первоначально присутствующей цепи ПЭГ. После расщепления *in vivo* гидролизуемой разлагающейся связи происходит высвобождение либо свободного релаксина (в зависимости от положения разлагаемой связи), либо релаксина с небольшим полиэтиленовой меткой, присоединенной к нему, которые легко всасываются через легкие и/или распределяются в крови.

Одним признаком варианта осуществления изобретения является то, что интактный конъюгат с полимером до гидролиза, после введения подвергается минимальному разрушению, благодаря чему гидролиз расщепляемой связи позволяет эффективно контролировать медленную скорость высвобождения активного релаксина в крови в отличие от ферментативного расщепления релаксина до его освобождения в системный кровоток.

Соответствующие расщепляемые в физиологических условиях связи включают, но не ограничиваются перечисленным, сложный эфир, сложный карбонат эфир, карбамат, сульфат, фосфат, ацилоксиалкильный эфир, ацеталь и кеталь. Такие конъюгаты должны обладать расщепляемой в физиологических условиях связью, которая является стабильной при хранении и при введении. Например, конъюгат ПЭГ-расщепляемая связь-релаксин будет сохранять свою целостность при изготовлении конечной фармацевтической композиции после растворения в соответствующей среде доставки, если она применяется, и при введении независимо от маршрута.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемые в природных условиях аминокислоты встроены в единственную цепь релаксина или единственную цепь аналога релаксина.

В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно данному изобретению включает одну или более замен, присоединений или делеций не кодируемых в природных условиях аминокислот в сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно данному изобретению включает одну или более замен, присоединений или делеций не кодируемых в природных условиях аминокислот в сигнальной последовательности релаксина или любого из аналогов релаксина или полипептидов, раскрытых в данном описании. В некоторых вариантах осуществления полипептид согласно данному изобретению включает одну или более замен, присоединений или делеций природных аминокислот в сигнальной последовательности, а также одну или более замен, присоединений или делеций не кодируемых в природных условиях аминокислот в сигнальной последовательности релаксина или любого из аналогов релаксина или полипептидов, раскрытых в данном описании. В некоторых вариантах осуществления одна или нескольких не кодируемых в природных условиях аминокислот включены в лидерную или сигнальную последовательность релаксина или любого из аналогов релаксина или полипептидов, раскрытых в данном описании.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые модулируют родство полипептида релаксина к рецептору пептида релаксина или обя-

зательному партнеру, в том числе, но не ограничиваясь этим, белку, полипептиду, малым молекулам или нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые повышают стабильность полипептида релаксина по сравнению со стабильностью соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. Стабильность и/или растворимость может быть измерена с помощью ряда различных анализов, известных специалистам в данной области. Такие анализы включают, но не ограничиваются перечисленным: Э-ВЭЖХи ОФ-ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которое модулирует иммуногенность полипептида релаксина по сравнению с иммуногенностью соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которое модулирует время полужизни в сыворотке или время циркуляции полипептида релаксина по сравнению временем полужизни или временем циркуляции или времени обращения соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые увеличивают растворимость в воде полипептида релаксина по сравнению с растворимостью в воде соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые повышают растворимость полипептида релаксина в клетке-хозяине, по сравнению с растворимостью соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которое увеличивает экспрессию полипептида релаксина в клетке-хозяине или улучшает синтез *in vitro* по сравнению с экспрессией или синтезом соответствующего релаксина без замены, добавления или удаления. Полипептид релаксина, содержащий эту замену, сохраняет активность агониста и сохраняет или улучшает уровни экспрессии в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые увеличивают устойчивость полипептида релаксина к действию протеаз по сравнению с устойчивостью к протеазам соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые модулируют активность передачи сигнала рецепторов релаксина по сравнению с активностью рецептора при взаимодействии с соответствующим полипептидом релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые модулируют его связывание с другой молекулой, такой как рецептор, по сравнению со связыванием соответствующего полипептида релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которое модулирует его противовирусную активность по сравнению с противовирусной активностью соответствующего полипептида релаксина без замены, присоединения или делеции. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые повышают его активность в отношении метаболизма глюкозы по сравнению с активностью в отношении метаболизма глюкозы соответствующего полипептида релаксина без замены, присоединения или делеции.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина включает замену, присоединение или делецию, которые увеличивают совместимость полипептида релаксина с фармацевтическими консервантами (например, м-крезолом, фенолом, бензиловым спиртом) по сравнению с совместимостью соответствующего релаксина без замены, присоединения или делеции. Это увеличение совместимости позволяет при приготовлении хранить фармацевтический препарат, который сохраняет физико-химических свойства и биологическую активность белка во время хранения.

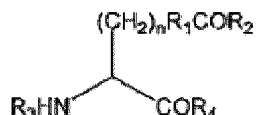
В некоторых вариантах осуществления одна или более конструктивных связей создаются с одной или несколькими не встречающимися в природных условиях аминокислотами. Внутримолекулярные связи могут быть созданы множеством способов, в том числе, но не ограничиваясь этим, реакцией между двумя аминокислотами в белке при подходящих условиях (одна или обе аминокислоты, могут быть не-природными аминокислотами); реакции с двумя аминокислотами, каждая из которых может быть кодируемой или не кодируемой в природных условиях, с линкером, полимером или другими молекулами при подходящих условиях и т.д.

В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен в полипептиде релаксина могут быть на одну или более природных или не кодируемых в природных условиях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены в полипептиде релаксина могут быть с кодируемыми или не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, при условии, что по меньшей мере одна замена выполнена на не кодируемую в природных условиях аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен в полипептиде релаксина может быть с одной или природными аминокислотами, а также дополнительно по меньшей мере одна замена с не кодируемой в природных условиях аминокислотой.

В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, гидразиновую группу, гидразид-

ную группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу.

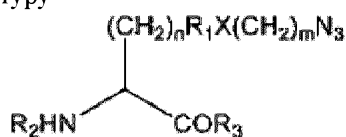
В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат карбонильную группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют структуру



где $n = 0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; R_2 представляет собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил, R_3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицирующую группу, и R_4 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу.

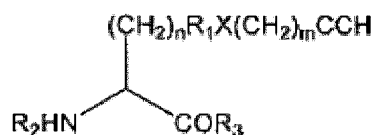
В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают аминоксигруппы. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают гидразидную группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат гидразиновую группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки включают семикарбазидные группы.

В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки содержат азидную группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют структуру



где $n = 0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или не присутствует; X представляет собой O, N, S или не присутствует; $m = 0-10$; R_2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицирующую группу, R_3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу.

В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают алкиновую группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют структуру



где $n = 0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил, X = O, N, S или не присутствует; $m = 0-10$; R_2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицирующую группу, R_3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой агонист полипептида релаксина, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист. В некоторых вариантах осуществления агонист полипептида релаксина, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер содержит полиэтиленгликолевую группу. В некоторых вариантах осуществления агонист полипептида релаксина, частичный агонист, антагонист, частичный антагонист или обратный агонист содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты и одну или несколько посттрансляционных модификаций, линкер, полимер или биологически активные молекулы.

Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют полипептиды релаксина, имеющие последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с нуклеиновыми кислотами, которые кодируют полипептиды релаксина, имеющие последовательности SEQ ID NO: 1 и 2. Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, включающие полинуклеотид или полинуклеотиды, которые гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами, которые кодируют полипептиды, представленные как SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12, причем указанный полинуклеотид содержит по меньшей мере один селекторный кодон. Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, включающие полинуклеотид или полинуклеотиды, которые гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами, которые кодируют полипептиды, представленные как SEQ

ID NO: 1 и 2, причем указанный полинуклеотид содержит по меньшей мере один селекторный кодон. Настоящее изобретение относится к изолированной нуклеиновой кислоте, включающей полинуклеотид, который кодирует полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 1 и 2. Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который кодирует полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Настоящее изобретение относится к изолированной нуклеиновой кислоте, включающей полинуклеотид, который кодирует полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 1 и 2, с одной или более не кодируемой в природных условиях аминокислотой. Настоящее изобретение также обеспечивает изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который кодирует полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12, с одной или более не кодируемыми в природных условиях аминокислотами. Для специалиста очевидно, что ряд различных полинуклеотидов может кодировать любой полипептид по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления селекторный кодон выбран из группы, состоящей из амбер-кодона, охра-кодона, опал-кодона, уникального кодона, редкого кодона, кодона из пяти оснований и кодона из четырех оснований.

Настоящее изобретение также предусматривает способы получения полипептида релаксина, связанного с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления способ включает осуществление контакта изолированного полипептида релаксина, содержащего не кодируемые в природных условиях аминокислоты, с водорастворимым полимером, содержащим фрагмент, который вступает в реакцию с не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты, включенные в полипептид релаксина, являются реактивными по отношению к водорастворимому полимеру, который в остальном инертен по отношению к любой из 20 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты, встроенные в полипептид релаксина, являются реактивными по отношению к линкеру, полимеру или биологически активной молекуле, которые не обладают никакой другой активностью по отношению к любой из 20 стандартных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с водорастворимым полимером путем осуществления реакции полипептида релаксина, содержащего карбонилсодержащие аминокислоты, с молекулой полиэтиленгликоля, содержащей аминоокси-, гидразиновую, гидразидную или семикарбазидную группу. В некоторых вариантах осуществления аминоокси-, гидразиновая, гидразидная или семикарбазидная группа связана с молекулой полиэтиленгликоля амидной связью. В некоторых вариантах осуществления аминоокси-, гидразиновая, гидразидная или семикарбазидная группа связана с молекулой полиэтиленгликоля карбаматной связью.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с водорастворимым полимером путем осуществления реакции молекулы полиэтиленгликоля, содержащей карбонильную группу, с полипептидом, содержащим не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая включает аминоокси-, гидразиновую, гидразидную или семикарбазидную группу.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с водорастворимым полимером путем осуществления реакции полипептида релаксина, содержащего алкинсодержащую аминокислоту с молекулой полиэтиленгликоля, содержащей азидную группу. В некоторых вариантах осуществления азидная или алкиновая группа связана с молекулой полиэтиленгликоля амидной связью.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина связан с водорастворимым полимером путем осуществления реакции полипептида релаксина, содержащего азидсодержащую аминокислоту, с молекулой полиэтиленгликоля, содержащей алкиновую группу. В некоторых вариантах осуществления азидная или алкиновая группа связана с молекулой полиэтиленгликоля амидной связью.

В некоторых вариантах осуществления молекула полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 кДа, в некоторых вариантах осуществления молекула полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу от 0,1 до 50 кДа.

В некоторых вариантах осуществления молекула полиэтиленгликоля представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления каждая ветвь полиэтиленгликоля разветвленного полимера имеет молекулярную массу от 1 до 100 кДа или от 1 до 50 кДа.

В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер связан с полипептидом релаксина, содержащим фрагмент полиалкиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки, включенные в полипептид релаксина, содержат карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразиновую, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки, встроенные в полипептид релаксина, содержат карбонильную группу, и водорастворимый полимер содержит аминоокси-, гидразидную, гидразиновую или семикарбазидную группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки, встроенные в полипептид релаксина, содержат алкиновую группу, и водорастворимый полимер азидную группу. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислотные остатки, встроенные в полипептид релаксина, содержат азидную группу, и

водорастворимый полимер содержит алкиновую группу.

Настоящее изобретение также обеспечивает композиции, содержащие полипептид релаксина, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты связаны с водорастворимым полимером.

Настоящее изобретение также обеспечивает клетки, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид релаксина, содержащий селекторный кодон. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат ортогональную синтетазу РНК и/или ортогональную тРНК для замены не кодируемой в природных условиях аминокислоты в полипептиде релаксина.

Настоящее изобретение также предусматривает способы получения полипептида релаксина, содержащего не кодируемые в природных условиях аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления способы включают культивирование клеток, содержащих, полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие полипептид релаксина, ортогональную РНК синтетазу и/или ортогональную тРНК, в условиях, которые допускают экспрессию полипептида релаксина и очистку полипептида релаксина от клеток и/или культуральной среды.

Настоящее изобретение также относится к способам увеличения времени терапевтической полужизни, периода полужизни в сыворотке или времени циркуляции полипептидов релаксина. Настоящее изобретение также относится к способам модуляции иммуногенности полипептидов релаксина. В некоторых вариантах осуществления способы включают замену одной или более аминокислот в природном полипептиде релаксина на не кодируемые в природных условиях аминокислоты и/или присоединение полипептида релаксина к линкеру, полимеру, водорастворимому полимеру или биологически активной молекуле.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения пациентов, нуждающихся в таком лечении, эффективным количеством молекулы релаксина согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей полипептид релаксина, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты связаны с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина гликозилирован. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина не гликозилирован.

Настоящее изобретение также обеспечивает полипептиды релаксина, содержащие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 1 и 2, или любую другую полипептидную последовательность релаксина (неограничивающим примером являются SEQ ID NO: от 3 до 12), за тем исключением, что по меньшей мере одна аминокислота заменена на не кодируемую в природных условиях аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты связаны с водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер содержит группу полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразиновую группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и полипептид релаксина, включающий последовательность, показанную в SEQ ID NO: от 1 до 12, или любую другую полипептидную последовательность релаксина, в которой по меньшей мере одна аминокислота заменена не кодируемой в природных условиях аминокислотой. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и полипептид релаксина, содержащий А- и В-цепи (например, SEQ ID NO: 1, 2 и 3; SEQ ID NO: 4 и 5 или 4 и 6 релаксина и т.д.) или любую другую полипептидную последовательность релаксина, в которой по меньшей мере одна аминокислота заменена не кодируемой в природных условиях аминокислотой. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и полипептид релаксина, включающий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, 2 и/или 3. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и полипептид релаксина, включающий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1-3. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают сахаридную группу. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер связан с полипептидом через сахаридную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер, полимер или биологически активная молекула связана с полипептидом релаксина через сахаридную группу.

Настоящее изобретение также обеспечивает полипептид релаксина, включающий водорастворимый полимер, связанный ковалентной связью с единственной аминокислотой в полипептиде релаксина. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер содержит полиэтиленгликоль фрагмент. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, ковалентно связанная с водорастворимым полимером, не является встречающейся в природных условиях аминокислотой, присутствующей в полипептиде.

Настоящее изобретение относится к полипептиду релаксина, содержащему по меньшей мере один линкер, полимер или биологически активную молекулу, в которой указанный линкер, полимер или биологически активная молекула присоединены к полипептиду через функциональные группы не кодируемой в природных условиях аминокислоты, рибосомально встроенной в полипептид. В некоторых вариантах осуществления полипептид монопегилирован. Настоящее изобретение также обеспечивает полипептид релаксина, содержащий линкер, полимер или биологически активную молекулу, которая присоединена к одной или более не кодируемым в природных условиях аминокислотам, причем указанные не кодируемые в природных условиях аминокислоты рибосомально встроены в полипептид в заранее выбранных сайтах.

В объем данного изобретения включена лидерная или сигнальная последовательность релаксина, примером которых может считаться проинулин. Гетерологичная лидерная или сигнальная последовательность должна быть выбрана одной из тех, которые распознаются и процессируются, например, системой секреции клетки-хозяина и секретируются и, возможно, расщепляются по сигналу пептидазы в клетке-хозяине. Способ лечения состояния или расстройства релаксином или полипептидом релаксина или аналогом согласно настоящему изобретению включает лечение релаксином с или без сигнального или лидерного пептида.

Настоящее изобретение также относится к способам стимуляции метаболизма глюкозы, причем указанный способ включает введение релаксина в указанные клетки в количестве, достаточном, чтобы вызвать увеличение активности метаболизма глюкозы.

В другом варианте осуществления конъюгирование полипептида релаксина, содержащий одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, с другой молекулой, в том числе, но не ограничиваясь этим, ПЭГ, обеспечивает, по существу, очищенный релаксин благодаря уникальной химической реакции, используемой для связывания с не встречающимися в природных условиях аминокислотами. Конъюгирование релаксина, содержащий одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, с другой молекулой, такой как ПЭГ, может быть выполнено с другими методами очистки, осуществляемыми до или после шага сопряжения, что позволяет получить, по существу, очищенный релаксин.

Короткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой модель кристаллической структуры релаксина, в которой показаны положения некоторых аминокислотных остатков, выбранных для замены.

Фиг. 2 представляет собой модель кристаллической структуры релаксина, в которой показаны положения некоторых аминокислотных остатков, выбранных для замены.

Фиг. 3 представляет собой модель кристаллической структуры релаксина, в которой показаны положения некоторых аминокислотных остатков, выбранных для замены.

Фиг. 4 представляет собой схему структуры А- и В-цепей релаксина человека.

На фиг. 5 показано результат SDS-PAGE-анализа релаксина, полученного этими способами, с аминокислотой В1, представленной аланином и параацетилфенилаланином в 13 положении аминокислоты в А-цепи, заменяющей валин.

Фиг. 6(А) показывает SDS-PAGE гель непегелированного релаксина V13pAF рядом с маркером молекулярной массы в полосе 1 и рекомбинантным и нереконбинантным релаксином дикого типа а на полосах 3 и 7 (неревосстановленным (NR) и восстановленным (R)).

Фиг. 6(В) показывает SDS-PAGE гель пегелированного релаксина V13pAF на полосах 3 и 4 (невосстановленного (NR) и восстановленного (R)), а также маркер молекулярной массы 1.

На фиг. 7 показан график концентрации в нг/мл релаксина в сыворотке крыс SD во времени для поразному пегелированного AV13 и полипептидов релаксина дикого типа.

Фиг. 8(А) показывает график сравнения группы среднего уровня концентрации от времени для всех групп ПЭГ-RLX, получавших препарат подкожно о в примере 40. Каждому животному путем инъекции вводили однократную дозу. N = 5 животных в каждой группе. Символы указывают среднее $\pm$ SD сгруппированных сывороточных концентраций от времени.

На фиг. 8(В) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым подкожно вводили 0,5 мг/кг 20 К ПЭГ-AQ1-RLX. Каждому животному вводили одну дозу подкожно. N=5 животных в группе.

На фиг. 9(А) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым подкожно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-AA5-RLX. Каждому животному вводили одну дозу подкожно. N = 5 животных в группе.

На фиг. 9(В) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым подкожно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-AR18-RLX. Каждому животному вводили одну дозу подкожно. N = 5 животных в группе.

На фиг. 10(А) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-BV7-RLX. Одну дозу внутривенно вводили для каждого животного. N = 5 животных в группе.

На фиг. 10(В) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуаль-

ных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-BW28-RLX. Одну дозу внутривенно вводили для каждого животного. N = 5 животных в группе.

На фиг. 11 показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-AV13-RLX. Одну дозу внутривенно вводили для каждого животного. N = 5 животных в группе.

Фиг. 12 (A) показывает график сравнения средней концентрации в группе от времени для rhRelaxin, вводимого подкожно. Каждому животному вводили одну дозу. N = 5 животных в группе.

На фиг. 12(B) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,5 мг/кг массы rhRelaxin. Каждому животному вводили одну дозу. N = 5 животных в группе.

Фиг. 13(A) показывает сравнение средней концентрации в сыворотке по группе от времени для всех групп, получавших ПЭГ -RLX подкожно или внутривенно. Каждому животному вводили одну дозу путем инъекции. N = 3-5 животных в группе.

На фиг. 13(B) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,25 мг/кг 20K ПЭГ-AQ1-RLX. Одну дозу внутривенно вводили для каждого животного. N = 4 животных в группе.

На фиг. 14(A) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым подкожно вводили 0,5 мг/кг ПЭГ 20-AQ1-RLX. Каждому животному вводили одну дозу подкожно. N = 5 животных в каждой группе.

На фиг. 14(B) показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым подкожно вводили 0,25 мг/кг ПЭГ 20-AQ1-RLX. Каждому животному вводили одну дозу подкожно. N = 3 животных в каждой группе.

На фиг. 15 показаны кривые зависимости концентрации от времени в сыворотке индивидуальных крыс SD, которым внутривенно вводили 0,125 мг/кг ПЭГ 20-AQ1-RLX. Одну дозу внутривенно вводили для каждого животного. N = 5 животных в группе.

Фиг. 16(A) показывает график среднего конечного времени полужизни ПЭГ-релаксина от дозы; погрешности = SD.

Фиг. 16(B) показывает график среднего ПЭГ-релаксин AUC_{inf} по сравнению с дозой; погрешности = SD.

Фиг. 17(A) показывает график среднего C_{max} ПЭГ-релаксин от дозы; погрешности = SD.

Фиг. 17(B) показывает график среднего клиренса ПЭГ-релаксин от дозы; погрешности = SD.

Фиг. 18(A) показывает график среднего объема распределения ПЭГ-релаксин от дозы; погрешности-SD.

Фиг. 18(B) показывает график сравнения концентрации в сыворотке после однократного введения внутривенно или подкожно 0,25 мг/кг 20K ПЭГ-AQ1 релаксина.

Фиг. 19, части (A)-(F) показывают данные из фазы I в примере 43. Фиг. 19(A) демонстрирует влияние инфузии релаксина на потребление воды и выход мочи. Фиг. 19(B) показывает фон для каждой группы крыс Лонг-Эванс от -16 до 0 ч фазы I для мочи. Фиг. 19(C) показывает влияние инфузий релаксина дикого типа на гематокрит. Фиг. 19(D) показывает влияние инфузий релаксина дикого типа на азот мочевины плазмы у женских особей крыс Лонг-Эванс. Фиг. 19(E) показывает забор воды для каждой группы Лонг-Эванс крыс от 0 до 6 ч фазы I. Фиг. 19(F) показывает мочу для каждой группы Лонг-Эванс крыс от 0 до 6 ч фазы I.

Фиг. 20, части (A)-(I) показывают данные из фазы II после введения инертной среды (контрольная группа) в группах тестирования с введением 0,1 X, 0,3 X и 1X 20K ПЭГ-вариант релаксина с замещением в А-цепи в положении 1 с rAF, связанный с ПЭГ, из примера 43. На фиг. 20(A) показано влияние на потребление воды и мочи. На фиг. 20(B) показано влияние на уровни в плазме натрия для каждой группы крыс Лонг-Эванс после инъекции. На фиг. 20(C) показано влияние на уровни изменений в плазме натрия для каждой группы крыс Лонг-Эванс после инъекции. Фиг. 20(D) показывает эффект ПЭГ-релаксина на осмолярность плазмы. На фиг. 20(E) показан эффект инфузии с ПЭГ-релаксином по изменению осмолярности плазмы. На фиг. 20(F) показан эффект ПЭГ-релаксин введения на уровень мочевины. На фиг. 20(G) показан эффект ПЭГ-релаксина введения на водозабор для каждой группы Лонг-Эванс крыс от 0 до 6 ч в фазе II. Фиг. 20(H) показывает базовую мочу для каждой группы крыс Лонг-Эванс от -16 до 0 ч фазы II. Фиг. 20(I) показывает влияния введения ПЭГ-релаксина на мочу для каждой группы крыс Лонг-Эванс от 0 до 6 ч фаза II.

Определения

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными методологией, протоколами, клеточными линиями, конструкциями и реагентами, описанными в настоящей заявке, и в нем могут использоваться другие. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В настоящем описании и в формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста ясно не указано иное. Так, например, указание на "релаксин" или "ре-

лаксина полипептид" и различные формы с дефисом и без дефиса обозначают один или более таких белков и их эквивалентов и включает известные специалистам в данной области и так далее.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют тот же смысл, как это обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы, устройства и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы в осуществлении или при тестировании изобретения, предпочтительные способы, устройства и материалы в описаны в настоящем тексте.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ с целью описания и раскрытия, например, конструкций и методик, описанных в публикациях, которые могут быть использованы в связи с описанием настоящего изобретения. В публикациях, обсуждаемых в данном документе, предоставляется исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем описании не может быть истолковано как признание того, что авторы настоящего изобретения не могут отнести указанное изобретение к более ранней дате в силу более раннего изобретения или по любой другой причине.

Термин "по существу, очищенный" относится к полипептиду релаксина, который может, по существу, или практически не содержать компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с белками, которые содержатся в их естественной среде, т.е. родных клетках, или клетке-хозяине в случае рекомбинантных полипептидов релаксина. Полипептид релаксина, который может быть, по существу, свободен от клеточного материала, включает препараты белка, содержащие менее 30%, менее чем приблизительно 25%, менее приблизительно 20%, менее приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее приблизительно 5%, менее приблизительно 4%, менее приблизительно 3%, менее приблизительно 2% или менее 1% (на сухой вес) загрязняющих белков. Если полипептид релаксина или его вариант продуцируется рекомбинантным путем в клетках-хозяевах, белок может присутствовать в количестве приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1% или меньше от сухого веса клеток. Если полипептид релаксина или его вариант продуцируется рекомбинантным путем в клетках-хозяевах, белок может присутствовать в культуральной среде в количестве приблизительно 5 г/л, приблизительно 4 г/л, приблизительно 3 г/л, приблизительно 2 г/л, приблизительно 1 г/л, приблизительно 750 мг/л, приблизительно 500 мг/л, приблизительно 250 мг/л, приблизительно 100 мг/л, приблизительно 50 мг/л, приблизительно 10 мг/л, или приблизительно 1 мг/л или менее от сухого веса клеток. Таким образом, "по существу, очищенный" полипептид релаксина, полученный способами согласно настоящему изобретению, может иметь степень чистоты по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75, 80, 85% и более конкретно уровень чистоты по меньшей мере приблизительно 90%, степень чистоты по меньшей мере приблизительно 95%, степень чистоты по меньшей мере приблизительно 99% или более, как это определено соответствующими способами, такими как SDS/PAGE анализ, ОФ-ВЭЖХ, эксклюзионная хроматография и капиллярный электрофорез.

"Рекомбинантные клетки-хозяин" или "клетка-хозяин" относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от способа, используемого для введения: например прямое поглощение, трансдукции, F-спаривания или другие способы, известными в технике для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в виде неинтегрированного вектора, например плазмиды, или, наоборот, может быть интегрирован в геном хозяина.

В настоящем описании термин "среда" или "среды" включает любые культуральные среды, растворы, твердые, полутвердые или жесткие носители (подложки), которые могут поддерживать или включать любую клетку-хозяин, в том числе бактериальные клетки-хозяева, дрожжевые клетки-хозяева, клетки-хозяева насекомых, растительные клетки -хозяева, эукариотические клетки-хозяева, клетки СНО, прокариотические клетки-хозяева, кишечную палочку или клетки-хозяева *Pseudomonas* и содержимое клетки. Таким образом, термин может включать среду, в которой выращивают клетки-хозяева, например среду, в которую был выделен полипептид релаксина, в том числе среду до или после этапа пролиферации. Термин также может включать буферы и реагенты, содержащие лизаты клетки-хозяин, например, в случае, когда полипептид релаксина производится внутриклеточно, после чего клетки-хозяева лизируют или разрушают, чтобы выделить полипептид релаксина.

"Восстановитель" применительно к повторной укладке белка определяется в настоящем описании как любое соединение или материал, который сохраняет сульфгидрильные группы в восстановленном состоянии и уменьшает внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи. Подходящие восстанавливающие агенты включают, но не ограничиваются перечисленными: дитиотритол (DTT), 2-меркаптоэтанол, дитиоэритрит, цистеин, цистеамин (2-аминоэтантол) и восстановленный глутатион. Для специалиста очевидно, что широкий спектр восстановителей пригоден для использования в способах и композициях настоящего изобретения.

"Окислитель" применительно к повторной укладке (рефолдингу) белка определяется в настоящем описании как любое соединение или материал, который способен удалить электрон из окисляемого соединения. Подходящие окислители включают, но не ограничиваются перечисленными, окисленный глутатион, цистеин, цистамин, окисленный дитиотритол, окисленные эритритол и кислород. Как очевидно специалистам в данной области, широкий спектр окислителей является пригодным для использования в способах настоящего изобретения.

"Денатурирующий агент" или "денатурант" в настоящем описании определяется как любое соединение или материал, который будет вызывать обратимое разворачивание белка. Сила денатурирующих агентов или денатуранта будет определяться свойствами и концентрацией конкретного денатурирующего агента или денатуранта. Подходящими денатурирующими агентами или денатурантами могут быть хаотропы, детергенты, органические растворители, смешивающиеся с водой растворители, фосфолипиды или сочетание двух или более таких веществ. Подходящие хаотропы включают, но не ограничиваются перечисленным, мочевины, гуанидин и тиоцианат натрия. Полезные детергенты могут включать, но не ограничиваются перечисленным, сильные детергенты, такие как додецилсульфат натрия, или полиоксигликолы эфиры (например, Tween или Triton детергенты), Sarkosyl, мягкие неионные детергенты (например, дигитонин), мягкие катионные детергенты, такие как N-2,3-(диолеокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний, мягкие ионные детергенты (например, холат натрия или дезоксихолат) или цвиттер-ионные детергенты, включая, но не ограничиваясь перечисленными, сульфобетайны (Zwittergent), 3-(3-хлорамидопропил)диметиламмоний-1-пропан сульфат (CHAPS) и 3-(3-хлорамидопропил)диметиламмоний-2-гидрокси-1-пропан сульфат (CHAPSO). Органические, смешивающиеся с водой растворители, такие как ацетонитрил, низшие спирты (особенно C2-C4 спирты, такие как этанол или изопропанол), или низшие алкандиолы (особенно C2-C4 алкандиолы, такие как этиленгликоль) могут быть использованы в качестве денатурантов. Фосфолипиды, используемые в настоящем изобретении, могут быть естественными фосфолипидами, такими как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол или синтетическими производными фосфолипидов или их вариантами, такими как дигексаноилфосфатидилхолин или дигептаноилфосфатидилхолин.

"Рефолдинг" в настоящем описании описывает любой процесс, реакцию или способ, который преобразует полипептиды, содержащие дисульфидные связи, из неправильно уложенного или развернутого состояния в нативную или правильно уложенную конформацию в отношении к дисульфидным связям.

Термин "кофолдинг" (совместная укладка) в настоящем описании конкретно к процессам рефолдинга, в которых участвует не менее двух полипептидов, которые взаимодействуют друг с другом, и в результате преобразует развернутые или неправильно уложенные полипептиды в нативные, правильно уложенные полипептиды.

Термин "проинсулин" в настоящем описании обозначает белок правильно поперечно связанный белок формулы В-С-А где А является А-цепью релаксина или ее функциональным производным; В является В-цепью релаксина или ее функциональным производным, имеющим эпсилон-аминогруппу; и С - соединительные пептида проинсулина. Предпочтительно проинсулин представлен А-цепью релаксина человека, В-цепью релаксина человека, и С является естественным связывающим пептидом. Если проинсулин является естественной последовательностью, проинсулин содержит три свободных аминокислотных группы: фенилаланин (1) (альфа-аминогруппа), лизин (29) (эпсилон-аминогруппа) и лизин (64) (эпсилон-аминогруппа).

Термин "аналог релаксина" в настоящей заявке обозначает правильно поперечно связанный белок, проявляющий активность релаксина, формулы А-В, где А является А-цепью релаксина или функциональным производным А-цепи релаксина; и В является В-цепью релаксина или функциональным производным В-цепи релаксина, имеющим эпсилон-аминогруппу, и по меньшей мере одна из А или В содержит аминокислотные модификации природной последовательности.

В данном описании, если термин "релаксин" используется в множественном числе или общем смысле, предполагается, что он охватывает как природные аналоги инсулина и релаксина, так и их производные. "Полипептид релаксина" в настоящем описании обозначает соединение, имеющее молекулярную структуру, похожую на релаксин человека, включая дисульфидные мостики между Cys.sup.A7 и Cys.sup.B7 и между Cys.sup.A20 и Cys.sup.B19 и внутренний дисульфидный мостик между Cys.sup.A6 и Cys.sup.A11, которые имеют активность релаксина.

Термин "релаксин" в настоящем описании относится к человеческому релаксину, аминокислотная последовательность и пространственная структура которого хорошо известны. Релаксин человека состоит из А-цепи из двадцати одной аминокислоты и В-цепи из тридцати аминокислот, которые поперечно сшиты дисульфидными связями. Правильно сшитый релаксин содержит три дисульфидных мостика: один между положением 7 А-цепи и положением 7 В-цепи, второй между положением 20 А-цепи и положением 19 В-цепи и третий между позициями 6 и 11 А-цепи [Nicol, D.S. H. W. and Smith, L.F., Nature, 187, 483-485 (1960)].

Пептиды релаксина включают, но не ограничиваются перечисленным, релаксин человека, релаксин свиньи, IGF-1 человека; релаксинподобный фактор роста II (69-84); прорелаксинподобный фактор роста II (68-102) человека, прорелаксинподобный фактор роста II (105-128) человека, [AspB28] релаксин чело-

века, [LysB28] релаксин человека, [LeuB28] релаксин человека, [ValB28] релаксин человека; [AlaB28] релаксин человека, [AspB28, ProB29] релаксин человека, [LysB28, ProB29] релаксин человека, [LeuB28, ProB29] релаксин человека, [ValB28, ProB29] релаксин человека; [AlaB28, ProB29] релаксин человека, [GlyA21] релаксин человека, [GlyA21 GlnB3]-релаксин человека, [AlaA21] релаксин человека, [AlaA21 Gln.sup.B3] релаксин человека, [GlnB3] релаксин человека, [GlnB30] релаксин человека, [GlyA21 GluB30] релаксин человека, [GlyA21 GlnB3 GluB30] релаксин человека, [GlnB3 GluB30] релаксин человека, B22-B30 релаксин человека, B23-B30 релаксин человека, B25-B30 релаксин человека, B26-B30 релаксин человека, B27-B30 релаксин человека, B29-B30 релаксин человека; А-цепи релаксина человека и В-цепи релаксина человека.

Термин "аналог релаксина" обозначает белок, который содержит А-цепи и В-цепи, имеющие, по существу, те же аминокислотные последовательности, что и А-цепи и/или В-цепи релаксина человека соответственно, но отличаются от А-цепи и В-цепи релаксина человека присутствием одной или нескольких аминокислотных делеций, одной или нескольких аминокислотных замен и/или одной или более аминокислотных присоединений, которые не ухудшают активность аналогов релаксина. Аналоги релаксина, имеющие изоэлектрическую точку, которая "выше чем" изоэлектрическая точка релаксина, являются одним из видов аналога релаксина. Другой тип аналога релаксина представляет собой "мономерный аналог релаксина".

"Мономерный аналог релаксина" является быстродействующим аналогом релаксина человека, например релаксин человека, в котором Pro в положении B28 заменен на Asp, Lys, Leu, Val или Ala, и где Lys в положении B29 является Lys или заменен на Pro. Другой мономерный аналог релаксина, также известный как дез (B27) релаксин человека, является релаксином человека, из которого удален Thr в 27 В-цепи. Мономерные аналоги релаксина раскрыты в Chance, R.E., et al., U.S. патент № 5514646, опубликован 7 мая, 1996; Brems, D.N., et al. Protein Engineering, 5, 527-533 (1992); Brange, J, J.V., et al., EPO публикация № 214 826 (опубликовано 18 Марта, 1987); и Brange, J, J.V., et al., Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940 (1991). Мономерные аналоги релаксина, используемые в составах согласно настоящему изобретению, должным образом сшиты в тех же положениях, что и в человеческом релаксине.

Пептиды релаксина, включают, но не ограничиваются перечисленным, релаксин человека, релаксин свиньи; IGF-1 человека; релаксинподобный фактор роста II (69-84); прорелаксинподобный фактор роста II (68-102) человека, прорелаксинподобный фактор роста II (105-128), человек, [AspB28] релаксин человека, [LysB28] релаксин человека, [LeuB28] релаксин человека, [ValB28] релаксин человека; [AlaB28] релаксин человека, [AspB28, ProB29] релаксин человека, [LysB28, ProB29] релаксин человека, [LeuB28, ProB29] релаксин человека, [ValB28, ProB29] релаксин человека; [AlaB28, ProB29] релаксин человека, [GlyA21] релаксин человека, [GlyA21 GlnB3] релаксин человека, [AlaA21] релаксин человека, [AlaA21 Gln.sup.B3] релаксин человека, [GlnB3] релаксин человека, [GlnB30] релаксин человека, [GlyA21 GluB30] релаксин человека, [GlyA21 GlnB3 GluB30] релаксин человека, [GlnB3 GluB30] релаксин человека, B22-B30 релаксин человека, B23-B30 релаксин человека, B25-B30 релаксин человека, B26-B30 релаксин человека, B27-B30 релаксин человека, B29-B30 релаксин человека; А-цепи релаксина человека и В-цепи релаксина человека.

В другом аспекте изобретение обеспечивает рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты белки, векторы экспрессии, содержащие варианты нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, содержащие варианты нуклеиновые кислоты и/или экспрессию, векторы, и способы получения вариантов белков. В дополнительном аспекте изобретение относится к лечению расстройств, чувствительных к релаксину, путем введения пациенту варианта белка, обычно с фармацевтическим носителем, в терапевтически эффективном количестве. В другом аспекте изобретение относится к способам модуляции иммуногенности (в частности, снижения иммуногенности) полипептидов релаксина, изменяя МНС класса II эпитопы.

Термин "полипептид релаксина" включает также фармацевтически приемлемые соли и пролекарства и пролекарства солей, полиморфы, гидраты, сольваты, биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры природного релаксина, а также агонисты, миметики и антагонист варианты природного релаксина и гибридные полипептиды с ними. Гибридные полипептиды, содержащие дополнительные аминокислоты на аминоконце, карбоксильном конце или на обоих концах, охватываются термином "полипептид релаксина". Примеры гибридных полипептидов включают, но не ограничиваются перечисленным, метионил-релаксин, в котором метионин связан с N-концом релаксина, образованным в результате рекомбинантной экспрессии зрелой формы релаксина, в которой не хватает лидерного или сигнального пептида или его части (метионин связан с N-концом релаксина, образованного в результате экспрессии рекомбинантного), полипептиды, гибридные для очистки (в том числе, но не ограничиваясь гибридами с полигистидином или эпитопами аффинности), гибридные полипептиды с сывороточным альбумином, в котором пептиды и гибриды связаны с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин. Патент США № 5750373, который включен в настоящий документ в качестве ссылки, описывает способ выбора новых белков, таких как гормон роста и фрагменты вариантов антител с измененными свойствами связывания с молекулами своих рецепторов. Способ включает гибридизацию гена, кодирующего белок, представляющего интерес с карбоксиконцевым уча-

стком домена гена III белка нитчатых фагов M13. Химерные молекулы, содержащие релаксин и одну или несколько других молекул. Химерные молекулы могут содержать конкретные участки или фрагменты одного или обоих из релаксина и других молекул(ы). Любые такие фрагменты могут быть получены из белков стандартными биохимическими способами или путем экспрессии полинуклеотида, кодирующего фрагмент. Релаксин или его фрагмент может быть получен в виде гидроидного белка, содержащего человеческий сывороточный альбумин (HSA), Fc или его часть. Такие гибридные конструкции слияния для повышения экспрессии релаксина или его фрагмента в эукариотической клетке-хозяине. Примеры частей HSA включают N-концевой полипептид (аминокислоты 1-369, 1-419 и промежуточной длины, начиная с аминокислоты 1), описанные в патенте США № 5766883 и публикации WO 97/24445, которые включены в настоящее описание путем ссылки. Другие химерные полипептиды могут включать белки HSA с релаксином или его фрагментом, прикрепленные к каждому из C-конца и N-конца HSA. Такие конструкции HSA раскрыты в патенте США № 5876969, который включен в настоящее описание путем ссылки. Другие гибридные полипептиды могут быть созданы путем слияния релаксина с а) Fc-фрагментом иммуноглобулина, б) аналогом Fc-фрагмента иммуноглобулина и с) фрагментом Fc-фрагмента иммуноглобулина.

Различные источники раскрывают модификации полипептидов путем полимерной конъюгации или гликозилирования. Термин "полипептид релаксина" включает полипептиды, конъюгированные с полимером, таким как ПЭГ, и может состоять из одного или нескольких дополнительных производных цистеина, лизина и других остатков. Кроме того, полипептид релаксина может содержать линкер или полимер, причем аминокислота, с которой связан линкер или полимер, может быть не кодируемой в природных условиях аминокислотой в соответствии с настоящим изобретением, или может быть связан с природной аминокислотой с использованием способов, известных в области техники, таких как сочетание с лизином или цистеином.

Термин "полипептид релаксина" также включает гликозилированный релаксин, включая, но не ограничиваясь перечисленными, полипептиды, гликозилированные в любом положении аминокислот, N-связанные или O-связанные гликозилированные формы полипептида. Варианты, содержащие одонуклеотидные изменения также считаются биологически активными вариантами полипептида релаксина. Кроме того, сплайс-варианты также включены. Термин "полипептид релаксина" также включает гетеродимеры гомодимеры, гетеромультимеры или гомомультимеры полипептидов релаксина, включающие один или более полипептидов релаксина или любых других полипептидов, белков, углеводов, полимеров, малых молекул, линкеров, лигандов или других биологически активных молекул любого типа, связанных химически или путем экспрессии в виде гибридного белка, а также аналогов полипептида, содержащих, например, конкретные делеции или другие модификации и при этом сохраняющие биологическую активность.

Термин "полипептид релаксина" или "релаксин" охватывает полипептиды релаксина, содержащие одну или более аминокислотных замен, добавлений или делеций. Полипептиды релаксина по настоящему изобретению могут включать модификацию одной или несколькими природными аминокислотами в сочетании с одной или более модификациями природных аминокислот. Описаны примеры замен в самых разнообразных положениях аминокислот в природных полипептидах релаксина включая, но не ограничиваясь перечисленными, замены, которые модулируют фармацевтическую стабильность, модулируют одну или несколько биологических активностей полипептидов релаксина, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, увеличение агонистической активности, увеличение растворимости полипептида, снижение чувствительности к протеазам, конвертирование полипептида в антагонист и т.д., которые охватываются термином "полипептид релаксина". В некоторых вариантах осуществления антагонист релаксина содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, который присутствует в части рецепторного связывания молекулы релаксина.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина дополнительно содержат, добавление, замену или делецию, которые модулируют биологическую активность полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина дополнительно содержат добавление, замену или делецию, которые модулируют противовирусную активность в полипептиде релаксина. В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина дополнительно содержат добавление, замену или удаление, которые повышают противовирусную активность полипептида релаксина. Например, дополнения, замены или делеции могут модулировать одно или более свойств или видов активности релаксина. Например, дополнения, замены или делеции могут модулировать сродство к рецептору релаксина, модулировать время полужизни в кровотоке, модулировать терапевтическое время полужизни, модулировать стабильность полипептида, модулировать расщепление протеазами, модулировать дозы, модулировать высвобождение или биодоступность, облегчение очистки или улучшение или изменение конкретных путей введения. Аналогично, полипептиды релаксина могут содержать последовательности расщепления протеазами, реакционноспособные группы, антителосвязывающие домены (включая, но не ограничиваясь перечисленными, FLAG или поли-His) или другие афинные последовательности оснований (включая, но не ограничиваясь перечисленными, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связанные молекулы (включая, но не ограничиваясь перечисленными, биотин), которые улучшают детектирование (включая,

но не ограничиваясь перечисленными, GFP), очистку или другие свойства полипептида.

Термин "полипептид релаксина" также включает гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры и гетеромультимеры, которые связаны, например, с теми, которые связываются непосредственно с не кодируемыми в природных условиях боковыми цепями аминокислот, одинаковыми или разными боковыми цепями не кодируемых в природных условиях аминокислот, боковыми цепями природных аминокислот, или опосредованно, через линкер, но не только перечисленными молекулами. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются перечисленным, небольшие органические соединения, водорастворимые полимеры различной длины, такие как полиэтиленгликоль или полидекстран, или полипептиды различной длины.

Термин "Не кодируемые в природных условиях аминокислоты" относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот, пирролизином или селеноцистеином. Другие термины, которые могут использоваться как синоним термина "не кодируемые в природных условиях аминокислоты" "неприродные аминокислоты", "аминокислота неприродного происхождения", "не встречающиеся в природных условиях аминокислоты" и различные варианты этих терминов с дефисом и без дефиса. Термин "не кодируемые в природных условиях аминокислоты" также включает, но не ограничивается ими, аминокислоты, которые возникают в результате модификации (например, посттрансляционных модификаций) кодируемых в природных условиях аминокислот (включая, но не ограничиваясь перечисленными, 20 обычных аминокислот, пирролизин и селеноцистеин), но сами обычно не встраиваются в растущую полипептидную цепь трансляционным комплексом. Примеры таких не природных аминокислот включают, но не ограничиваются перечисленным, N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

"Аминоконцевая модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к аминоконцу полипептида. Кроме того, "карбоксиконцевая модифицирующая группа" относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к карбоксиконцу полипептида. Концевые модифицирующие группы включают, но не ограничиваются перечисленным, различные водорастворимые полимеры, пептиды или белки, такие как сывороточный альбумин, или другие фрагменты, которые увеличивают период полужизни пептидов в сыворотке.

Термин "функциональные группы", "активный фрагмент/группа", "активированная группа", "уходящая группа", "реактивный сайт", "химически активные группы" и "химически активная группа" в соответствующей области и в настоящем описании используется для обозначения различных, определяемых частей или блоков молекулы. Термины являются синонимами в химической науке и используются здесь для обозначения части молекулы, которая осуществляет некоторую функцию или активность и вступает в реакцию с другими молекулами.

Термин "связь" или "линкер" используется здесь для обозначения группы или связей, которые обычно образуются в результате химической реакции и обычно являются ковалентными связями. Термин "Устойчивые к гидролизу связи" означает, что связь, по существу, стабильна в воде и не реагирует с водой при используемом значении pH, в том числе, но не ограничиваясь, в физиологических условиях, в течение длительного периода времени, возможно, даже в течение неограниченного периода времени. "Гидролитически нестабильные или разлагаемые связи" означает, что связь разлагается в воде или в водном растворе, в том числе, например, крови. Ферментативно нестабильная или разлагаемая связь означает, что связь может быть разрушена одним или несколькими ферментами. Как понятно в данной области, ПЭГ и родственные полимеры могут включать разлагаемые связи в основной цепи полимера или в линкерной группе между основной полимерной цепью и одной или более из концевых функциональных групп в молекуле полимера. Например, эфирные связи, образующиеся в результате реакции карбоновых кислот ПЭГ или активированных карбоновых кислот ПЭГ со спиртовой группой в биологически активном веществе, обычно гидролизуются в физиологических условиях с высвобождением указанной молекулы. Другие гидролитически разлагаемые связи включают, но не ограничиваются ими, карбонатные связи; иминовые связи, образующиеся в результате реакции аминов и альдегидов; связи эфира фосфорной кислоты, которые образуются при взаимодействии спирта с фосфатной группой; гидразонные связи, которые являются продуктом реакции гидразида и альдегида, ацетальные связи, которые являются продуктом реакции альдегида и спирта; ортоэфирные связи, которые являются продуктом реакции формиа и алкоголя; пептидные связи, образующиеся с участием аминогруппы, в том числе, но не ограничиваясь, в конце полимера, такого как ПЭГ, и карбоксильной группы пептидов и олигонуклеотидов, связи, образованные фосфорамидитной группой, включая, но не ограничиваясь этим, на конце полимера, и 5'-гидроксильной группой олигонуклеотида.

Термин "биологически активная молекула", "биологически активный компонент" или "биологически активный агент" в настоящем описании обозначает любое вещество, которое может повлиять на какие-либо физические или биохимические свойства биологической системы, пути, молекулы или взаимодействия, связанные с организмом, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, вирусы, бактерии, бактериофаги, транспозоны, прионы, насекомые, грибы, растения, животных и человека. В частности, в рамках настоящего описания биологически активные молекулы включают, но не ограничиваются ими, любые вещества, предназначенные для диагностики, лечения, смягчения последствий, лечения или про-

филактики заболевания людей или других животных, или, в альтернативном варианте, повышения физического или психического благополучия людей или животных. Примеры биологически активных молекул, включают, но не ограничиваются перечисленным, пептиды, белки, ферменты, небольшие лекарственные молекулы, вакцины, иммуногены, сильнодействующие препараты, слабые препараты, углеводы, неорганические атомы или молекулы, красители, липиды, нуклеозиды, радионуклиды, олигонуклеотиды, анатоксины, токсины, прокариотические и эукариотические клетки, вирусы, полисахариды, нуклеиновые кислоты и их части, полученные или выделенные из вирусов, бактерий, насекомых, животных или любого другого типа клетки, или клетки, липосомы, микрочастицы и мицеллы. Полипептиды релаксина могут быть добавлены в мицеллярные композиции, см. патент США № 5833948, который включен в настоящее описание путем ссылки в полном объеме. Классы биологически активных веществ, которые являются подходящими для использования с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются перечисленным, лекарства, пролекарства, радионуклиды, визуализирующие вещества, полимеры, антибиотики, фунгициды, противовирусные препараты, противовоспалительные агенты, противоопухолевые агенты, сердечно-сосудистые средства, седативные средства, гормоны, факторы роста, стероидные средства, микробные токсины и тому подобное.

"Бифункциональный полимер" относится к полимеру, включающему две различные функциональные группы, которые способны специфично реагировать с другими группами (включая, но не ограничиваясь перечисленными, аминогруппы боковой кислоты) с образованием ковалентных или не ковалентных связей. Бифункциональный линкер, имеющий одну функциональную группу, способную реагировать с группой в конкретном биологически активном компоненте, и другую группу, реагирующую с группой во втором биологическом компоненте, может быть использован для формирования конъюгатов, которые включают первый биологически активный компонент, бифункциональный линкер и второй биологически активный компонент. Многие процедуры и линкеры для прикрепления молекул различных соединений к пептидам известны. См., например, заявки на европейский патент № 188256, Патенты США №№ 4671958, 4659839, 4414148, 4699784, 4680338, 4569789, которые включены сюда в качестве ссылки. "Многофункциональный полимер" относится к полимеру, состоящему из двух или более отдельных функциональных групп, которые способны специфично реагировать с другими группами (включая, но не ограничиваясь перечисленными, аминогруппы боковой кислоты) с образованием ковалентных или не ковалентных связей. Бифункциональный полимер или многофункциональный полимер может иметь любую длину или молекулярную массу и может быть выбран таким образом, чтобы обеспечить конкретное желаемое расстояние или конформацию между одной или несколькими молекулами, связанными с релаксином и его рецептором, или релаксином.

В случае, когда замещающие группы определяются их обычными химическими формулами, написанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, соответствовали бы структуре, изображенной справа налево, например структура CH_2O эквивалентна структуре $-\text{OCH}_2$.

Термин "заместители" включает, но не ограничивается "неинтерферирующими заместителями". "Неинтерферирующими заместителями" являются группы, которые дают стабильные соединения. Подходящие неинтерферирующие заместители или радикалы включают, но не ограничиваются ими, галоген, C_1 - C_{10} алкил, C_2 - C_{10} алкенил, C_2 - C_{10} алкинил, C_1 - C_{10} алкокси, C_1 - C_{12} аралкил, C_1 - C_{12} алкарил, C_3 - C_{12} циклоалкил, C_3 - C_{12} циклоалкенил, фенил, замещенный фенил, толуол, ксиленил, бифенил, C_2 - C_{12} алкоксиалкил, C_2 - C_{12} алкоксиарил, C_7 - C_{12} арилоксиалкил, C_7 - C_{12} оксиарил, C_1 - C_6 алкилсульфинил, C_1 - C_{10} алкилсульфонил, $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})$, где m составляет от 1 до 8, арил, замещенный арил, замещенный алкокси, фторалкил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, нитроалкил, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NRC}(\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})$, C_2 - C_{10} алкилтиоалкил, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})$, $-\text{OH}$, $-\text{SO}_2$, $=\text{S}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NR}_2$, карбонил, $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})-\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ арил})-\text{S}-(\text{C}_6-\text{C}_{10} \text{ арил})$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ арил})$, $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})$, где каждый m составляет от 1 до 8, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}_2$, $-\text{SO}_2\text{NR}_2$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{NRC}(\text{S})\text{NR}_2$, их соли и т.п. Каждый R в настоящем описании представляет собой H, алкил или замещенный алкил, арил или замещенный арил, аралкил или алкарил.

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

Термин "алкил", сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, линейную или разветвленную цепь, или циклический углеводородный радикал, или их сочетания, которые могут быть полностью насыщенными, моно- или полиненасыщенными и могут включать ди- и поливалентные радикалы, указанное число атомов углерода назначенных (например, C_1 - C_{10} означает от 1 до 10 атомов углерода). Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но не ограничиваются перечисленным, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил, гомологи и изомеры, например н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и тому подобное. Ненасыщенные алкильные группы представляют собой группы, имеющие одну или более двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомо-

логи и изомеры. Термин "алкил", если не указано иное, также включает те производные алкила, которые определены более подробно ниже, такие как "гетероалкил". Алкильные группы, которые ограничены углеводородными группами, называют "гомоалкил".

Термин "алкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из алкана, и включает, но не ограничивается структурами $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и дополнительно включает группы, описанные ниже как "гетероалкилен." Как правило, алкильная (или алкиленовая) группа будет содержать от 1 до 24 атомов углерода, причем группы, содержащие 10 или менее атомов углерода, представляют собой конкретный вариант осуществления способов и композиций, описанных здесь. "Низший алкил" или "низший алкилен" представляет собой более короткую алкильную или алкиленовую группу, обычно содержащую восемь или меньше атомов углерода.

Термины "алкокси", "алкиламино" и "алкилтио" (или тиаалкокси) используются в их обычном смысле и относятся к алкильным группам, которые связаны с остальной частью молекулы через атом кислорода, аминогруппу или атом серы соответственно.

Термин "гетероалкил", сам по себе или в комбинации с другим термином, значит, если не указано иное, стабильный линейный, разветвленный или циклический углеводородный радикал или их комбинация, состоящий из указанного количества атомов углерода и по меньшей мере одного гетероатома, выбранного из группы, состоящей из O, N, Si и S, причем азот и сера могут быть необязательно окисленными, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизован. Гетероатом(ы) O, N и S и Si могут быть размещены в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильные группы присоединены к остальной части молекулы. Примеры включают, но не ограничиваются перечисленным, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ и $\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. До двух гетероатомов могут быть последовательными, такие как, например, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ и $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Аналогичным образом, термин "гетероалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, неограничиваемыми примерами являются $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Для гетероалкиленовой группы одинаковые или различные гетероатомы могут располагаться на одном или обоих концах цепи (включая, но не ограничиваясь перечисленными, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино, аминооксиалкилен и т.п.). Далее для алкиленовой и гетероалкиленовой связывающих групп порядок отображения формулы не предполагает никакой конкретной ориентации группы. Например, формула $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ представляет и $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$, и $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$. Термин "циклоалкил" и "гетероциклоалкил", сами по себе или в комбинации с другими терминами, представляют собой, если не указано иное, циклические варианты "алкила" и "гетероалкила" соответственно. Таким образом, циклоалкил или гетероциклоалкил включают насыщенные, ненасыщенные частично и полностью ненасыщенные циклические линкеры. Кроме того, в случае гетероциклоалкила гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остальной части молекулы. Примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются перечисленным, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и тому подобное. Примеры гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются перечисленным, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиаен-2-ил, тетрагидротиаен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и тому подобное. Кроме того, термин охватывает бициклические и трициклические кольцевые структуры. Кроме того, термин "гетероциклоалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из гетероциклоалкила, а термин "циклоалкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из циклоалкила.

В настоящем описании термин "водорастворимый полимер" относится к любому полимеру, который является растворимым в водной среде. Связывание водорастворимых полимеров с полипептидами релаксина может привести к изменениям, в том числе, но не ограничиваясь этим, увеличению или изменению времени полужизни в сыворотке или увеличению или изменению времени терапевтической полужизни по отношению к исходной форме, изменению иммуногенности, изменению физических характеристик, таким как объединение агрегации и мультимерформирования, изменения связывания с рецептором, изменения связывания с одним или несколькими обязательным партнером и изменение димеризации рецептора или мультимеризации. Водорастворимый полимер может или не может иметь собственную биологическую активность и может быть использован в качестве линкера для связывания релаксина с другими веществами, в том числе, но не ограничиваясь этим, с одним или несколькими полипептидами релаксина, или с одной или несколькими биологически активными молекулами. Подходящие полимеры включают, но не ограничиваются перечисленным, полиэтиленгликоль, пропиональдегид полиэтиленгликоля, их моно- C_1 - C_{10} алкокси- или арилоксипроизводные (описано в патенте США № 5252714, который включен в настоящее описание путем ссылки), монометоксиполиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, дивиниловый эфир малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламид, декстран, производные декстрана, включая сульфат декстрана, полипропиленгликоль, полипропиленоксид/сополимер окисиэтилена, полиоксиэтилированный полиол, гепарин,

фрагменты гепарина, полисахары, олигосахары, гликаны, целлюлозу и ее производные, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу, крахмал и производные крахмала, полипептиды, полиалкиленгликоль и их производные, сополимеры полиалкиленгликолей и их производные, поливиниловый этиловый эфир и альфа-бета-поли[(2-гидроксиэтил)-DL-аспартамид, и т.п. или их смеси. Примеры таких водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются перечисленным, полиэтиленгликоль и сывороточный альбумин.

В настоящем описании термин "полиалкиленгликоль" или "поли(алкенгликоль)" относится к полиэтиленгликолю (поли(этиленгликолю)), полипропиленгликолю, полибутиленгликолю и их производным. Термин "полиалкиленгликоль" включает как линейные, так и разветвленные полимеры средней молекулярной массой от 0,1 до 100 кДа. Другие представительные варианты реализации приведены, например, в каталогах коммерческих поставщиков, таких как каталог корпорации Shearwater "Полиэтиленгликоль и его производные для биомедицинских применений" (2001).

Термин "арил" означает, если не указано иное, полиненасыщенные, ароматические, углеводородные заместители, которые могут включать одно кольцо или несколько колец (включая, но не ограничиваясь этим, от 1 до 3 колец), которые конденсированы друг с другом или связаны ковалентно. Термин "гетероарил" относится к арильной группе (или кольцу), которая содержит от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O и S, причем азот и сера необязательно окислены, а атом(ы) азота необязательно кватернизован. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через гетероатом. Неограничивающие примеры арил- и гетероарильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-дифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из вышеуказанных арил- и гетероарилкольцевых систем выбирают из группы приемлемых заместителей, описанных ниже.

Вкратце, термин "арил" при использовании в комбинации с другими терминами (включая, но не ограничиваясь перечисленными, арилокси, арилтиокси, ариалкил) включает и арильные, и гетероарильные кольца, описанные выше. Таким образом, термин "арилалкил" означает включение этих радикалов, в которых арильная группа присоединена к алкильной группе (включая, но не ограничиваясь перечисленными, бензил, фенэтил, пиридилметил и т.п.), в том числе алкильные группы, в которых атом углерода (включая метиленовую группу, но не ограничиваясь ей) заменен, например, на атом кислорода (включая, но не ограничиваясь перечисленными, феноксиметил, 2-пиридилоксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропил и т.п.).

Каждый из этих терминов (включая, но не ограничиваясь перечисленными, "алкил", "гетероалкил", "арил" и "гетероарил") включает и замещенные, и незамещенные формы указанных радикалов. Примеры заместителей для каждого типа радикалов приведены ниже.

Заместители для алкильных и гетероалкильных радикалов (в том числе групп, называемых алкилен, алкенил, гетероалкилен, гетероалкинил, алкинил, циклоалкил, гетероциклоалкил, циклоалкенил и гетероциклоалкенил) могут представлять собой одну или более из групп, выбранных из, но не ограничиваясь перечисленными, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, -галоген, $-SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $NR'C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $NRC(NR'R''R''')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, $-CN$ и $-NO_2$ в количестве от нуля до $(2m' + 1)$, где m' является общим числом атомов углерода в таком радикале. R' , R'' , R''' и R'''' независимо друг от друга представляют собой водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиалкоксигруппы или арилалкильные группы. Если соединение согласно настоящему изобретению содержит более одной группы R , например, каждая из групп R независимо выбрана как каждая группа R' , R'' , R''' и R'''' , если присутствует более одной группы этого типа. Если R' и R'' присоединены к одному атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, предполагается, что $-NR'R''$ включает 1-пирролидинил и 4-морфолинил, но не ограничивается этими радикалами. Из приведенного выше описания заместителей специалисту в данной области техники будет понятно, что термин "алкил" включает группы, содержащие атомы углерода, связанные с группами, отличными от водорода, такие как галогеналкил (включая, но не ограничиваясь перечисленными, $-CF_3$ и $-CH_2CF_3$) и ацил (включая, но не ограничиваясь перечисленными, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ и т.п.).

Как и заместители, описанные для алкильного радикала, заместители для арила и гетероарила разнообразны и выбираются из следующих: галоген, OR' , $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, -галоген, $-SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $-C(O)R'$, CO_2R' , $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $NR'C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, $-CN$ и $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, фтор- (C_1-C_4) алкокси и фтор- (C_1-C_4) алкил, но не ограничиваются перечисленными, в количестве от нуля до общего числа открытых валентностей в ароматической кольцевой системе, и при этом R' ,

R", R" и R"" независимо выбраны из водорода, алкила, гетероалкила, арила и гетероарила. Если соединение согласно настоящему изобретению содержит более одной группы R, например каждая из групп R независимо выбрана как каждая группа R', R", R" и R "", если присутствует более одной группы этого типа.

В настоящем описании термин "модулированное время полужизни сыворотки" в периоде полужизни в циркуляторном русле полураспада относительно немодифицированной формы релаксина. Время полужизни в сыворотке измеряют путем взятия крови в различные моменты времени после введения релаксина и определения концентрации молекул в каждом образце. Зависимость концентрации от времени позволяет рассчитать время полужизни в сыворотке. Увеличение времени полужизни в сыворотке желательно составляет по меньшей мере в два раза, но может быть полезно и меньшее увеличение, например, когда оно обеспечивает удовлетворительный режим дозирования или позволяет избежать токсического эффекта. В некоторых вариантах осуществления увеличение составляет по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в пять раз или по меньшей мере в десять раз.

Термин "модулированное терапевтическое время полужизни" в настоящем описании обозначает положительное или отрицательное изменение периода полужизни терапевтически эффективного количества релаксина по отношению к его немодифицированной форме. Терапевтическое время полужизни определяют путем измерения фармакокинетических и/или фармакодинамических характеристик молекулы в различные моменты времени после введения. Увеличение времени терапевтической полужизни обеспечивает особенно благоприятный режим дозирования, особенно благоприятную общую дозу или позволяет избежать нежелательного эффекта. В некоторых вариантах осуществления увеличение времени терапевтической полужизни приводит к повышению эффективности, повышению или снижению связывания модифицированных молекул с их мишенью, увеличению или уменьшению ферментативного разрушения молекулы, например, под действием протеаз, или увеличение или уменьшение другого параметра или механизма действия немодифицированной молекулы или увеличение или уменьшение рецепторопосредованного клиренса молекулы.

Термин "изолированный" применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок является свободным по меньшей мере от некоторых из клеточных компонентов, с которыми он связан в естественном состоянии, или что нуклеиновая кислота или белок были концентрированы до уровня, более высокого, чем концентрация при продуцировании *in vivo* или *in vitro*. Это может быть гомогенное состояние. Изолированные вещества могут быть в любом сухом или полусухом состоянии или в растворе, в том числе, но не ограничиваясь, водном растворе. Он может быть одним из компонентов фармацевтической композиции, которая включает дополнительно фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. Чистота и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающей молекулой, присутствующей в препарате, является, по существу, очищенным. В частности, изолированный ген отделяют от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличные от целевого гена. Термин "очищенный" означает, что нуклеиновая кислота или белок дают, по существу, одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это может означать, что нуклеиновая кислота или белок обладают степенью чистоты не менее 85%, не менее 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или более.

Термин "нуклеиновые кислоты" относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если специально не указано иное, этот термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют основные свойства, аналогичные эталонным нуклеиновым кислотам, и метаболизируется аналогично природному полинуклеотиду. Если специально не указано иное, термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая ПНА (пептидонуклеиновые кислоты), аналоги ДНК, используемые в антисмысловой технологии (фосфоротиоаты, фосфоамидаты и т.п.). Если не указано иное, конкретные последовательности нуклеиновых кислот также включают их консервативно модифицированные варианты (включая, но не ограничиваясь перечисленными, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также последовательности, явно не указанные. В частности, замена вырожденного кодона может быть осуществлена путем создания последовательности, в которой третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяется смешанным основанием базой и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzet 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)).

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. То есть описание, относящееся к полипептиду, в равной степени относится к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Условия распространяются и на природные аминокислотные полимеры, а также аминокислотные полимеры, в которых один или более аминокислотных остатков не является природной аминокислотой. В настоящем описании эти термины охватывают аминокислотные цепочки любой длины, в том числе полноразмерные белки, в которых аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

Термин "аминокислота" относится к природным и не кодируемым в природных условиях аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые действуют аналогично природным аминокислотам. Кодируемыми в природных условиях являются 20 обычных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин) и пирролизин и селеноцистеин. Аналоги аминокислот - это соединения, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, то есть углерод, который связан с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу, и группу R, такие как гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфонат. Такие аналоги содержат изменение в группах R (такие как норлейцин) или модифицированный пептидный каркас, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природные аминокислоты. Указание аминокислот включает, например, природные протеогенные L-аминокислоты, D-аминокислоты, химически модифицированные аминокислоты, такие как варианты аминокислот и их производные; природные непротеогенные аминокислоты, такие как (3-аланин, орнитин и т.д.; и химически синтезированные соединения, обладающие свойствами, которые в данной области известны как характерные для аминокислот. Примеры неприродных аминокислот включают, но не ограничиваются ими, метиламинокислоты (например, метилаланин), D-аминокислоты, гистидинподобные аминокислоты (например, 2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин, α -фторметилгистидин и α -метилгистидин), аминокислоты, имеющие дополнительную метиленовую группу в боковой цепи ("гомо" аминокислоты), и аминокислоты, в которых функциональные группы карбоновой кислоты в боковой цепи заменены на группу сульфокислоты (например, цистеиновая кислота). Встраивание неприродных аминокислот, в том числе синтетических, ненативных аминокислот, замещенных аминокислот или одной или нескольких D-аминокислот в белки согласно настоящему изобретению может быть полезно в ряде различных способов. Пептиды, содержащие D-аминокислоты и др., обладают повышенной стабильностью *in vitro* или *in vivo* по сравнению с аналогами, содержащими L-аминокислоты. Таким образом, конструирование пептидов и т.д., включающих D-аминокислоты, может быть особенно полезно, когда желательна или необходима высокая внутриклеточная стабильность. Более конкретно, D-пептиды и т.д. устойчивы к эндогенным пептидазам и протеазам, что обеспечивает улучшенную биодоступность молекулы при длительном времени жизни *in vivo*, когда такие свойства являются желательными. Кроме того, D-пептиды и т.д. не могут эффективно процессироваться для ограниченной главным комплексом гистосовместимости класса II презентации Т-хелперам и, следовательно, менее вероятно, что вызовут гуморальный иммунный ответ во всем организме.

В настоящем описании аминокислоты могут обозначаться их известными трехбуквенными обозначениями или однобуквенными обозначениями, рекомендованными Биохимической номенклатурной комиссией IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут быть обозначены соответствующими общепризнанными однобуквенными символами.

"Консервативно модифицированные варианты" относятся как к аминокислотам, так и последовательностям нуклеиновых кислот. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, "консервативно модифицированные варианты" относятся к нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, по существу, к идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода существует большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот, кодирующих данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом месте, где аланин задается кодоном, кодон может быть изменен на любой из описанных соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие изменения нуклеиновой кислоты представляют собой "молчащие изменения", которые являются одним из видов консервативных изменений. Каждая последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, также включает все возможные молчащие варианты этой нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области техники понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является только кодоном метионина, и TGG, который обычно является только кодоном триптофана) могут быть модифицированы с получением функционально идентичных молекул. Соответственно, каждое молчащее изменение нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области техники будет понятно, что отдельные замены, делеции или дополнения к последовательности нуклеиновой кислоты, пептиды, полипептиды или белка, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в последовательности, являются "консервативным модифицированным вариантом", где изменения приводят к удалению аминокислот, добавлению аминокислот или замене аминокислот на химически аналогичные аминокислоты. В таблицах консервативных замен приведены функционально аналогичные аминокислоты, как известно специалистам в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты представляют собой дополнение к и не исключают полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей изобретения.

Как известно специалистам, в таблицах консервативных замен представлены функционально аналогичные аминокислоты. Следующие восемь групп, каждая из которых содержит аминокислоты, являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (C), метионин (M)

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

Термины "идентичные" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Последовательности "по существу, идентичны", если они содержат некоторый процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. приблизительно 60% идентичности, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, примерно 90% или приблизительно 95% идентичности в пределах определенного участка), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения в указанном участке, как определено с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей (или других алгоритмов, доступных специалистам в этой области техники) или ручным выравниванием и визуальным осмотром. Это определение относится к комплементу исследуемой последовательности. Идентичность может существовать в области, которая составляет по меньшей мере 50 аминокислот или нуклеотидов в длину или более, в участке, который составляет 75-100 аминокислот или нуклеотидов в длину, или, если не указано иное, по всей последовательности полинуклеотида или полипептида. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по настоящему изобретению, включая гомологи из видов, отличных от человека, может быть получен способом, включающим стадии скрининга библиотеки в жестких условиях гибридизации с меченым зондом, имеющим полинуклеотидную последовательность согласно настоящему изобретению или ее фрагмент, и выделения полноразмерной кДНК и геномных клонов, содержащих указанную полинуклеотидную последовательность. Такие методы гибридизации хорошо известны специалистам в данной области.

Для сравнения последовательности, обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестовая и эталонная последовательности вводятся в компьютер, задаются координаты подпоследовательностей и параметры программы алгоритма. Могут быть использованы параметры по умолчанию программы или альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет процент последовательности, тождественной для исследуемых последовательностей по отношению к эталонной последовательности, на основании параметров программы.

"Окно сравнения" в настоящем описании включает указание сегмента любого числа последовательных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, как правило, приблизительно 50 до приблизительно 200, более обычно примерно от 100 до приблизительно 150, причем последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью из того же числа последовательных положений после оптимального выравнивания последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения известны специалистам в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, в том числе, но не ограничиваясь, алгоритмами местной гомологии Smith и Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482 с, с помощью алгоритма гомологии выравнивания Needleman и Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, поиском сходства методом Pearson и Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, по компьютерной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA на программном обеспечении Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или ручным выравниванием и визуальным осмотром (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 дополнение)).

Одним примером алгоритма, который пригоден для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, является BLAST и BLAST 2,0 алгоритмы, которые описаны в Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации, имеющейся в World Wide Web в ncbi.nlm.nih.gov. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используется как значения по умолчанию длиной слова (W) 11, ожидание (E) или 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP используется как значения по умолчанию

длина слова в 3 и ожидание (E) 10, и BLOSUM62 скоринг матрицы (см. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, M = 5, N = -4, и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST обычно выполняется с выключенным фильтром "низкой сложности".

В результате BLAST алгоритм также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Одним из показателей сходства предоставляемого BLAST алгоритма является наименьшая сумма вероятностей (P (N)), которая дает представление о вероятности, при которой сравнение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет происходить случайно. Например, нуклеиновые кислоты считаются похожими на эталонную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестовой нуклеиновой кислоты к нуклеиновой кислоте эталонной составляет менее 0,2, или менее примерно 0,01, или менее примерно 0,001.

Фраза "выборочно (или селективно) гибридизуется с" относится к связыванию, образованию дуплексов или гибридизации молекулы только к определенной нуклеотидной последовательности, в жестких условиях гибридизации, когда эта последовательность присутствует в сложной смеси (включая, но не ограничиваясь, с библиотекой тотальной клеточной ДНК или РНК).

Фраза "жесткие условия гибридизации" относится к гибридизации последовательностей ДНК, РНК, ПНА или других миметиков нуклеиновых кислот или их комбинаций в условиях низкой ионной силы и высокой температуры, как известно в данной области. Как правило, в жестких условиях зонд гибридизуется со своей целевой подпоследовательностью в сложной смеси нуклеиновых кислот (включая, но не ограничиваясь перечисленными, общей клеточной ДНК или РНК или библиотеки ДДНК и РНК), но не гибридизуется с другой последовательностью в сложной смеси. Жесткие условия зависят от нуклеотидной последовательности и будут отличаться в различных обстоятельствах. Более длинные последовательности гибридизуются, в частности, при более высоких температурах. Обширное руководство гибридизации нуклеиновых кислот содержится в 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). Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы быть приблизительно на 5-10°C ниже, чем температура теплового плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной рН силе. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе, рН и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных к мишени, гибридизуются с целевой последовательностью в равновесии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, в T_m , 50% зондов заняты в равновесии). Жесткие условия могут быть такими, в которых концентрация соли меньше приблизительно 1,0 М ионов натрия, обычно концентрация ионов натрия составляет от 0,01 до 1,0 М (или других солей) при рН 7,0 до 8,3, а температура составляет по меньшей мере 30°C для коротких зондов (включая, но не ограничиваясь перечисленными, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (включая, но не ограничиваясь перечисленными, более 50 нуклеотидов). Жесткие условия могут быть также достигнуты добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал может быть по меньшей мере в два раза фона, необязательно в 10 раз фона гибридизации. Примеры жестких условий гибридизации могут быть следующими: 50% формамида, 5X SSC, 1% SDS, инкубация при 42°C, или 5X SSC, 1% SDS, инкубация при 65°C, отмывка в 0,2X SSC и 0,1% SDS при 65°C. Такие отмывки могут выполняться в течение 5, 15, 30, 60, 120 или более минут.

В настоящем описании термин "эукариот" относится к организмам, относящимся к филогенетической области Eucarya, таким как животные (включая, но не ограничиваясь перечисленными, млекопитающие, насекомые, рептилии, птицы и т.д.), инфузории, растения (включая, но не ограничиваясь перечисленными, однодольные, двудольные, водоросли и др.), грибы, дрожжи, жгутиконосцы, микроспоридии, простейшие и т.п.

В настоящем описании термин "неэукариот" относится к неэукариотическим организмам. Например, к неэукариотическим организмам могут принадлежать зубактерии (включая, но не ограничиваясь перечисленными, *Escherichia coli*, *Thermus Thermophilus*, *Bacillus Stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas putida* и т.д.) или археи (включая, но не ограничиваясь этим, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такие как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium species NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum Pernix* и т.д.).

Термин "субъект" в настоящем описании относится к животному, в некоторых вариантах осуществления млекопитающим, а в других вариантах осуществления человеку, который является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Животное может быть домашним животным (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственным животным (например, коровой, овцой, свиньей, лошастью и т.п.) или лабораторным животным (например, крысой, мышью, морской свинкой и т.п.).

Термин "эффективное количество" в настоящем описании относится к такому количеству модифицированного пептида, содержащего неприродную аминокислоту, введение которого облегчает один или более симптомов заболевания, состояния или расстройства, которое лечат. Композиции, содержащие модифицированные пептиды, содержащие неприродную аминокислоту, можно вводить в качестве про-

филактического, укрепляющего и/или лечебного приема.

Термин "повышенный" или "повышение" значит увеличение или продление выраженности или продолжительности желаемого эффекта. Таким образом, в отношении усиления эффекта терапевтических агентов термин "повышение" относится к способности увеличивать или продлевать по выраженности или продолжительности влияние других терапевтических агентов в системе. "Усиливающее эффективное количество" в настоящем описании к количеству, достаточному для усиления эффекта других терапевтических агентов в желаемой системе. При использовании на пациенте эффективное количество для этой цели будет зависеть от тяжести и течения заболевания, расстройства или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и ответа на лекарства, а также заключения лечащего врача.

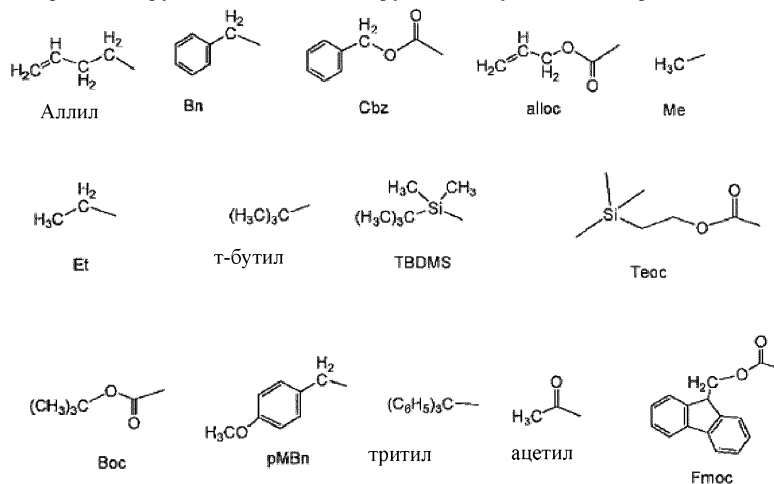
Термин "модифицированный" в настоящем описании относится к любым изменениям, внесенным в данный полипептид, таким как изменения в длине полипептидной, аминокислотной последовательности, химической структуре, котрансляционной модификации или посттрансляционной модификации полипептида. Форма термина "(модифицированный)" означает, что обсуждаемый полипептид необязательно модифицирован, т.е. что обсуждаемый полипептид может быть модифицированным или немодифицированным.

Термин "посттрансляционно модифицированный" относится к любой модификации природной или неприродной аминокислоты, которая происходит после того как эта аминокислота была встроена в полипептид. Этот термин охватывает исключительно в качестве примера котрансляционные модификации *in vivo*, котрансляционные модификации *in vitro* (например, в бесклеточной системе трансляции), посттрансляционные модификации *in vivo*, посттрансляционные модификации *in vitro*.

При профилактическом применении композиции, содержащие полипептид релаксина, вводят пациенту, подверженному риску конкретного заболевания, расстройства или состояния. Такое количество определяется как "профилактически эффективное количество". В этом случае точное количество зависит также от состояния здоровья пациента, массы и тому подобное. Определение профилактически эффективного количества находится в рамках компетенции среднего специалиста в данной области (например, клинические испытания с эскалацией дозы).

Термин "защищенный" относится к присутствию "защитной группы или фрагмента, который предотвращает реакцию химически активных функциональных групп при определенных условиях реакции. Защитная группа будет варьироваться в зависимости от типа защищаемых химически активных групп. Например, если химически активные группы аминов или гидразида, защитная группа может быть выбрана из группы, трет-бутилоксикарбонил (трет-Вос) и 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc). Если химически активные группы представляют собой тиол, защитная группа может представлять собой орто-пиридилдисульфид. Если химически активные группы являются карбоновыми кислотами, такими как бутановая или пропионовая кислота, или гидроксильными группами, защитная группа может быть бензил или алкильной группой, такой как метил-, этил или трет-бутил. Другие защитные группы, известные в данной области, могут быть также использованы или со способами и композициями, описанными здесь, в том числе фотолabile группы, такие как Nvoc и MeNvoc. Другие защитные группы, известные в данной области, могут быть также использованы со способами и композициями, описанными здесь.

В качестве примера блокирующие/защитные группы могут быть выбраны из



Другие защитные группы описаны в книге Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

При терапевтических применениях композиции, содержащие модифицированный неприродный аминокислотный полипептид, вводят пациенту, который страдает от заболевания, состояния или рас-

стройства, в количестве, достаточном для лечения или, по меньшей мере, частичного облегчения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Такое количество определяется как "терапевтически эффективное количество" и будет зависеть от тяжести и течения заболевания, расстройства или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и ответа на лекарства, а также заключения лечащего врача. Считается, что определение такого эффективного количества экспериментальным путем вполне доступно среднему специалисту (например, клинические испытания с эскалацией дозы).

Полипептиды релаксина по настоящему изобретению могут быть использованы для модуляции вазоконстрикции, образование NO, ET-1, Ang II и агрегации тромбоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения пациент, нуждающийся в этом, получает терапевтическое количество полипептидов релаксина по настоящему изобретению, которое снижает вазоконстрикцию по сравнению с базовым уровнем у пациента, нуждающегося в лечении на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, более чем на 100, 150, более чем на 150, 200%, более чем на 200%. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, обеспечивающий усиление образования NO у пациента путем введения терапевтически эффективного количества полипептида релаксина, обеспечивающего образование NO на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, более чем на 100, 150%, более чем на 150, 200%, более чем на 200%.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, терапевтическим количеством полипептидов релаксина по настоящему изобретению, которое уменьшает агрегацию тромбоцитов пациента на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, более чем на 100, 150%, более чем на 150, 200%, более чем на 200%. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, терапевтическим количеством полипептидов релаксина, уменьшающим гипертрофию. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, терапевтическим количеством полипептида релаксина по настоящему изобретению, которое уменьшает у пациента CF-стимулированный синтез белка на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, более чем на 100, 150%, более чем на 150, 200%, более чем на 200%. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, нуждающегося в этом, направленный на увеличение экспрессии ANP (натрийуретического пептида) у пациента путем введения терапевтически эффективного количества полипептида релаксина, обеспечивающего увеличение продукции NO на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, более чем на 100, 150%, более чем на 150, 200%, более чем на 200%.

Предложены способы, где ПЭГ-релаксин согласно настоящему изобретению характеризуется AUC, которая повышена по сравнению с диким типом релаксина в 10, 15 раз, более чем в 15, 20 раз, более чем в 20, 25 раз, более чем в 25, 30 раз, более чем в 30, 35 раз, более чем в 35, 40 раз, более чем в 40, 45 раз, более 45, 50 раз, более 50, 55 раз, более 55, 60 раз, более 60 раз, 65-кратное увеличение, более 65 раз, 70 раз, более 70 раз, 75 раз, более 75 раз, 80 раз, более 80 раз, 85 раз, более 85 раз, 90 раз, более 90 раз, 95 раз, более 95 раз, 100 раз, более 100 раз.

Термин "лечение" используется для обозначения профилактических и/или терапевтических процедур.

Пептиды, содержащие ее кодируемые в природных условиях аминокислоты, согласно настоящему изобретению могут включать изотопно-меченые соединения с одним или более атомами, замененными атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, которые обычно встречаются в природных условиях. Примеры изотопов, которые могут быть включены в настоящие соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl соответственно. Некоторые изотопно-меченые соединения, описанные здесь, например те, в которых радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C включены, могут быть полезны в лекарстве и/или субстрате для исследования распределения в тканях. Кроме того, замещение изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H , может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные их большей метаболической стабильностью, например увеличение периода полужизни *in vivo* или уменьшение необходимой дозы.

Все изомеры, включая, но не ограничиваясь перечисленными, диастереомеры, энантиомеры и их смеси рассматриваются как часть композиций, описанных здесь. В дополнительных или других вариантах осуществления пептиды, содержащие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, метаболизируются при введении в организм, нуждающийся в этом, с образованием метаболита, который затем используется для обеспечения желаемого эффекта, в том числе желаемого терапевтического эффекта. В дальнейших или дополнительных вариантах осуществления представлены активные метаболиты полипептидов, содержащих не кодируемых в природных условиях закодированных аминокислоты.

В некоторых ситуациях полипептиды, содержащие не кодируемых в природных условиях закодированных аминокислоты, могут существовать в виде таутомеров. Кроме того, полипептиды, содержащие не кодируемые в природных условиях закодированных аминокислоты, описанные здесь, могут существовать в несольватированных, а также сольватированных формах, образованных при контакте с фарма-

цветически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и тому подобное. Сольватированные формы считаются также описанными здесь. Специалистам в данной области будет понятно, что некоторые соединения здесь могут существовать в нескольких таутомерных формах. Все такие таутомерные формы рассматриваются как часть композиций, описанных здесь.

Если не указано иное, используются обычные способы масс-спектропии, ЯМР, ВЭЖХ, белковой химии, биохимии, технологии рекомбинантной ДНК и фармакологии, находящиеся в пределах компетенции среднего специалиста.

Подробное описание

I. Введение.

Полипептиды релаксина, содержащие по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, предложены в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид релаксина содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, которая включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна посттрансляционная модификация включает присоединение молекулы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, метку, краситель, полимер, водорастворимый полимер, производные полиэтиленгликоля, фотокросслинкер, радионуклид, цитотоксические соединения, лекарство, аффинную метку, фотоаффинную метку, реактивные соединения, смолы, второй белок или полипептид или аналог полипептида, антиген или его фрагмент, металла комплексообразователь, кофактор, жирные кислоты, углеводы, полинуклеотид, ДНК, РНК, антисмысловой полинуклеотид, сахар, водорастворимый дендример, циклодекстрин, ингибирующую рибонуклеиновую кислоту, биоматериал, наночастицы, спин-метки, флуорофор, металл-содержащую группу, радиоактивную группу, новые функциональные группы, группы, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотоактивируемый фрагмент, группу, возбуждаемую активным излучением, фотоизомеризующийся фрагмент, биотин, производное биотина, аналог биотина, фрагмент, включающий тяжелый атом, химически расщепляемую группу, фоторасщепляемую группу, удлиненную боковую цепь, углеродсвязанные сахара, редокс-активный агент, тиаминокислоту, токсичный фрагмент, меченный изотопами фрагмент, биофизический зонд, фосфоресцирующие группы, хемилюминесцентные группы, электронной плотности группу, магнитную группу, интеркалирующую группу, хромофор, агент передачи энергии, биологически активное вещество, обнаруживаемое меткой, небольшие молекулы, квантовую точку, нанотрансмиттер, радионуклеотид, радиотрансмиттер, агент нейтронного захвата или любые комбинации перечисленных выше молекул, или любые другие желательные соединения или вещества, содержащие вторую реактивную группу, способную реагировать по меньшей мере с одной неприродной аминокислотой, содержащей первую реактивную группу, с использованием химических методик которая, как известно специалистам, может быть подходящей для конкретных реактивных групп. Например, первая реактивная группа представляет собой алкильную группу (включая, но не ограничиваясь перечисленными, в неприродной аминокислоте пропаргиллоксибензилаланине, где пропаргильную группу также иногда называют ацетиленовым фрагментом), и вторая реактивная группа представляет собой азидогруппу, и в этом случае используется химическая методика [3+2] циклоприсоединения. В другом примере первая реактивная группа представляет собой азидогруппу (включая, но не ограничиваясь перечисленными, в неприродной аминокислоте р-азидо-L-фенилаланин), а вторая реактивная группа представляет собой алкильную группу. В некоторых вариантах осуществления модифицированного полипептида релаксина по настоящему изобретению по меньшей мере одна неприродная аминокислота (включая, но не ограничиваясь перечисленными, неприродную аминокислоту, содержащую функциональную кетогруппу), содержащая по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, используется в случае, если по меньшей мере одна посттрансляционная модификация включает сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация осуществляется *in vivo* в эукариотической клетке или в неэукариотической клетке. Линкер, полимер, водорастворимый полимер или другие молекулы могут быть связаны с молекулой полипептида. Молекула может быть напрямую связана с полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления белок включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая осуществляется *in vivo* в одной клетке-хозяине, если посттрансляционная модификация обычно не может быть осуществлена в клетке-хозяине другого типа. В некоторых вариантах осуществления белок включает по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая осуществляется в естественных условиях в эукариотической клетке, причем данная посттрансляционная модификация обычно не может быть осуществлена в неэукариотической клетке. Примеры посттрансляционных модификаций включают, но не ограничиваются перечисленными, гликозилирование, ацетилирование, ацилирование, модификации липидами, пальмитоилирование, добавление пальмитата, фосфорилирование, модификации, присоединяющие гликолипиды и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот для гликозилирования, ацетилирования, ацилирования, модификации липидами, пальмитоилирования, присоединения пальмитата, фосфорилирования или модификаций присоединения гликолипидов к полипептиду. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более не кодируемых в при-

родных условиях аминокислот для гликозилирования полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более кодируемых в природных условиях аминокислот для гликозилирования, ацетилирования, ацилирования, модификации липидами, пальмитоилирования, присоединения пальмитата, фосфорилирования или присоединения гликолипидов к полипептиду. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более кодируемых в природных условиях аминокислот для гликозилирования полипептида.

В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или несколько делеций, которые повышают гликозилирование полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование в различных аминокислотах полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или несколько делеций, которые повышают гликозилирование в различных аминокислотах в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование на не кодируемой в природных условиях аминокислоте в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование на природной аминокислоте в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование на кодируемых в природных условиях аминокислотах в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления полипептид релаксина содержит одну или более введенных путем добавления и/или замены не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые увеличивают гликозилирование на не кодируемой в природных условиях аминокислоте в полипептиде.

В одном из вариантов осуществления посттрансляционная модификация включает прикрепление олигосахарида к аспарагину связью GlcNAc-аспарагин (включая, но не ограничиваясь перечисленными, где олигосахарид включает (GlcNAc-Man), 2-Man-GlcNAc-GlcNAc и т.п.). В другом варианте осуществления посттрансляционная модификация включает прикрепление олигосахарида (включая, но не ограничиваясь перечисленными: Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc и т.д.), к серину или треонину связью GalNAc-серин, GalNAc-треонин, GlcNAc-серин или GlcNAc-треонин. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид согласно данному изобретению может содержать последовательность секреции или локализации, эпитопные метки, метки FLAG, полигистидиновые метки, слитый GST и/или тому подобное. Примеры сигнальных последовательностей секреции включают, но не ограничиваются перечисленными, прокариотическую сигнальную последовательность секреции, эукариотическую сигнальную последовательность секреции, 5'-оптимизированную для бактериальной экспрессии, новую сигнальную последовательность секреции, сигнальную последовательность секреции пектат лиазы, сигнальную последовательность секреции OMP A и фаговую сигнальную последовательность секреции. Примеры сигнальных последовательностей секреции, включают, но не ограничиваются, STII (прокариотическая), Fd GIII и M13 (фаговая), Bgl2 (дрожжевая) и сигнальная последовательность bla, полученная из транспозонов. Любая такая последовательность может быть изменена, чтобы обеспечить желаемое влияние на полипептид включая, но не ограничиваясь перечисленными, замены одной сигнальной последовательности другой сигнальной последовательностью, замену лидерной последовательности с другой лидерной последовательностью и т.д.

Белок или полипептид, представляющий интерес, может содержать по меньшей мере одну, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или десять или более не природных аминокислот. Не природные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными, например может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных сайтов в белке, которые содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных не природных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна, но меньше всех аминокислот конкретного вида, присутствующих в природном варианте версии белка, заменены не природными аминокислотами.

Настоящее изобретение относится к способам и композициям на основе релаксина, содержащего по меньшей мере одну не кодируемую в природных условиях аминокислоту. Встраивание по меньшей мере одной не кодируемой в природных условиях аминокислоты в релаксин может обеспечить возможности применения методов химии конъюгирования, которые включают специфические химические реакции, в том числе, но не ограничиваясь этим, с одной или более не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, в то время реакции с обычными 20 аминокислотами не происходят. В некоторых вариантах осуществления релаксин, содержащий не природные аминокислоты, связан с водорастворимым полиме-

ром, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), через боковую цепь не кодируемой в природных условиях аминокислоты. Это изобретение обеспечивает высокоэффективный способ селективной модификации белков с производными ПЭГ, который включает селективное встраивание генетически не кодируемой аминокислоты, в том числе, но не ограничиваясь, аминокислот, содержащих функциональные группы или заместители, не встречающиеся в 20 природных аминокислотах, в том числе, но не ограничиваясь этим, кетонную, азидную или ацетиленовую группы, в белки в ответ на селекторный кодон и последующие модификации этих аминокислот соответствующими реактивными производными ПЭГ. После встраивания боковые цепи аминокислот могут быть изменены с использованием химических методик, которые, как известно специалистам в данной области, подходят для конкретных функциональных групп или заместителей, присутствующих в не кодируемой в природных условиях аминокислоте. Для использования в настоящем изобретении для включения водорастворимого полимера в белок можно использовать разнообразные химические методики. Такие методики включают, но не ограничиваются перечисленным: [3+2] реакции циклоприсоединения гуйсгена (см., например, Padwa, A. в *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B.M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; и, Huisgen, R. в *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) с, в том числе, но не ограничиваясь, ацетиленовыми или азидными производными, соответственно.

Поскольку реакция [3+2] циклоприсоединения хуйсгена предполагает циклоприсоединение, а не реакции нуклеофильного замещения, белки могут быть модифицированы с чрезвычайно высокой селективностью. Реакция может быть проведена при комнатной температуре в водной среде с отличной региоселективностью (1,4>1,5) путем добавления каталитических количеств Cu (I) соли в реакционную смесь. См., например, Tornøe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; и, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; и WO 03/101972. Молекулы, которые могут быть добавлены к белку согласно настоящему изобретению [3+2] путем циклоприсоединения, включают практически любую молекулу с подходящей функциональной группой или заместителем включая, но не ограничиваясь этим, азидо- или ацетиленпроизводные. Эти молекулы могут быть присоединены к неприродной аминокислоте с ацетиленовой группой, в том числе, но не ограничиваясь, к *p*-пропаргилфенилаланину, или азидогруппой, в том числе, но не ограничиваясь этим, *p*-азидофенилаланин соответственно.

Пятичленные кольца образующиеся в результате [3+2] циклоприсоединения гуйсгена, обычно не обратимы в восстановительных средах и являются устойчивыми к гидролизу в течение длительного времени в водной среде. Следовательно, физические и химические характеристики широкого спектра веществ могут быть изменены в водной среде с использованием активных производных ПЭГ согласно настоящему изобретению. Что еще более важно, поскольку азидная и ацетиленовая группы специфичны друг для друга (и, например, не вступают в реакцию с любой из 20 общих генетически закодированных аминокислот), белки могут быть модифицированы в одном или нескольких конкретных сайтах с чрезвычайно высокой селективностью.

Настоящее изобретение также обеспечивает водорастворимые и устойчивые к гидролизу производные производных ПЭГ и близких гидрофильных полимеров, содержащих один или более ацетиленовых или азидных фрагментов. ПЭГ-полимер, который содержит производные ацетилена, является весьма избирательным в отношении связывания с азидогруппой, которая селективно встраивается в белок в ответ на селекторный кодон. Кроме того, производные полимера ПЭГ, которые содержат азидные группы, являются весьма избирательными для соединения с ацетиленовой группой, которые селективно встраиваются в белок в ответ на селекторный кодон.

Более конкретно, азидные группы включают, но не ограничиваются перечисленными, алкилазиды, арилазиды и производные от этих азидов. Производные алкил- и арилазидов могут включать другие заместители при условии сохранения ацетилен-специфической реактивности. Ацетиленовые группы включают алкил- и арилацетилены и производные каждого из них. Производные алкил- и арилацетиленов могут включать другие заместители при условии сохранения азид-специфической реактивности. Настоящее изобретение обеспечивает конъюгаты веществ, содержащих разнообразные функциональные группы, заместители или фрагменты, с другими веществами, включая метку, краситель, полимер, водорастворимый полимер, производные полиэтиленгликоля, фотокросслинкер, радионуклид, цитотоксические соединения, лекарство, аффинную метку, фотоаффинную метку, реактивные соединения, смолы, второй белок или полипептид или полипептида аналоги, антитело или его фрагмент, металл комплексобразователь, кофактор, жирные кислоты, углеводы, полинуклеотид, ДНК, РНК, антисмысловой полинуклеотид, сахар, водорастворимый дендример, циклодекстрин, ингибирующую рибонуклеиновую кислоту, биоматериал, наночастицы, спин-метки, флуорофор, металлсодержащий фрагмент, радиоактивный фрагмент, новые функциональные группы, группы, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотоативную группу, группу, возбуждаемую активным излучением, фотоизомеризующийся фрагмент, биотин, производное биотина, аналог биотина, группу, содержащую тяжелый атом, химически расщепляемую группу, фоторасщепляемую группу, удлиненную боковую цепь, углеводсвязанные сахара, редокс-активный агент, тиаминокислоту, токсичный фрагмент, меченный изотопами фрагмент, биофизический зонд, фосфоресцирующие группы, хемилюминесцентные группы, электронной плотности группу, магнитную группу, интеркалирующую группу, хромофор, агент

передачи энергии, биологически активное вещество, обнаруживаемое меткой, небольшие молекулы, квантовую точку, нанотрансмиттер, радионуклеотид, радиотрансмиттер, агент нейтронного захвата или любые комбинации выше, или любые другие желательные соединения или вещества, но не ограничиваясь ими. Настоящее изобретение включает также конъюгаты веществ, имеющих азидные или ацетиленовые группы, с производными ПЭГ полимера, содержащими соответствующие ацетиленовые или азидные группы. Например, полимер ПЭГ, содержащий азидную группу, может быть связан с биологически активной молекулой в положении в белке, которая содержит не кодируемую аминокислоту с ацетиленовой функциональной группой. Связь, которой ПЭГ и биологически активные молекулы могут быть связаны, включает, но не ограничивается, продукт [3+2] циклоприсоединения гуйсгена.

Как хорошо известно в данной области, ПЭГ может быть использован для изменения поверхности биоматериалов (см., например, патент США 6610281; Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3 (1): 125-136 (2000), которые включены в настоящий документ путем ссылки). Изобретение также включает биоматериалы, имеющие поверхность, содержащую один или несколько реактивных азидных или ацетиленовых сайтов и один или более азид- или ацетиленсодержащих полимеров согласно настоящему изобретению, связанных с поверхностью связью [3+2] циклоприсоединения ацетиленовые или азидные группы. Биоматериалы и другие вещества могут быть также связаны с производными азид- или ацетилен-активированных полимеров путем образования связи, отличной азидной или ацетиленовой связи, например, через связи, содержащие карбоновую кислоту, амин, спирт или тиол, при этом азидная или ацетиленовая группа остается свободной для последующих реакций.

Изобретение включает способ синтеза азид- и ацетиленсодержащих полимеров согласно настоящему изобретению. В случае азидсодержащих производных ПЭГ азид может быть связан непосредственно с атомом углерода полимера. Кроме того, азидсодержащие производные ПЭГ могут быть получены путем присоединения связывающего агента, который имеет азидную группу на одном конце к обычным активированным полимерам, и полученный в результате полимер содержит на конце азидную группу. В случае ацетиленсодержащих производных ПЭГ ацетилен может быть связан непосредственно с атомом углерода полимера. Кроме того, ацетиленсодержащие производные ПЭГ могут быть получены путем присоединения связывающего агента, который имеет ацетиленовую группу на одном конце, к обычному активированному полимеру, полученный таким образом полимер имеет ацетиленовую группу на конце.

Более конкретно, в случае азидсодержащих производных ПЭГ водорастворимый полимер, содержащий по меньшей мере одну активную гидроксильную группу, подвергают реакции с получением замещенного полимера, содержащего более реактивную группу, такую как мезилат, трезилат, тозилат или галогенную уходящую группу. Подготовка и использование производных ПЭГ, содержащих сульфонил-галокислоты, атомы галогена и другие уходящие группы, хорошо известны специалистам в данной области. Полученный замещенный полимер затем подвергают реакции для замещения азидной группы в конце полимера на более реактивную группу. Кроме того, водорастворимый полимер, имеющий по меньшей мере один активный нуклеофильный и электрофильный фрагмент, подвергают реакции со сшивающим агентом, который содержит на одном конце азид, в результате чего образуется ковалентная связь между полимером ПЭГ и сшивающим агентом, и азидная группа располагается в конце полимера. Нуклеофильные и электрофильные группы, включают амины, тиолы, гидразиды, гидразины, спирты, карбоновые кислоты, альдегиды, кетоны, тиозифы и т.п., известные специалистам в данной области.

Более конкретно, в случае ацетиленсодержащих производных ПЭГ водорастворимый полимер, имеющий по меньшей мере один активный гидроксильный остаток, подвергается реакции замены галогена или другой активированной уходящей группы из предшественника, который содержит ацетилен фрагмент. Кроме того, водорастворимый полимер, имеющий по меньшей мере один активный нуклеофильный и электрофильный фрагмент, подвергается реакции со сшивающим агентом, который имеет ацетилен на одном конце, так что ковалентная связь образуется между ПЭГ полимера и сшивающего агента и ацетиленовой частью, позиционируемой в конце полимера. Использование галогенных фрагментов, активированной уходящей группы, нуклеофильного и электрофильного фрагментов в контексте органического синтеза и подготовки и использования ПЭГ производных хорошо известно практикующим в данной области.

Кроме того, изобретение относится к способу селективной модификации с добавлением других веществ в модифицированный белок, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ и производные ПЭГ, содержащие азидную или ацетиленовую группы. Азид- и ацетиленсодержащие производные ПЭГ могут быть использованы для изменения свойств поверхности и молекул, если важны биосовместимость, стабильность, растворимость и отсутствие иммуногенности, обеспечивая в то же время возможность более селективного присоединения производных ПЭГ к белкам, чем было ранее известно в данной области. Основные способы рекомбинантных нуклеиновых кислот для применения в настоящем изобретении.

В многочисленных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие целевой полипептид релаксина, изолируют, клонируют и часто изменяют с использованием рекомбинантных методик. Такие варианты осуществления используются, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным: для экспрессии белка или при создании вариантов, производных, экспрессионных кас-

сет или других последовательностей, являющихся производными полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления последовательности, кодирующие полипептиды согласно настоящему изобретению, функционально связаны с гетерологичным промотором.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид релаксина, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты, может быть синтезирована на основе аминокислотной последовательности исходного полипептида, в том числе имеющего аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, но не ограничиваясь ими, с последующим изменением нуклеотидной последовательности с осуществлением введения (например, встраивания или замены) или удаления (например, делеции или замены) соответствующих аминокислотных остатков (а). Нуклеотидная последовательность может быть легко изменена сайт-направленным мутагенезом в соответствии с обычными способами. Кроме того, последовательность нуклеотидов может быть получена путем химического синтеза, в том числе, но не ограничиваясь, с помощью синтезаторов олигонуклеотидов, причем олигонуклеотиды разрабатывают на основе аминокислотной последовательности целевого полипептида, и предпочтительно выбирают те кодоны, которые являются предпочтительными в клетке-хозяине, в которой будет продуцироваться рекомбинантный полипептид.

В настоящем изобретении используются рутинные методы в области рекомбинантной генетики. Базовые тексты, раскрывающие общие способы, используемые в данном изобретении, включают Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); и *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)).

Общие тексты, которые описывают молекулярно-биологические методы включают 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") и *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. (с дополнениями до 1999) ("Ausubel"). Эти тексты описывают мутагенез, использование векторов, промоторы и многие другие важные вопросы, связанные, среди прочего, с созданием гена или полинуклеотида, которые содержат селекторный кодон, для продукции белков, которые включают неприродные аминокислоты, ортогональные тРНК, ортогональные синтетазы и их пары.

Различные типы мутагенеза, которые используются в настоящем изобретении для различных целей, включая, но не ограничиваясь перечисленными, для получения новых синтетаз или тРНК, осуществления мутаций молекул тРНК, осуществления мутаций полинуклеотидов, кодирующих синтетазы, для получения библиотек тРНК, для получения библиотек синтетаз, для получения селекторных кодонов кодонов, для встраивания селекторных кодонов, которые кодируют неприродные аминокислоты в целевом белке или полипептиде. Они включают, но не ограничиваются перечисленным, сайт-направленный, случайный точечный мутагенез, гомологичную рекомбинацию, перетасовку ДНК или другие рекурсивные способы мутагенеза, химерные конструкции, мутагенез с использованием урацилсодержащих матриц, олигонуклеотид-направленный мутагенез, мутагенез ДНК, модифицированной фосфоротиоатами, мутагенез с использованием дуплексной ДНК с пробелами и т.п., РСТ-опосредованный мутагенез, или любую их комбинацию. Дополнительные подходящие способы включают репарацию точечных несоответствий, мутагенез с использованием штаммов-хозяев с нарушенным механизмом репарации, рестрикция-селекция и рестрикция-очистка, делеционный мутагенез, мутагенез путем полного синтеза гена, репарация двунитевых разрывов и тому подобное. Мутагенез, включая, но не ограничиваясь мутагенезом с использованием химерных конструкций, также включен в настоящее изобретение. В одном варианте осуществления мутагенез может осуществляться на основе известной информацией о природной молекуле или измененных или мутированных природных молекулах, включая последовательность, сравнения последовательностей, физические свойства, вторичные, третичные или четвертичные структуры, кристаллические структуры или подобные.

Тексты и примеры, приведенные в настоящем описании, описывают эти процедуры. Дополнительную информацию можно найти в следующих публикациях и источниках, на которые эти публикации ссылаются.

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); Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); и, I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995).

Дополнительную информацию о многих из перечисленных выше способах можно найти в разделе

Methods in Enzymology, Vol. 154, в котором также описываются полезные элементы управления для устранения проблемы при использовании различных способов мутагенеза.

Олигонуклеотиды, например, для использования в мутагенезе согласно настоящему изобретению, например, мутации библиотек синтезатов или изменения тРНК, обычно синтезируют химически по твердофазному фосфорамидитно-триэфиру методу, описанному Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20): 1859-1862, (1981), например, с использованием автоматического синтезатора, как описано в Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984).

Изобретение также относится к эукариотическим клеткам-хозяевам, неэукариотическим клеткам-хозяевам, и организмам для встраивания неприродных аминокислот *in vivo* с использованием ортогональных пар тРНК/РС. Клетки-хозяева генетически модифицируют (включая, но не ограничиваясь следующими процедурами, трансформация, трансдукция или трансфекция) полинуклеотидами согласно настоящему изобретению или конструкциями, которые включают полинуклеотид согласно настоящему изобретению, включая вектор согласно настоящему изобретению, но не ограничиваясь им, который может быть, например, вектором клонирования или вектором экспрессии. Например, участки, кодирующие ортогональную тРНК, ортогональную тРНК синтетазу и белок, который предстоит получить, необязательно функционально связываются элементами контроля экспрессии генов, которые способны функционировать в целевой клетке-хозяине. Вектор может быть, например, в виде плазмиды, космиды, фага, бактерии, вируса, голого полинуклеотида или конъюгированного полинуклеотида. Векторы вводят в клетки и/или микроорганизмы стандартными способами, в том числе электропорацией (From M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)), заражением вирусными векторами, путем бомбардировки мелкими частицами с нуклеиновой кислотой с высокой скоростью, либо в матрице из мелких гранул или частиц, или на поверхности (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)), и/или тому подобное. Методы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки *in vitro*, включают использование липосом, микроинъекции, слияние клеток, использование DEAE-декстрана, осаждение фосфатом кальция и др. Методы переноса генов *in vivo* включают, но не ограничиваются перечисленным, вирусную трансфекцию (обычно ретровирусную) векторов и трансфекцию с использованием липосом с белками оболочки вируса [Dzau et al., Trends in Biotechnology 11:205-210 (1993)]. В некоторых ситуациях может быть желательно обеспечить источник нуклеиновой кислоты с агентом, который нацелен на клетки-мишени, таким как антитела, специфичные к белкам мембран поверхности клетки или клетке-мишени, лиганд рецептора на клетке-мишени и т.д. Если используют липосомы, белки, которые связываются с белком поверхности клеточной мембраны, связанным с эндоцитозом, могут быть использованы для нацеливания и/или облегчения поглощения, например, белки капсида или их фрагменты, тропные к определенному типу клеток, антитела к белкам, которые подвергаются интернализации в ходе обращения, белки, которые направляют внутриклеточную локализацию и увеличивают время полужизни в клетке.

Модифицированные клетки-хозяева можно выращивать в обычных питательных средах с соответствующими изменениями для таких процедур, как, например, этапы скрининга, активации промоторов или селекции трансформантов. Эти клетки дополнительно можно культивировать в трансгенных организмах. Другие полезные ссылки, описывающие, среди прочего, выделение и культивирование клеток (например, для последующего выделения нуклеиновых кислот), включают Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York и цитируемые в них источники; Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Существует несколько известных способов введения нуклеиновой кислоты в клетки, любой из которых может быть использован в настоящем изобретении. К ним относятся слияние клеток-хозяев с бактериальными протопластами, содержащими ДНК, электропорация, бомбардировка частицами и инфицирование вирусными векторами (обсуждается ниже) и др. Бактериальные клетки могут быть использованы для увеличения количества плазмиды, содержащей ДНК-конструкции согласно настоящему изобретению. Бактерии выращивают до лог-фазы, и плазмиды в бактериях могут быть выделены различными способами, известными в данной области (см., например, Sambrook). Кроме того, существуют коммерческие наборы для очистки плазмид от бактерий, (см., например, EasyPrep™, FlexiPrep™, оба от Pharmacia Biotech; StrataClean™ от Stratagene, и QIAprep™ от Qiagen). Выделенные и очищенные плазмиды далее обрабатывают для получения других плазмид, используемых для трансфекции клеток или включения в соответствующие векторы для инфицирования организмов. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации транскрипции и трансляции и промоторы, которые можно использовать для регуляции экспрессии конкретной целевой нуклеиновой кислоты. Векторы необязательно могут содержать общие кассеты экспрессии, содержащие по меньшей мере одну независимую терминаторную последовательность, последовательности, которые обеспечивают репликацию кассеты в эукариотах, или прокариотах, или в обоих типах организмов (включая, но не ограничиваясь перечисленными, челночные векторы) и маркеры селекции для прокариотических и эукариотических

систем. Векторы, подходящие для репликации и интеграции в эукариотах, или прокариотах, или в обоих типах организмов. См., Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., et al., *Protein Expr. Purif.* 6(1): 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (все см. выше). Каталог бактерий и бактериофагов, пригодных для клонирования, предоставлен, например, ATCC, например, *The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage* (1992) Gherna et al. (eds), опубликованном ATCC. Дополнительные основные процедуры секвенирования, клонирования и других аспектов молекулярной биологии и теоретические соображения, лежащих в основе, также можно найти в Watson et al. (1992) *Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books*, NY. Кроме того, практически любая нуклеиновая кислота (и практически любая меченная нуклеиновая кислота, стандартная или нестандартная) могут быть индивидуально или стандартно заказаны в любом из различных коммерческих источников, таких как Midland Certified Reagent Company (Midland, TX доступно на World Wide Web в mcrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA доступно на World Wide Web в mcrc.com), Express Gen Inc. (Chicago, IL доступно на World Wide Web в expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) и многих других.

Селекторные кодоны.

Выбор кодонов согласно настоящему изобретению расширяет рамки генетических кодонов механизма биосинтеза белка. Например, селекторный кодон включает, но не ограничивается перечисленными, уникальные кодоны из трех оснований, нонсенс-кодоны, такие как стоп-кодон, в том числе, но не ограничиваясь причисленными, амбер-кодон (UAG), охра-кодон или опал-кодон (UGA), неприродный кодон, кодоны из четырех или более оснований, редкие кодоны или тому подобное. Как очевидно специалистам в данной области техники, многие из числа селекторных кодонов могут быть введены в целевой ген или полинуклеотид, в том числе, но не ограничиваясь этим, один или более, два или более, три или более, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более в одном полипептиде, кодирующем по меньшей мере часть полипептида релаксина. Также для специалистов очевидно, многие из числа селекторных кодонов могут быть введены в целевой ген или полинуклеотид, в том числе, но не ограничиваясь этим, один или более, два или более, три или более, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и более вместе в полинуклеотидных последовательностях А-цепи и В-цепи, кодирующих по меньшей мере часть полипептида релаксина.

В одном из вариантов осуществления способы включают применения селекторного кодона, который является стоп-кодоном, для встраивания одной или более неприродных аминокислот *in vivo*. Например, получают О-тРНК которая распознает стоп-кодон, в том числе, но не ограничиваясь, UAG, и аминоацилируется О-РСазой желаемой неприродной аминокислотой. Эта О-тРНК не распознается аминоацил-тРНК синтетазой хозяина. Обычный сайт-направленный мутагенез может быть использован для введения стоп-кодона, в том числе, но не ограничиваясь, TAG, в целевой сайт целевого полипептида. См., например, Sayers, J.R., et al. (1988), 5'-3'-Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 16:791-802. При объединении О-РС, О-тРНК и нуклеиновой кислоты, которая кодирует целевой полипептид, *in vivo*, неприродная аминокислота будет встраиваться в ответ на кодон UAG с образованием пептида, содержащего неприродную аминокислоту в заданном положении.

Включение неприродных аминокислот *in vivo* может быть сделано без значительных нарушений эукариотической клетки-хозяина. Например, из-за эффективности супрессии кодона UAG, которая определяется конкуренцией между О-тРНК, включая, но не ограничиваясь супрессорной тРНК для амбер-кодона, и эукариотических ригизинг-факторов (включая eRF, но не ограничиваясь им) (который связывается с стоп-кодоном и инициирует высвобождение растущего пептида из рибосомы), эффективность супрессии можно модулировать, среди прочего, повышением уровня экспрессии О-тРНК, и/или супрессорной тРНК, но не ограничиваясь этими факторами.

Неприродные аминокислоты также могут быть закодированы редкими кодонами. Например, оказалось, что при пониженной концентрации аргинина в *in vitro* реакции синтеза белка редкий кодон аргинина, AGG, эффективно встраивает Ала при участии синтетической тРНК, ацилирующий аланином. См., например, Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). В этом случае синтетическая тРНК конкурирует с природной тРНК Arg, которая существует в виде минорных вариантов в кишечной палочке. Некоторые организмы не используют все триплетные кодоны. Не соответствующий никакой аминокислоте кодон AGA в *Micococcus luteus* был использован для встраивания аминокислот при транскрипции/трансляции *in vitro* в экстракте. См., например, Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997). Компоненты данного изобретения могут быть созданы с возможностью использования этих редких кодонов *in vivo*.

Выбор кодонов может также содержать расширенные кодоны, в том числе, но не ограничиваясь этим, кодоны из четырех или пяти оснований, таких как кодоны из четырех, пяти, шести или более кодонов. Примеры кодонов из четырех оснований включают, но не ограничиваются перечисленными, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU и т.п. Примеры кодонов из пяти оснований включают, но не ограничиваются перечисленным, AGGAC, CCCC, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC и тому подобное. В частности, изобретение включает использование расширенных кодонов на подавления сдвига рамки. Кодоны из четырех или пяти оснований могут обеспечивать встраивание, в том числе, но не ограничиваясь этим, одну или более неприродных аминокислот в один белок. Например, в присутствии мутантной О-тРНК, включая специфические тРНК-супрессоры сдвига рамки с антикодон петлей, но не ограничиваясь ими, например, с антикодонами петлями размером по меньшей мере 8-10 нуклеотидов, кодоны из четырех

или более оснований соответствуют одной аминокислоте. В других вариантах осуществления антикодонные петли могут декодировать, среди прочего, кодон по меньшей мере из четырех оснований, кодон по меньшей мере из пяти оснований, кодон по меньшей мере из шести оснований или более, но не ограничиваясь этим. Поскольку существует 256 возможных кодонов из четырех оснований, использование кодонов из четырех или более оснований позволяет закодировать в одной клетке несколько неприродных аминокислот. См., 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.

Например кодоны из четырех оснований были использованы для встраивания неприродных аминокислот в белки с использованием синтетических методик *in vitro*. См., например, Ma et al., (1993) *Biochemistry*, 32:7939; и Hohsaka et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:34. CGGG и AGGU были использованы одновременно для встраивания 2-нафтилаланина и NBD-производного лизина в стрептавидин *in vitro* с двумя химически ацилированными tPHK-супрессорами сдвига рамки. См., например, Hohsaka et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194. В исследовании *in vivo* Moore и другие исследовали способность производных tPHK Leu с антикодонами NCUA к супрессии кодонов UAGN (N может представлять собой U, A, G или C), и обнаружили, что четверка UAGA может быть расшифрована tPHK Leu с антикодоном UCUA с эффективностью от 13 до 26% с небольшим декодированием в рамке 0 или -1. См., Moore et al., (2000) *J. Mol. Biol.*, 298:195. В одном варианте осуществления настоящего изобретения могут быть использованы расширенные кодоны на основе редких кодонов или нонсенс-кодонов, которые могут уменьшить проскакивание миссенс-последовательностей и и супрессию сдвига рамки в других нежелательных сайтах.

Для данной системы селекторный кодон может также включать один из уникальных кодонов из трех оснований, если эндогенные системы не используют (или редко используют) природный базовый кодон. Например, это включает систему, в которой отсутствует tPHK, которая распознает природный трехосновный кодон, и/или системы, в которых трехосновный кодон является редким кодоном.

Выбор кодонов необязательно включает неприродные пары оснований. Эти неприродные пары дополнительно расширяют существующий генетический алфавит. Одна дополнительная пара оснований увеличивает число триплетных кодонов с 64 до 125. Свойства третьей пары оснований включают стабильное и селективное спаривание оснований, эффективное и надежное ферментативное встраивание в ДНК под действием полимеразы, и эффективное продолжение удлинения праймера после синтеза новой неприродной пары оснований. Описания неприродных пар оснований, которые могут быть адаптированы для способа и композиции включают, например, Hirao, et al., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, *Nature Biotechnology*, 20:177-182. См. также, Wu, Y., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630. Другие соответствующие публикации перечислены ниже.

Для использования *in vivo* неприродный нуклеозид является мембранопроницаемым и фосфорилируется с образованием соответствующего трифосфата. Кроме того, расширенная генетическая информация является стабильной и не разрушается под действием клеточных ферментов. В предшествующих работах Беннер и других использовали модель водородных связей, которые отличаются от канонических Уотсона и Крика пар, самым интересным примером которых являются пары iso-C: iso-G. См., например, Switzer et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; и Piccirilli et al., (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602. Эти основания обычно ошибочно спариваются до некоторой степени с природными базами и не могут быть ферментативно реплицированы. Kool с соавт. показали, что гидрофобные взаимодействия упаковки между основаниями могут заменить водородные связи в регуляции образования пар оснований. См., Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602; и Guckian and Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. В работах по разработке неприродной пары оснований, удовлетворяющей всем описанным выше требованиям, Schultz, Romesberg и сотрудники систематически синтезировали и изучали ряд неприродных гидрофобных оснований. Пара из двух одинаковых оснований PICS:PICS оказалась более стабильной, чем природная пара оснований, и может эффективно встраиваться в ДНК фрагментом Кленова фрагмент ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (KF). См., например, McMinn et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6; и Ogawa et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274. Пара из двух одинаковых оснований 3MN:3MN могут синтезироваться фрагментом Кленова с эффективностью и селективностью, достаточными для биологического функционирования. См., например, Ogawa et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803. Тем не менее, оба основания действовали как терминатор цепи при дальнейшей репликации. Недавно была создана мутантная ДНК-полимераза, которая может быть использована для репликации самоспариваемого основания PICS. Кроме того, состоящая из двух одинаковых оснований пара 7 AI может быть реплицирована. См., например, Tae et al., (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439. Также была разработана новая пара из металлооснований Dipic: Py что образует стабильную пару после связывания Cu (II). См., Meggers et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714. Благодаря расширенным кодоном и неприродным кодоном, по своей сути ортогональным природным кодоном, эти свойства могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению для создания ортогональных tPHK для них.

Система обхода трансляции также может быть использована для встраивания неприродных аминокислот

кислот в целевой полипептид. В системе обхода трансляции большая последовательность встраивается в геном, но не транслируется в белок. Последовательность содержит структуру, которая служит сигналом, вызывающим перепрыгивание рибосомы через эту последовательность, после чего трансляция возобновляется после этой вставки.

В некоторых вариантах осуществления целевой белок или полипептид (или его часть) в способах и/или композициях согласно настоящему изобретению кодируется нуклеиновой кислотой. В целом, нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один селекторный кодон, по меньшей мере два селекторных кодона, по меньшей мере три селекторных кодона, по меньшей мере четыре селекторных кодона, по меньшей мере пять селекторных кодонов, по меньшей мере шесть селекторных кодонов, по меньшей мере семь селекторных кодонов, по меньшей мере восемь селекторных кодонов, по меньшей мере девять селекторных кодонов, десять или более селекторных кодонов.

Гены, кодирующие интересующие белки или полипептиды, могут быть подвергнуты мутагенезу с использованием способов, известных специалистам в данной области и описанных здесь, с включением одного или более селекторных кодонов для встраивания неприродных аминокислот. Например, нуклеиновая кислота целевого белка может быть подвергнута мутагенезу с встраиванием одного или более селекторных кодонов, обеспечивающих встраивание одного или более неприродных аминокислот. Изобретение включает любой такой вариант, в том числе, но не ограничиваясь, мутантные версии любого белка, например, в том числе содержащего по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. Кроме того, изобретение также включает соответствующие нуклеиновые кислоты, т.е. любую нуклеиновую кислоту с одним или более селекторным кодоном, который кодирует одну или более неприродных аминокислот.

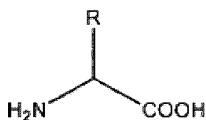
Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой белок, такой как полипептид релаксина, могут быть легко подвергнуты мутации с введением цистеина в любом сайте полипептида. Цистеин широко используется для введения реактивных молекул, водорастворимых полимеров, белков или множества других молекул в целевой белок. Способы, подходящие для включения цистеина в нужное положение полипептида, известны специалистам в данной области, например, описанные в патенте США № 6608183, который включен в настоящее описание путем ссылки, и стандартные методы мутагенеза.

Не кодируемые в природных условиях аминокислоты.

Очень широкий спектр не кодируемых в природных условиях аминокислот пригодны для использования в настоящем изобретении. Любое количество не кодируемых в природных условиях аминокислот может быть введено в полипептид релаксина. Обычно встраиваемые не кодируемые в природных условиях аминокислоты, по существу, химически инертны к 20 стандартным генетически кодируемым аминокислотам (например, аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин). В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты включают функциональные группы боковых цепей, которые реагируют эффективно и селективно с функциональными группами, не встречающимися в 20 обычных аминокислотах (включая, но не ограничиваясь ими, азидную, кетонную, альдегидную и аминоксигруппы) с образованием стабильных конъюгатов. Например, полипептид релаксина, который включает не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие функциональные азидогруппы, может вступать в реакцию с полимером (включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль или, в альтернативном варианте, вторым полипептидом, содержащим алкиновую группу, с образованием стабильного конъюгата в результате селективной реакции азидной и алкиновой функциональных групп, приводящей к образованию продукта [3+2] циклоприсоединения Хуисгена.

Общая структура альфа-аминокислоты показана ниже (формула I)

I



Не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют любую структуру, соответствующую приведенной выше формуле, где группа R представляет собой любой заместитель, отличный от встречающихся в двадцати природных аминокислотах, и могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении. Поскольку не кодируемые в природных условиях аминокислоты изобретения обычно отличаются от природных аминокислот только структурой боковой цепи, не кодируемые в природных условиях аминокислоты образуют амидные связи с другими аминокислотами, в том числе, но не ограничиваясь, природными или не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, так же, как они образуются в природных полипептидах.

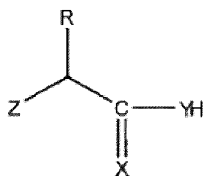
Тем не менее, не кодируемые в природных условиях аминокислоты имеют боковую цепь группы, которая отличает их от природных аминокислот. Например, R, необязательно, содержит следующие группы алкил-, арил-, ацил-, кето-, азидо-, гидроксил-, гидразин, циано-, гало-, гидразид, алкенил, алкинил, эфир, тиол, селено-, сульфонил-, борат, боронат, фосфо-, фосфоно-, фосфин, гетероциклическую,

енон, имин, альдегид, сложный эфир, тиокислотную, гидроксилмин, аминогруппу и т.п. или любую их комбинацию. Другие не кодируемые в природных условиях представляющие интерес аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, аминокислоты, содержащие фотоактивируемый сшивающий агент, спин-меченные аминокислоты, люминесцентные аминокислоты, металлсвязывающие аминокислоты, металлсодержащие аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты с новыми функциональными группами, аминокислоты, ковалентно или нековалентно взаимодействующие с другими молекулами, фотоактивируемые и/или фотоизомеризуемые аминокислоты, кислоты, содержащие биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, такие как сахарзамещенный серин, другие углеводноизмененные аминокислоты, кетосодержащие аминокислоты, аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или полиэфир, тяжелым атомом замещенные аминокислоты, химически расщепляемые и/или фоторасщепляемые аминокислоты, аминокислоты с удлиненными боковыми цепями по сравнению с природными аминокислотами, в том числе, но не ограничиваясь, простые полиэфиры или длинные цепочки углеводородов, в том числе, но не ограничиваясь ими, содержащие больше чем примерно 5 или больше чем примерно 10 атомов углерода, содержащие углеводсвязанный сахар аминокислоты, редокс-активные аминокислоты, содержащие тиокислоту аминокислоты и аминокислоты, содержащие один или более токсичный фрагмент.

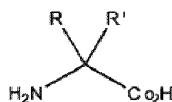
Примеры не кодируемых в природных условиях аминокислот, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении и которые являются полезными для реакции с водорастворимыми полимерами включают аминокислоты, содержащие карбонильные, аминокислоты, гидразин, гидразид, семикарбазид, азид и алкин реакционноспособные группы, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты содержат сахаридную группу. Примеры таких аминокислот включают N-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, N-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-аспарагин и O-маннозаминил-L-серин. Примерами таких аминокислот также являются примеры, когда природные N- или O-связи между аминокислотой и сахаром заменены ковалентной связью с не кодируемой в природных условиях аминокислотой, включая, но не ограничиваясь перечисленными, алкеновую, оксимную, тиозфирную, амидную и подобные. Примерами таких аминокислот также являются сахараиды, которые редко встречаются в белках природного происхождения, такие как 2-дезоксиглюкоза, 2-дезоксигалактоза и тому подобное.

Многие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, приведенные здесь, коммерчески доступны, например, в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США), Novabiochem (подразделение EMD Biosciences, Дармштадт, Германия) или Peptech (Берлингтон, штат Массачусетс, США). Те, которые не являются коммерчески доступными, могут быть синтезированы, как это описано в настоящем документе или с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области. Информацию о методах органического синтеза, можно найти, например, в Organic Chemistry (Fessenden and Fessenden, 1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry (Third Edition, 1985, March, Wiley and Sons, New York); и Advanced Organic Chemistry (Carey and Sundberg, Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). См. также патенты США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в настоящее описание путем ссылки. В дополнение к неприродным аминокислотам, которые содержат новые боковые цепи, неприродные аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, также необязательно включают изменение структуры скелета, в том числе, но не ограничиваясь этим, как показано на структурах формулы II и III

II



III



где Z обычно содержит OH, NH₂, SH, NH-R' или S-R'; X и Y, которые могут быть одинаковыми или разными, обычно содержат S или O, и R и R', которые необязательно являются одинаковыми или различными, обычно выбраны из того же списка, который определяет группы R, описанные выше для природных аминокислот формулы I, а также водород. Например, неприродные аминокислоты согласно настоящему изобретению необязательно включают замену в амин- или карбоксильной группе, как показа-

но в формулах II и III. Неприродные аминокислоты этого типа включают, но не ограничиваются ими, α -гидроксикислоты, α -тиокислоты, α -аминотиокарбоксилаты, в том числе, но не ограничиваясь, с боковыми цепями соответствующих обычных двадцати природных аминокислот или неприродными боковыми цепями. Кроме того, замены на α -углероде необязательно включают, но не ограничиваются перечисленными, L, D или α - α -дизамещенные аминокислоты, такие как D-глутамат, D-аланин, D-метил-O-тирозин, аминокислота и тому подобное. Другие структурные альтернативы включают циклические аминокислоты, такие как аналоги пролина, а также 3-, 4-, 6-, 7-, 8- и 9-членные циклические аналоги пролина, β - и γ -аминокислоты, такие как замещенные β -аланин и γ -аминомасляная кислота.

Многие неприродные аминокислоты на основе природных аминокислот, таких как тирозин, глутамин, фенилаланин и т.п., и являются подходящими для использования в настоящем изобретении. Аналоги тирозина включают, но не ограничиваются перечисленным: паразамещенные тирозины, ортозамещенные тирозины и метазамещенные тирозины, где замещенные тирозины включают, в том числе, но не ограничиваясь, кетогруппу (включая, но не ограничиваясь перечисленными, ацетилгруппу), бензоилгруппу, аминогруппу, гидразин, гидроксиамин, тиоловую группу, карбоксильную группу, изопропильную группу, металльную группу, C6-C20 линейную или разветвленную углеводородную цепь, насыщенные или ненасыщенные углеводороды, O-метильную группу, полиэфирную группу, нитрогруппу, алкинил или тому подобное. Кроме того, также предусмотрены многократно замещенные арильные кольца. Аналоги глутамина, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, α -гидроксипроизводные, γ -замещенные производные, циклические производные, и амидных производных замещенного глутамина. Пример аналогов фенилаланина, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, паразамещенные фенилаланины, ортозамещенные фенилаланины и метазамещенные фенилаланины, где заместитель включает, в том числе, но не ограничиваясь, гидроксигруппу, метоксигруппу, метил-, аллилгруппы, альдегиды, азидо, йод, бром, кетогруппу (включая, но не ограничиваясь перечисленными, ацетилгруппу), бензоил, алкинил или подобные. Конкретные примеры неприродных аминокислот, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, p-ацетил-L-фенилаланин, O-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAc b-серин, L-ДОФА, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, p-азидо-L-фенилаланин, p-ацил-L-фенилаланин, p-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфотирозин, p-йодофенилаланин, p-бромфенилаланин, p-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин и p-пропаргилоксифенилаланин и тому подобное. Примеры структур различных неприродных аминокислот, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, представлены, например, в WO 2002/085923 озаглавленной "In vivo встраивание неприродных аминокислот". См. также Kück et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, который включен в настоящее описание путем ссылки для дополнительных аналогов метионина. Международная заявка № PCT/US 0647822 озаглавленная "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides", которая включена в настоящее описание путем ссылки, описывает восстановительное алкилирование ароматических фрагментов аминов, в том числе, но не ограничиваясь этим, p-аминофенилаланин и восстановительное аминирование.

В одном из вариантов осуществления предложены композиции полипептида релаксина, который включает неприродную аминокислоту (например, p-(пропаргилокси)фенилаланин). Также предложены различные композиции, содержащие p-(пропаргилокси)фенилаланин и, в том числе, но не ограничиваясь, белки и/или клетки. В одном аспекте композиция, которая включает неприродную аминокислоту p-(пропаргилокси)фенилаланин, дополнительно включает ортогональные tРНК. Неприродные аминокислоты могут быть связаны (включая, но не ограничиваясь этим, ковалентно) с ортогональной tРНК, в том числе, но не ограничиваясь, ковалентно связаны с ортогональным tРНК аминокислотной связью, ковалентно связаны с 3'ОН или 2'ОН в сахаре концевой рибозы ортогональной tРНК и т.д.

Химические фрагменты через неприродные аминокислоты, которые могут быть включены в белки, обеспечивают различные преимущества и возможности манипуляций с белком. Например, уникальная реактивность функциональной кетогруппы позволяет избирательно модифицировать белки любым гидразин- или гидроксиламинсодержащим реагентом *in vitro* и *in vivo*. Тяжелые атомы неприродных аминокислот, например, могут быть полезными для получения фазированных данных рентгеноструктурного анализа. Сайт-специфическое встраивание тяжелых атомов с использованием неприродной аминокислоты также обеспечивает избирательность и гибкость в выборе положения для тяжелых атомов. Фотореакционноспособные неприродные аминокислоты (включая, но не ограничиваясь перечисленными, аминокислоты с бензофеноном и арилазидами (включая, но не ограничиваясь перечисленными, фенилазид) в составе боковых цепей), например, позволяют эффективно *in vivo* и *in vitro* осуществлять поперечное фотосшивание белка. Примеры фотореакционноспособных неприродных аминокислот включают, но не ограничиваются перечисленными, p-азидофенилаланин и p-бензоилфенилаланин. Белки с фотореакционноспособными неприродными аминокислотами могут быть сшиты путем возбуждения фотореакцион-

неспособных групп, что обеспечивает возможность контроля времени. В одном примере метильная группа неприродной аминокислоты может быть заменена мечеными изотопами, в том числе, но не ограничиваясь, метильными группами, в качестве зонда местных структур и динамики, в том числе, но не ограничиваясь, для анализа с использованием ядерного магнитного резонанса и колебательной спектроскопии. Алкинильные или азидофункциональные группы, например, обеспечивают возможность селективной модификации белков с молекулами путем [3+2] циклоприсоединения.

Неприродная аминокислота, включенная в полипептид на аминоконце, может состоять из групп R, которая представляет собой любой заместитель, кроме того, который встречается в двадцати природных аминокислотах, и 2-й реактивной группы, отличной от NH_2 группы, обычно присутствующей в α -аминокислотах (см. формулу I). Аналогичная неприродная аминокислота может быть встроена в карбоксильный конец со 2-й реактивной группой, отличной от группы COOH , обычно присутствующей в α -аминокислотах (см. формулу I).

Неприродные аминокислоты согласно настоящему изобретению могут быть выбраны или созданы для обеспечения дополнительных характеристик, которые недоступны в двадцати природных аминокислотах. Например, неприродная аминокислота может быть необязательно модифицирована для изменения биологических свойств белка, например, в который она встроена. Например, следующие свойства могут быть модифицированы путем встраивания неприродных аминокислот в белок: токсичность, биораспределение, растворимость, стабильность, например, тепловая, гидролитическая, окислительная, устойчивость к ферментативной деградации и т.п., легкость очистки и обработки, структурные свойства, спектроскопические свойства, химические и/или фотохимические свойства, каталитическая активность, окислительно-восстановительный потенциал, время полужизни, способность реагировать с другими молекулами, например, ковалентно или нековалентно, и тому подобное.

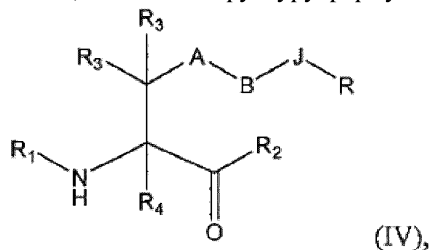
Структура и синтез неприродных аминокислот: карбонильные, карбонилподобные, маскированные карбонильные, защищенные карбонильные группы и гидроксилламинные группы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен релаксин, связанный с водорастворимым полимером, например ПЭГ, оксимной связью.

Многие типы не кодируемых в природных условиях аминокислот пригодны для формирования оксимных связей. Они включают, но не ограничиваются перечисленными, не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие карбонильные, дикарбонильные или гидроксилламинные группы. Такие аминокислоты, описанные в патентных публикациях США №№ 2006/0194256, 2006/0217532 и 2006/0217289 и WO 2006/069246 озаглавленной "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", причем каждый из этих источников в полном объеме включен в настоящее в настоящее описание путем ссылки. Не кодируемые в природных условиях аминокислоты также описаны в патенте США № 7083970 и патенте США № 7045337, которые включены в настоящее описание путем ссылки в полном объеме.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к полипептидам релаксина, которые замещаются в одном или более положениях аминокислотой параацетилфенилаланином. Синтез p-ацетил-(±)-фенилаланина и m-ацетил-(±)-фенилаланина описаны в Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), которые включены посредством ссылки. Другие карбонил- или дикарбонилсодержащие аминокислоты могут быть аналогичным образом получены специалистом в данной области. Кроме того, не ограничивающие примеры синтеза неприродных аминокислот, описанных здесь, представлены на фиг. 4, 24-34 и 36-39 в патенте США № 7083970, который включен в настоящее описание путем ссылки в полном объеме.

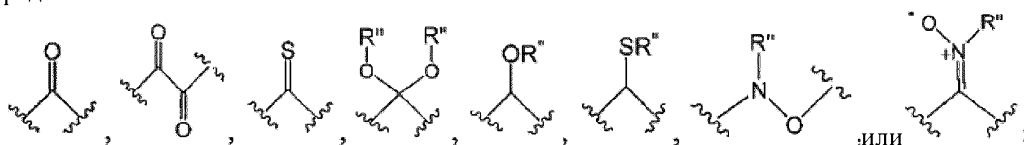
Аминокислоты с электрофильными реактивными группами обеспечивают возможность осуществления разнообразных реакций для связывания молекулы через нуклеофильное присоединение, помимо прочего. Такие электрофильные реакционноспособные группы включают карбонильную группу (в том числе кетогруппу и дикарбонильную группу), карбонил-подобную группу (которая имеет реакционную способность, близкую к карбонильной группе (в том числе кетогруппу и дикарбонильную группу) и структурно похожа на карбонильную группу), маскированную карбонильную группу (группа, которая может быть легко преобразована в карбонильную группу (в том числе кетогруппу и дикарбонильную группу)), или защищенную карбонильную группу (которая имеет реакционную способность, близкую к карбонильной группе (в том числе кетогруппу и дикарбонильную группу) после снятия защиты). Такие аминокислоты включают аминокислоты, имеющие структуру формулы (IV)



где А является необязательным, и если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил-лен, замещенный гетероариллен, алкилариллен, замещенный алкилариллен, аралкилен или замещенный аралкилен;

В является необязательным, и если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из груп-пы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_к-, где К равен 1, 2, или 3, -S(O)_к (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)- (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'- (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')- (алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещен-ный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенной алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_кN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R'), -N(R')S(O)_кN(R')-, -N(R')N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- и -C(R')₂-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или за-мещенный алкил;

J представляет собой



R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил; каждый R'' независимо представляет собой H, алкил, замещенный алкил или защитную группу или, если присутствует более одной группы R'', два R'' необязательно образуют гетероциклоалкил;

R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминоксигруппу, смолу, аминоксигруппу, полипептид или полинуклеотид; и

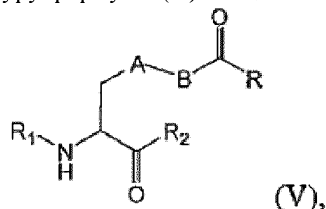
R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защит-ную группу, смолу, аминоксигруппу, полипептид или полинуклеотид;

каждый из R₃ и R₄ независимо представляет собой H, галоген, низший алкил или замещенный низ-ший алкил, или R₃ и R₄ или две группы R₃ необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил, или -A-B-J-R группы вместе образуют бициклический или трициклический циклоалкил или гетероцик-лоалкил, содержащий по меньшей мере одну карбонильную группу, в том числе дикарбонильную груп-пу, защищенную карбонильную группу, в том числе защищенную группу дикарбонильную или маскиро-ванную карбонильную группу, в том числе маскированную дикарбонильную группу;

или группа -J-R вместе образуют моноциклический или бициклический циклоалкил или гетероцик-лоалкил, содержащий по меньшей мере одну карбонильную группу, в том числе дикарбонильную груп-пу, защищенную карбонильную группу, в том числе защищенную дикарбонильную группу или маскиро-ванную карбонильную группу, в том числе маскированную дикарбонильную группу;

при условии, что если А представляет собой фенилен, и каждый R₃ представляет собой H, В при-сутствует; и когда А представляет собой -(CH₂)₄- и каждый R₃ представляет собой H, В не является -NHC(O)(CH₂CH₂)-; и что если А и В отсутствуют и каждый R₃ представляет собой H, R не является ме-тилом.

Кроме того, в имеющуюся структуру формулы (V) входят



где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, заме-щенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероари-лен, замещенный гетероариллен, алкилариллен, замещенный алкилариллен, аралкилен или замещенный аралкилен;

В является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из груп-пы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_к-, где К равен 1, 2 или 3,

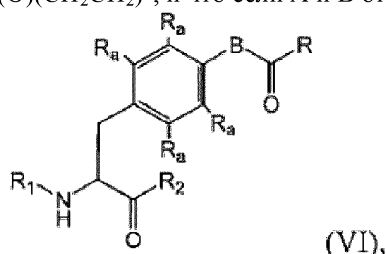
$-S(O)_K$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')-$, $-NR'-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')CO-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_KN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')$, $-N(R')C(S)N(R')$, $-N(R')S(O)_KN(R')$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')$, $-C(R')=N-N=$, $-C(R')_2-N=N-$ и $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил;

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

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

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

при условии, что если A представляет собой фенилен, B присутствует; и что если A представляет собой $-(CH_2)_4-$, B не является $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; и что если A и B отсутствуют, R не является метилом.



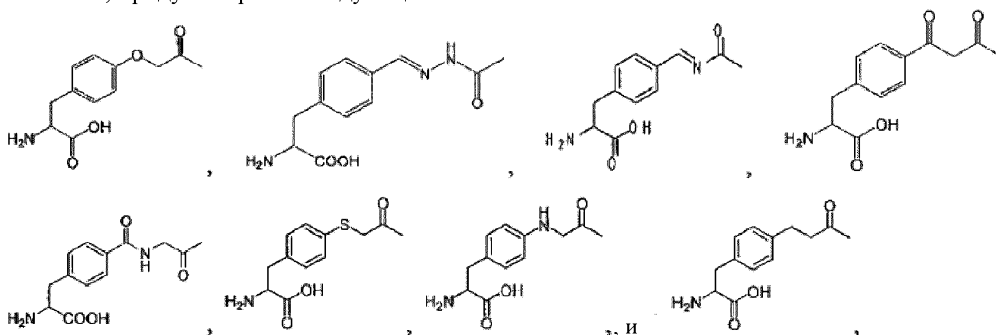
где B представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, $-O-$, $-O-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-S-$, $-S-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-S(O)_K-$, где K равен 1, 2 или 3, $-S(O)_K$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')-$, $-NR'-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')CO-($ алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_KN(R')$, $-N(R')C(O)N(R')$, $-N(R')C(S)N(R')$, $-N(R')S(O)_KN(R')$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')$, $-C(R')=N-N=$, $-C(R')_2-N=N-$ и $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -,

где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил;

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

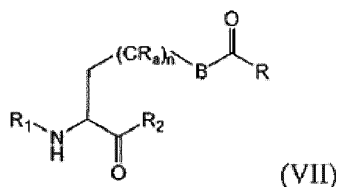
R_1 не является обязательным и, если присутствует, представляет собой H , аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH , сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H , галогена, алкила, замещенного алкила, $-N(R')_2-C(O)_KR'$, где $K = 1, 2$ или 3 , $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ и $-S(O)_KR'$, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил. Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты:



где все соединения необязательно содержат аминозащитную группу, карбоксизащитную группу, или их соли. Кроме того, любая из следующих неприродных аминокислот может быть встроена в полипептид, содержащий неприродные аминокислоты.

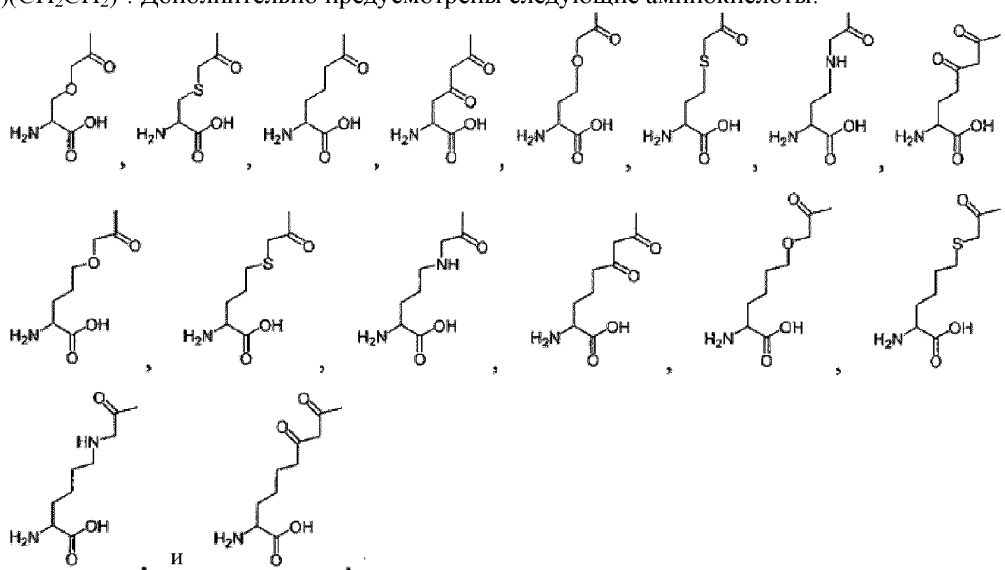
Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (VII)



где В является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_K-, где К равен 1, 2 или 3, -S(O)_K (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- и -C(R')₂-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил; R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

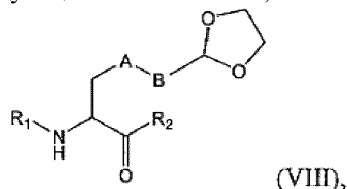
R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, -N(R')₂, -C(O)_KR', где К = 1, 2 или 3, -C(O)N(R')₂, -OR' и -S(O)_KR', где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил; и n = от 0 до 8; при условии, что если когда А представляет собой -(CH₂)₄-, В не является -NHC(O)(CH₂CH₂)-. Дополнительно предусмотрены следующие аминокислоты:



причем все соединения необязательно содержат аминозащитную группу, карбоксизащитную или их соли. Кроме того, любая из следующих не природных аминокислот может быть включена в полипептид, содержащий не природные аминокислоты.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (VIII):

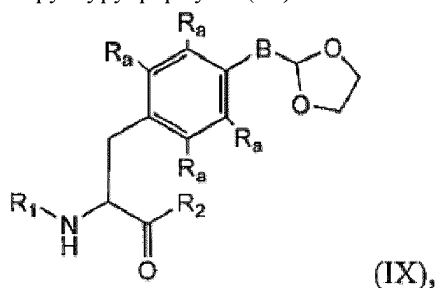


где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил, замещенный гетероарил, алкиларил, замещенный алкиларил, аралкилен или замещенный аралкилен;

В является необязательным и, когда присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_K-, где К равен 1, 2 или 3, -S(O)_K (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещен-

ный алкилен)-, $-N(R')CO$ -(алкилен или замещенной алкилен)-, $-N(R')C(O)O$ -, $-S(O)_K N(R')$ -, $-N(R')C(O)N(R')$ -, $-N(R')C(S)N(R')$ -, $-N(R')S(O)_K N(R')$ -, $-N(R')-N=$ -, $-C(R')=N$ -, $-C(R')=N-N(R')$ -, $-C(R')=N-N=$ -, $-C(R')_2-N=N$ - и $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил; R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой H , аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH , сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид. Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (IX):

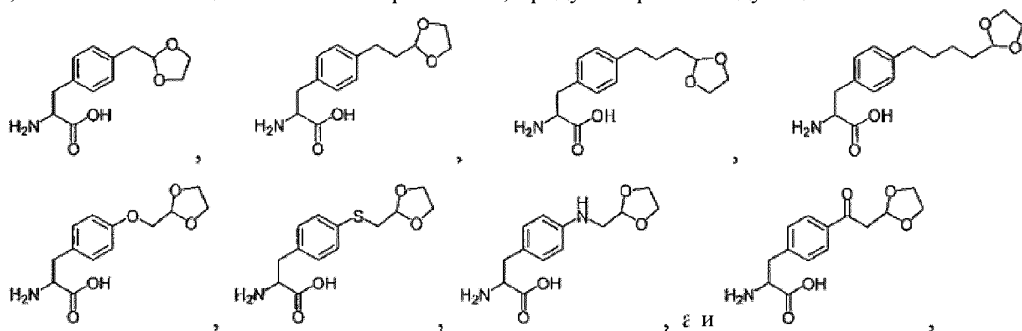


V является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, $-O$ -, $-O$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-S$ -, $-S$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-S(O)_K$ -, где K равен 1, 2 или 3, $-S(O)_K$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)$ -, $-C(O)$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(S)$ -, $-C(S)$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')$ -, $-NR'$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)N(R')$ -, $-CON(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-CSN(R')$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')CO$ -(алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')C(O)O$ -, $-S(O)_K N(R')$ -, $-N(R')C(O)N(R')$ -, $-N(R')C(S)N(R')$ -, $-N(R')S(O)_K N(R')$ -, $-N(R')-N=$ -, $-C(R')=N$ -, $-C(R')=N-N(R')$ -, $-C(R')=N-N=$ -, $-C(R')_2-N=N$ - и $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил; R представляет собой H , алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

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

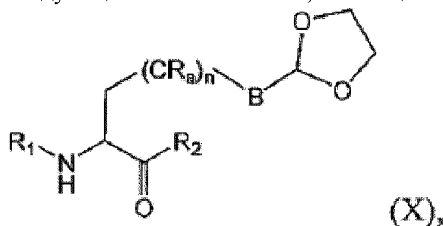
R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH , сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H , галогена, алкила, замещенного алкила, $-N(R')_2$ -, $-C(O)_K R'$ -, где $K = 1, 2$ или 3 , $-C(O)N(R')_2$ -, $-OR'$ и $-S(O)_K R'$ -, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил. Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты:



где такие соединения являются необязательно аминозащищенными, карбоксизащищенными, необязательно аминозащищенными и карбоксизащищенными, или их соли. Кроме того, любая из следующих неприродных аминокислот может быть включена в полипептид, содержащий неприродные аминокислоты.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (X)



где V является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, $-O$ -, $-O$ -

(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_K-, где K равен 1, 2 или 3, -S(O)_K (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O) (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- и -C(R')₂-N(R')-N(R')-, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил;

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

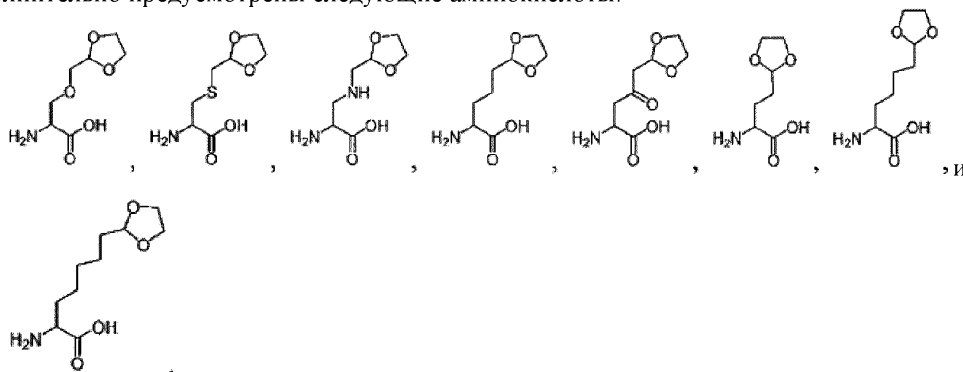
R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, -N(R')₂, -C(O)_KR', где K = 1, 2 или 3, -C(O)N(R')₂, -OR' и -S(O)_KR', где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил; и

n равен от 0 до 8.

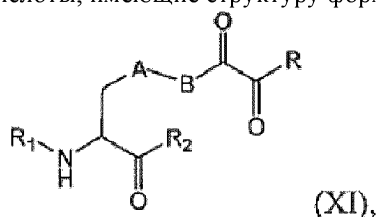
Дополнительно предусмотрены следующие аминокислоты:



причем такие соединения являются необязательно аминокислотами, карбоксизащищенными, необязательно аминокислотами и карбоксизащищенными, или их соли. Кроме того, любая из следующих не природных аминокислот может быть включена в полипептид, содержащий не природные аминокислоты.

В дополнение к монокарбонильным структурам не природные аминокислоты, описанные здесь, могут включать такие группы, как дикарбонильные, подобные дикарбонильным и маскированные дикарбонильные и защищенные дикарбонильные группы.

Например, следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XI), включены



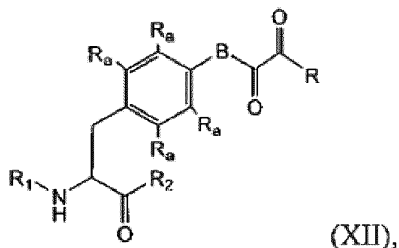
где A является необязательным, и если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарилен, замещенный гетероарилен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

B является необязательным и, когда присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, -O-, -O-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S-, -S-(алкилен или замещенный алкилен)-, -S(O)_K-, где K равен 1, 2 или 3, -S(O)_K (алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)-, -C(O)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(S)-, -C(S)-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')-, -NR'-(алкилен или замещенный алкилен)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')CO-(алкилен или замещенный алкилен)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- и -C(R')₂-N(R')N(R')-,

где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил;
 R представляет собой H , алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;
 R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой H , аминоксигруппу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH , сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

Кроме того, следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XII), включены



B является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, $-O-$, $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-S-$, $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-S(O)_K-$, где K равен 1, 2 или 3, $-S(O)_K$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')-$, $-NR'-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $N(R')CO-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_KN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R)$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_KN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ и $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$,

где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил;

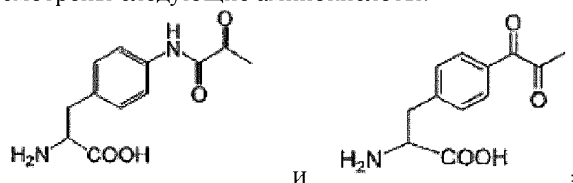
R представляет собой H , алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой H , аминоксигруппу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

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

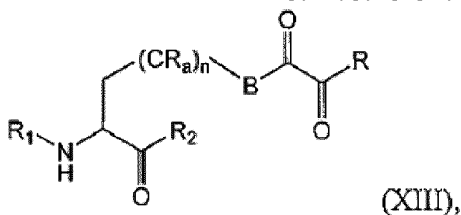
каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H , галогена, алкила, замещенного алкила, $-N(R')_2$, $-C(O)_KR'$, где $K = 1, 2$ или 3 , $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ и $-S(O)_KR'$, где каждый R' независимо представляет собой H , алкил или замещенный алкил.

Дополнительно предусмотрены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно аминоксигруппированные, карбоксизащищенные, необязательно аминоксигруппированные и карбоксизащищенные или их соли. Кроме того, эти не природные аминокислоты и любая из следующих не природных аминокислот может быть включена в полипептид, содержащий не природные аминокислоты.

Кроме того, следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XIII), включены



где B является необязательным и, если присутствует, представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из низшего алкилена, замещенного низшего алкилена, низшего алкенилена, замещенного низшего алкенилена, низшего гетероалкилена, замещенного низшего гетероалкилена, $-O-$, $-O-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-S-$, $-S-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-S(O)_K-$, где K равен 1, 2 или 3, $-S(O)_K$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')-$, $-NR'-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')CO-$ (алкилен или замещенный алкилен)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_KN(R')-$,

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

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

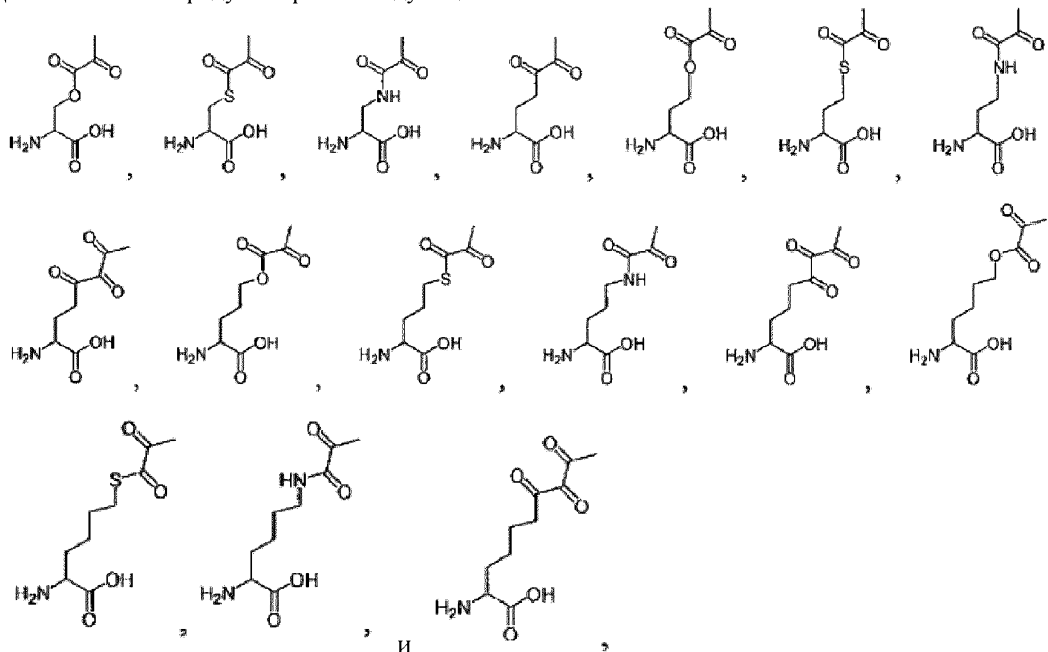
R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

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

каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, алкила, замещенного алкила, $-N(R')_2$, $-C(O)_K R'$, где $K = 1, 2$ или 3 , $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ и $-S(O)_K R'$, где каждый R' независимо представляет собой H, алкил или замещенный алкил; и

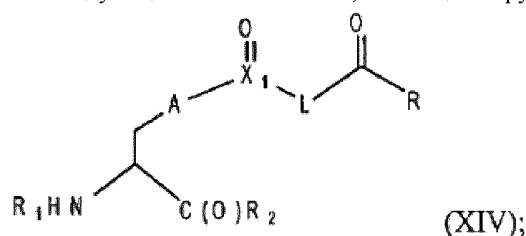
n равен от 0 до 8.

Дополнительно предусмотрены следующие аминокислоты:



где такие соединения необязательно являются аминокислотами, карбоксизащищенными, необязательно аминокислотами и карбоксизащищенными, или их соли. Кроме того, эти не природные аминокислоты и любая из следующих не природных аминокислот могут быть встроены в полипептид, содержащий не природные аминокислоты.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XIV):



где A является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкенилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил, замещенный гетероарил, алкиларил, замещенный алкиларил, аралкилен или замещенный аралкилен;

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

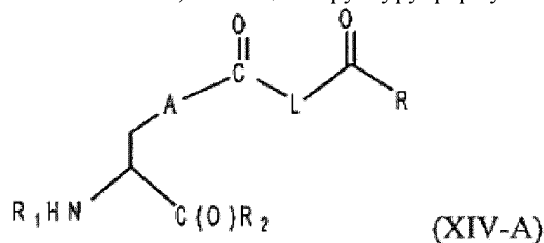
R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

X_1 представляет собой C, S или S(O) и

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

Кроме того, следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XIV-A), входят



Где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарилен, замещенный гетероарилен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

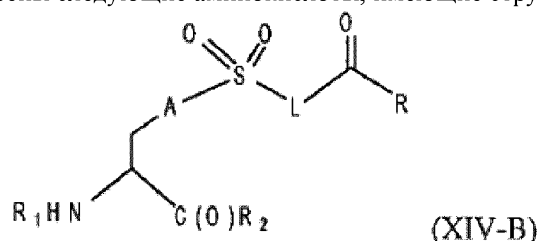
Р представляет собой Н, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

Р₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

Р₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

Л представляет собой алкилен, замещенный алкилен, N(R')(алкилен) или N(R')(замещенный алкилен), где R' представляет собой Н, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру Формулы (XIV-B):



Где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарилен, замещенный гетероарилен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

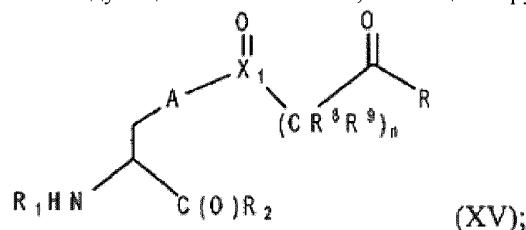
Р представляет собой Н, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

Р₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

Р₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

Л представляет собой алкилен, замещенный алкилен, N(R')(алкилен) или N(R')(замещенный алкилен), где R' представляет собой Н, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру Формулы (XV)



Где А является необязательным и, когда присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарилен, замещенный гетероарилен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

Р представляет собой Н, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

Р₁ не является обязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

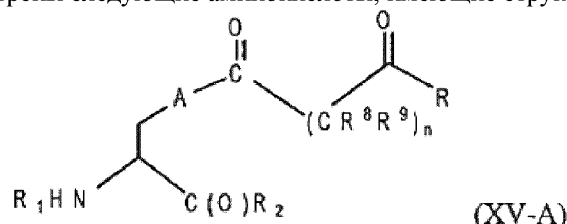
R_2 является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

X_1 представляет собой С, S или S(O); и

$n = 0, 1, 2, 3, 4$ или 5; и

каждый R^8 и R^9 на каждой CR^8R^9 группе независимо выбран из группы, состоящей из Н, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или R^8 и R^9 могут вместе образовывать =О или циклоалкил, или соседние группы R^8 могут вместе образовывать циклоалкил.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XV-A):



Где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил, замещенный гетероарил, алкиларил, замещенный алкиларил, аралкилен или замещенный аралкилен;

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

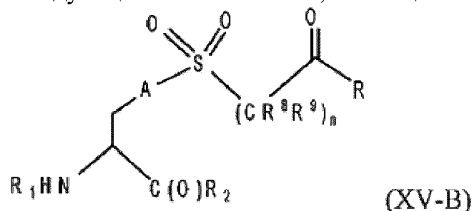
R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

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

$n = 0, 1, 2, 3, 4$ или 5; и

каждый R^8 и R^9 на каждой CR^8R^9 группе независимо выбран из группы, состоящей из Н, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или R^8 и R^9 могут вместе образовывать =О или циклоалкил, или соседние группы R^8 могут вместе образовывать циклоалкил.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XV-B):



где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил, замещенный гетероарил, алкиларил, замещенный алкиларил, аралкилен или замещенный аралкилен;

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

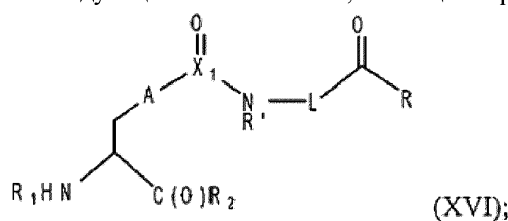
R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

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

$n = 0, 1, 2, 3, 4$ или 5; и

каждый R^8 и R^9 на каждой CR^8R^9 группе независимо выбран из группы, состоящей из Н, алкокси, алкиламина, галогена, алкила, арила, или R^8 и R^9 могут вместе образовывать =О или циклоалкил, или соседние группы R^8 могут вместе образовывать циклоалкил.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVI):



где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил-лен, замещенный гетероариллен, алкилариллен, замещенный алкилариллен, аралкилен или замещенный аралкилен;

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

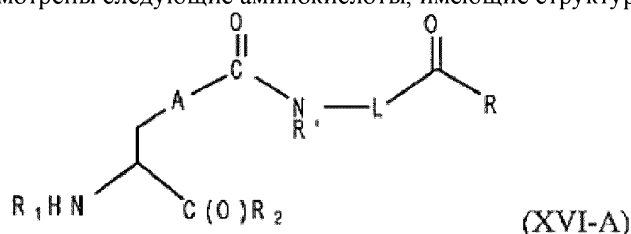
R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминокислотную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

X_1 представляет собой C, S или S(O);

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

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVI-A):



где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил-лен, замещенный гетероариллен, алкилариллен, замещенный алкилариллен, аралкилен или замещенный аралкилен;

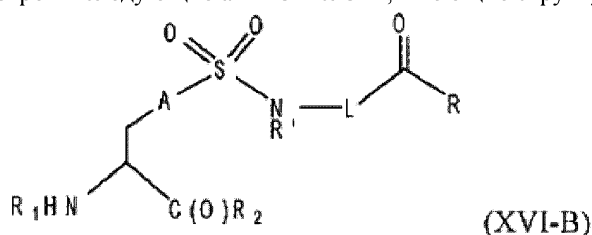
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил,

R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминозащитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

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

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVI-B).



где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил-лен, замещенный гетероариллен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

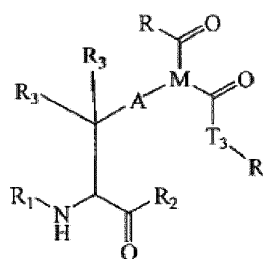
R представляет собой H, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R₁ не является обязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой ОН, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид;

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

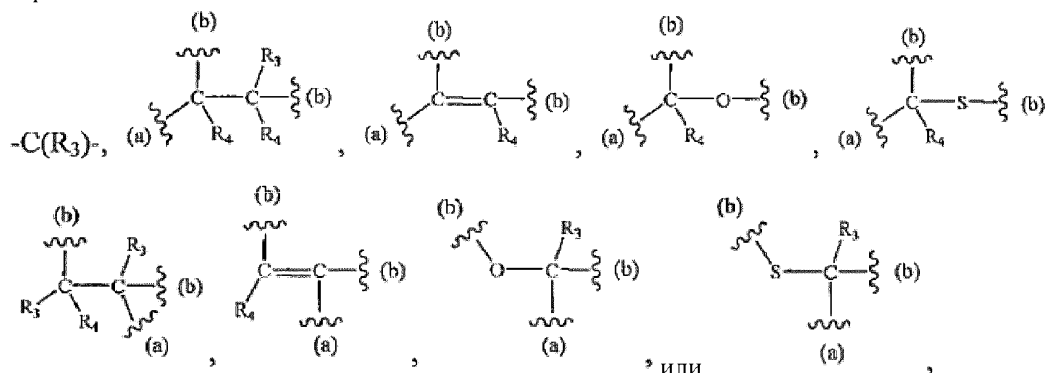
Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVII):



(XVII),

где А является необязательным и, если присутствует, представляет собой низший алкилен, замещенный низший алкилен, низший циклоалкилен, замещенный низший циклоалкилен, низший алкенилен, замещенный низший алкенилен, алкинилен, низший гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, низший гетероциклоалкилен, замещенный низший гетероциклоалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарил-лен, замещенный гетероарилен, алкиларилен, замещенный алкиларилен, аралкилен или замещенный аралкилен;

М представляет собой



где (а) указывает на место присоединения к группе А, и (b) указывает на связь с соответствующими карбонильными группами, R₃ и R₄ независимо выбраны из H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил, или R₃ и R₄, или две группы R₃ или две группы R₄ необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил;

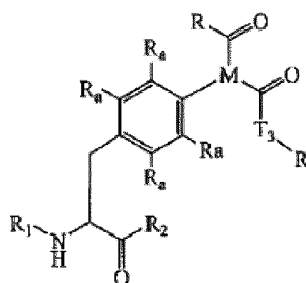
R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

T₃ представляет собой связь, C(R)(R), O или S, и R представляет собой H, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R₁ является необязательным и, если присутствует, представляет собой H, аминокислотную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

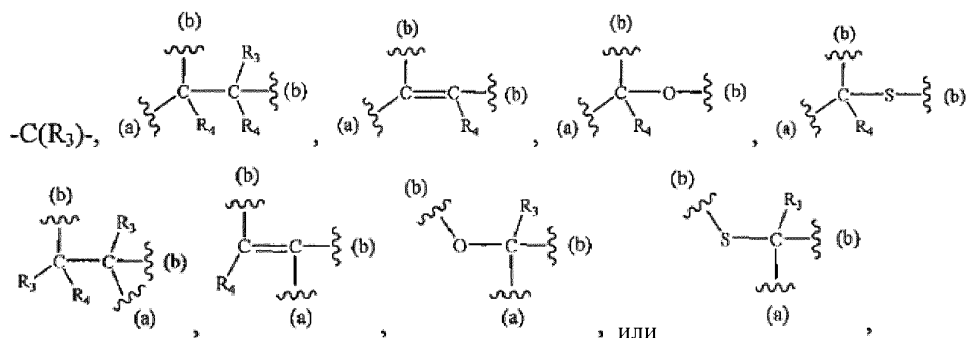
R₂ является необязательным и, если присутствует, представляет собой OH, сложноэфирную защитную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид.

Кроме того, предусмотрены следующие аминокислоты, имеющие структуру формулы (XVIII):



(XVIII),

где М представляет собой



где (a) указывает на крепление к группе А, и (b) указывает на связь с соответствующими карбонильными группами, R_3 и R_4 независимо выбраны из Н, галогена, алкила, замещенного алкила, циклоалкила или замещенного циклоалкила, или R_3 и R_4 , или две группы R_3 или две группы R_4 необязательно образуют циклоалкил или гетероциклоалкил;

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

T_3 представляет собой связь, $C(R)(R)$, О или S, и

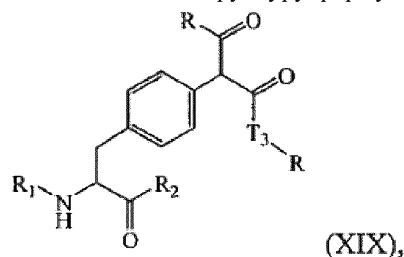
R представляет собой Н, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

R_1 является необязательным и, если присутствует, представляет собой Н, аминокислотную группу, смолу, аминокислоту, полипептид или полинуклеотид; и

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

каждый R_a независимо выбран из группы, состоящей из Н, галогена, алкила, замещенного алкила, $-N(R')_2-C(O)_K R'$, где $K = 1, 2$ или 3 , $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ и $-S(O)_K R'$, где каждый R' независимо представляет собой Н, алкил или замещенный алкил.

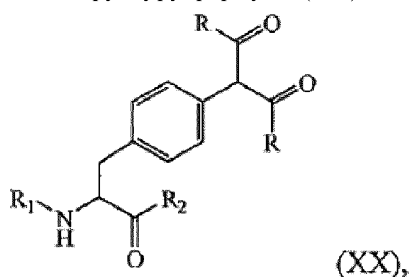
Кроме того, следующие аминокислоты имеют структуру формулы (XIX):



где R представляет собой Н, галоген, алкил, замещенный алкил, циклоалкил или замещенный циклоалкил;

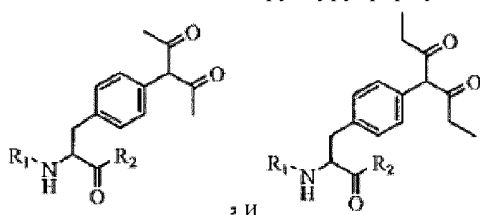
T_3 представляет собой О или S.

Кроме того, аминокислоты, имеют структуру формулы (XX):



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

Кроме того, следующие аминокислоты имеют структуру формулы (XXI):



В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий неприродные аминокислоты, химически модифицирован с образованием реактивной карбонильной или дикарбонильной функциональной группы. Например, альдегидная функциональная группа, полезная для реакций конъюгации, кото-

рые может быть получена из функциональных групп, включающих соседние амино- и гидроксильные группы. Если биологически активная молекула представляет собой полипептид, например N-концевой серин или треонин (который может присутствовать постоянно или становиться доступным в результате химического или ферментативного расщепления), может быть использован для создания альдегидной функциональности в мягких условиях окислительного расщепления с использованием периодата. См., например, Gaertner, et. al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994).

Тем не менее, способы, известные в данной области, ограничены аминокислотой на N-конце пептида или белка.

В настоящем изобретении неприродные аминокислоты, содержащие соседние гидроксильную и аминогруппу, могут быть встроены в полипептид в качестве маскированных функциональных альдегидных групп. Например, 5-гидроксизин несет гидроксильную группу, соседнюю с эпсилон-амином. Реакционные условия для формирования альдегида обычно включают добавление молярного избытка натрия метапериодата в мягких условиях, чтобы избежать окисления на других сайтах в полипептиде. pH реакции окисления обычно составляет приблизительно 7,0. Типичная реакция включает добавление приблизительно 1,5 молярного избытка метапериодата натрия в забуференный раствор полипептида, с последующей инкубацией в течение 10 мин в темноте. См., например, патент США № 6423685.

Карбонильная или дикарбонильная функциональная группа может выборочно реагировать с гидроксиламиновым реагентом в мягких условиях в водном растворе с образованием соответствующих оксимных связей, стабильных в физиологических условиях. См., например, 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). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной или дикарбонильной группы обеспечивает возможность селективной модификации в присутствии других боковых цепей аминокислот. См., например, Cornish, V.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. & Stroh, J.G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L.K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997).

Структура и синтез неприродных аминокислот: гидроксиламинсодержащие аминокислоты.

Заявка на патент США № 11/316534 (США публикация № 20060189529) включена в качестве ссылки в полном объеме. Таким образом, описание, приведенное в разделе V (под названием "Неприродные аминокислоты"), часть B (под названием "Структура и синтез неприродных аминокислот: гидроксиламинсодержащие аминокислоты"), в патентной заявке США № 11/316534 (США публикация № 20060189529) в полной мере относится к способам, композиции (в том числе формулах I-XXXV), технике и стратегии для изготовления, очистки, описания и применения неприродных аминокислот, содержащих неприродные кислоты полипептидов и модифицированных содержащих неприродные кислоты полипептидов, описанных здесь, в той же степени, как если бы такая информация была полностью представлена здесь. Патентные публикации США №№ 2006/0194256, 2006/0217532 и 2006/0217289 и WO 2006/069246 озаглавленные "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", также включены в настоящее описание путем ссылки полностью.

Химический синтез неприродных аминокислот.

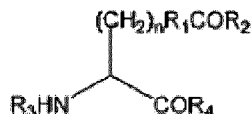
Многие неприродные аминокислоты, пригодные для использования в настоящем изобретении являются коммерчески доступными, например, от Sigma (США) или Aldrich (Milwaukee, WI, США). Те, которые не являются коммерчески доступными, могут быть синтезированы, как это описано в настоящем документе или, как это описано в различных публикациях, или с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области. Информацию методах органического синтеза можно найти, например, в *Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden*, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); и *Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg* (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Дополнительные публикации, описывающие синтез неприродных аминокислот, включают, например, WO 2002/085923, озаглавленный "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas et al. (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. *J. Chem. Soc.* 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). *J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) 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 Pivcolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)- Apovincamine through Amino Acid Decarboxylation and Iminium Ion Cyclization. *J. Org. Chem.* 50:1239-1246; Barton et al., (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. *Tetrahedron* 43:4297-4308; и, Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. *J. Med. Chem.* 35:4602-

7. См. также патент США № 2004/0198637, озаглавленный "Protein Arrays", который включен в настоящий документ путем ссылки.

А. Карбонильные реакционноспособные группы.

Аминокислоты с карбонильной реактивной группой подходят для различных реакций по соединению молекул (включая, но не ограничиваясь этим, ПЭГ или другие водорастворимые молекулы) с помощью нуклеофильного присоединения или реакций альдольной конденсации, а также других.

Пример карбонилсодержащих аминокислот может быть представлен следующим образом:



где $n = 0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; R_2 представляет собой H , алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил; R_3 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицирующую группу и R_4 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил и R_2 представляет собой простой алкилом (например, метил-, этил или пропил) и кетонная часть расположена в пара-положении по отношению к алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил и R_2 представляет собой простой алкил (например, метил-, этил или пропил) и кетонная часть расположена в мета-положении по отношению к алкильной боковой цепи.

Синтез *p*-ацетил-(±)-фенилаланина и *m*-ацетил-(±)-фенилаланина описан в Zhang, Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003), которая включена в качестве ссылки. Другие карбонилсодержащие аминокислоты могут быть аналогичным образом получены одним из специалистов в данной области.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты, химически модифицирован с образованием реактивной карбонильной функциональной группы. Например, альдегидная функциональная группа, полезная для реакций сопряжения, может быть получена из функциональных групп, содержащих соседние амино- и гидроксильную группы. Если биологически активная молекула представляет собой полипептид, например N-концевой серин или треонин (который может присутствовать постоянно или становиться доступным в результате химического или ферментативного расщепления), может быть использован для создания альдегидной функциональной группы в мягких условиях окислительного расщепления с использованием периодата. См., например, Gaertner, et. al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994).

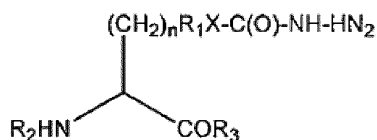
Тем не менее, способы, известные в данной области, ограничены аминокислотой в N-конце пептида или белка.

В настоящем изобретении неприродные аминокислоты в положении по соседним гидроксильным и аминокислотным группам могут быть встроены в полипептид в качестве маскированных функциональных альдегидных групп. Например, 5-гидроксилизин несет гидроксильную группу, прилегающую к ε-аминогруппе. Реакционные условия для формирования альдегида обычно включают добавление молярного избытка натрия метапериодата в мягких условиях, чтобы избежать окисления на других сайтах в полипептиде. pH реакции окисления обычно составляет приблизительно 7,0. Типичная реакция включает добавление приблизительно 1,5 молярного избытка метапериодата натрия в буферном растворе полипептида, с последующей инкубацией в течение 10 мин в темноте. См., например, патент США № 6423685, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Карбонильная функциональная группа может выборочно реагировать с гидразин-, гидразид-, гидроксил- или семикарбазидсодержащим реагентом в мягких условиях в водном растворе с образованием соответствующих гидразонной, оксимной или семикарбазонной связей соответственно, которые являются стабильными в физиологических условиях. См., например, 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). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной группы обеспечивает возможность селективной модификации в присутствии других боковых цепей аминокислот. См., например, Cornish, V.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K.F. & Stroh, J. G, *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L.K., et al., *Science* 276:1125- 1128 (1997).

В. Гидразиновые, гидразидные или семикарбазидные реакционноспособные группы.

Не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие нуклеофильные группы, такие как гидразин, гидразид или семикарбазид, подходят для взаимодействия с различными электрофильными группами с образованием конъюгатов (включая, но не ограничиваясь перечисленными: с ПЭГ или другими водорастворимыми полимерами). Примеры гидразин-, гидразид- или семикарбазидсодержащих аминокислот могут быть представлены следующим образом:



где $n=0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует; X является O , N или S или отсутствует; R_2 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицированную группу и R_3 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу.

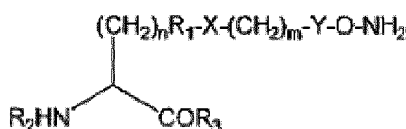
В некоторых вариантах осуществления $n = 4$, R_1 отсутствует, и X представляет собой N . В некоторых вариантах осуществления $n=2$, R_1 отсутствует, и X отсутствует. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, и X представляет собой O , и атом кислорода расположен в пара-положении по отношению к алифатической группе в арильном кольце.

Гидразид-, гидразин- и семикарбазидсодержащие аминокислоты доступны в коммерческих источниках. Например, L-глутамата α -гидразид можно приобрести в Sigma Chemical (Сент-Луис, Миссури). Другие аминокислоты, не доступные коммерчески, могут быть получены любым путем специалистом в данной области. См., например, патент США № 6281211, который включен в настоящее описание путем ссылки. Полипептиды, содержащие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, которые несут гидразидную, гидразинную или семикарбазидную функциональную группу, могут эффективно и избирательно взаимодействовать с различными молекулами, содержащими альдегидные или другие функциональные группы с похожей химической реактивностью. См., например, Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Уникальная реактивность гидразидных, гидразинных и семикарбазидных функциональных групп делает их значительно более реактивными в отношении альдегидов, кетонов и других электрофильных групп по сравнению с нуклеофильными группами, присутствующими в 20 обычных аминокислотах (включая гидроксильные группы серина или треонина или аминогруппы лизина и N-конец, но не ограничиваясь ими).

С. Аминооксисодержащие аминокислоты.

Не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие аминооксигруппу (также называемую гидроксилламин) можно применять в реакциях с различными электрофильными группами с образованием конъюгатов (включая, но не ограничиваясь перечисленными, с ПЭГ или другими водорастворимыми полимерами). Аналогично гидразинам, гидразидам и семикарбазидам повышенная нуклеофильность аминооксигруппы позволяет ей эффективно и селективно реагировать с различными молекулами, содержащими альдегиды или другие функциональные группы с похожей химической реактивностью. См., например, 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). В то время как результат реакции с гидразиновой группой представляет собой соответствующий гидразон, оксим образуется обычно в результате реакции аминооксигруппы с карбонилсодержащей группой, такой как кетон.

Примеры аминокислот, содержащих аминооксигруппы, могут быть представлены следующим образом:



где $n=0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует; X является O , N , S или отсутствует; $m=0-10$; $\text{Y} = \text{C(O)}$ или отсутствует; R_2 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицированную группу и R_3 представляет собой H , аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, X представляет собой O , $m=1$, а Y присутствует. В некоторых вариантах осуществления $n=2$, R_1 и X отсутствуют, $m=0$, и Y отсутствует. Аминооксисодержащие аминокислоты могут быть получены из легко доступных предшественников аминокислот (гомосерин, серин и треонин). См., например, M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Некоторые аминооксисодержащие аминокислоты, такие как L-2-амино-4-(аминоокси)масляная кислота, были выделены из природных источников (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). Другие аминооксисодержащие аминокислоты могут быть получены обычным путем специалистом в данной области техники.

Д. Азидные и алкиновые реакционноспособные группы.

Уникальная реакционная способность алкинных и азидных функциональных групп делает их чрезвычайно полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул. Органические азиды, в частности алифатические азиды, и алкины обычно стабильны в обычных условиях химических реакций. В частности, так азидная и алкиновая функциональные группы являются инертными по отношению к боковой цепи (например, R групп) 20 обычных аминокислот, встречающихся в при-

родных пептидах. Однако, если их разместить в непосредственной близости, проявляется "подпруженный" характер азидной и алкинной групп, и они реагируют эффективно и селективно реагируют по механизму циклоприсоединения Гуисгена [3+2] с образованием соответствующего триазола. См., например, Chin J., et al., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026- 9027 (2002).

Поскольку реакция циклоприсоединения Гуисгена включает селективную реакцию циклоприсоединения (см., например, Padwa, A., в *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B.M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. в *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176), а не нуклеофильного замещения, включение не кодируемых в природных условиях аминокислот, несущих азид- и алкинсодержащие боковые цепи, позволяет получить полипептиды, которые селективно модифицированы в положении не кодируемой в природных условиях аминокислоты. Циклоприсоединение с участием азид- или алкинсодержащих полипептидов релаксина может быть осуществлено при комнатной температуре в водной среде путем добавления Cu(II) (включая, но не ограничиваясь перечисленными, в форме каталитического количества CuSO₄) в присутствии восстановителя для снижения Cu(II) до Cu(I) на месте в каталитическом количестве. См., например, Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tomoe, C.W., et al., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Примеры восстанавливающих агентов включают, но не ограничиваясь перечисленными, аскорбат, металлическую медь, хинин, гидрохинон, витамин К, глутатион, цистеин, Fe²⁺, Co²⁺ и приложение электрического потенциала.

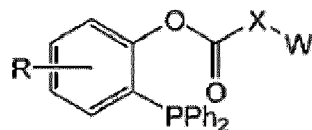
В некоторых случаях, когда реакция [3+2] циклоприсоединения Гуисгена между азидом и алкином желательна, полипептид релаксина содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты, содержащие группу алкина, и водорастворимый полимер, который должен быть присоединен к этой аминокислоте, содержит азидный фрагмент. Кроме того, обратная реакция (т.е. азидный фрагмент на аминокислоте и алкиновый фрагмент присутствует на водорастворимом полимере) также может быть выполнена.

Азидная функциональная группа может также селективно реагировать с водорастворимым полимером, содержащим ариловый эфир и соответствующим образом функционализированный арилфосфиновой группой, с образованием амидной связи.

Группа арилфосфина восстанавливает азид *in situ*, и в результате амин затем эффективно взаимодействует с проксимальной связью сложного эфира с образованием соответствующего амида. См., E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000).

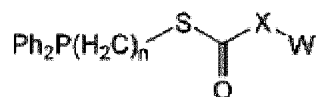
Азидсодержащая аминокислота может быть алкилазидом (включая, но не ограничиваясь перечисленными, 2-амино-6-азидо-1-капроновую кислоту) или арилазидом (p-азидофенилаланин).

Примеры растворимых в воде полимеров, содержащих ариловый эфир и группу фосфина, могут быть представлены следующим образом:



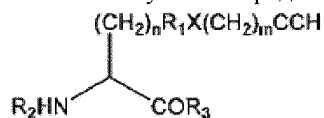
где X может быть O, N, S или отсутствовать, Ph представляет собой фенил, W является водорастворимым полимером и R может быть H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил группы. Примеры групп R включают, но не ограничиваются перечисленными, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -галоген, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN и -NO₂. R', R'', R''' и R'''' независимо друг от друга обозначают водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, но не ограничиваясь этим, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси или тиоалкоксигруппы или ариалкилгруппы. Если соединение согласно настоящему изобретению содержит более одной группы R, например, каждая из групп R независимо выбрана как каждая группа R', R'', R''' и R'''', если такая группа присутствует в количестве более одной. Если R' и R'' присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с этим атомом азота с образованием 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, предполагается, что -NR'R'' включает 1-пирролидинил и 4-морфолинил, но не ограничивается им. Из приведенного выше описания заместителей специалисту в данной области техники будет понятно, что термин "алкил" подразумевает включение групп, включающих атомы углерода, связанные с группами, отличными от водородных групп, таких как галогеналкил (включая, но не ограничиваясь перечисленными, -CF₃ и CH₂CF₃) и ацил (включая, но не ограничиваясь этим, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ и тому подобное).

Азидная функциональная группа может также селективно реагировать с водорастворимым полимером, содержащим тиоэфир и соответствующим образом функционализированным группой арилфосфина, с образованием амидной связи. Группа арилфосфина восстанавливает азид *in situ*, и образованный амин затем эффективно реагирует тиоэфирной связью с образованием соответствующего амида. Примеры растворимых в воде полимеров, содержащих тиоэфирную и фосфиновую группу, могут быть представлены следующим образом:



где $n=1-10$; X может быть O, N, S или отсутствовать, Ph представляет собой фенил и W представляет собой водорастворимый полимер.

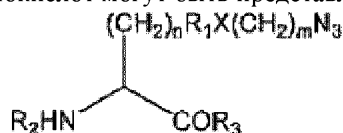
Примеры алкинсодержащих аминокислот могут быть представлены следующим образом:



где $n=0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует; X является O, N, S или отсутствует, $m=0-10$, R_2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицированную группу, R_3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, X отсутствует, $m=0$, и ацетиленовая группа расположена в пара-положении по отношению к алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, X представляет собой O, $m=1$ и пропаргилгруппа расположена в пара-положении по отношению к алкильной боковой цепи (например, O-пропаргилтирозин). В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 и X отсутствуют и $m=0$ (т.е. пропаргилглицин).

Алкинсодержащие аминокислоты являются коммерчески доступными. Например, пропаргилглицин можно приобрести в Peptech (Burlington, MA). Кроме того, алкинсодержащие аминокислоты могут быть получены в соответствии со стандартными способами. Например, p-пропаргилглюксифенилаланин может быть синтезирован, например, как описано в Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), и 4-алкинил-L-фенилаланин может быть синтезирован как описано в Kayser, B., et al., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Другие алкинсодержащие аминокислоты могут быть получены путем, известным специалисту в данной области.

Примеры азидсодержащих аминокислот могут быть представлены следующим образом:



где $n=0-10$; R_1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил или отсутствует; X является O, N, S или отсутствует, $m=0-10$, R_2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или аминоконцевую модифицированную группу и R_3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или карбоксиконцевую модифицирующую группу. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, X отсутствует, $m=0$, и азидная группа расположена в пара-положении по отношению к алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления $n=0-4$, R_1 и X отсутствуют, и $m=0$. В некоторых вариантах осуществления $n=1$, R_1 представляет собой фенил, X представляет собой O, $m=2$, и β -азидэтоксигруппа расположена в пара-положении по отношению к алкильной боковой цепи.

Азидсодержащие аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, 4-азидофенилаланин может быть приобретен в Chem-Impex International, Inc. (Вуд-Дейл, Иллинойс). Для тех азидсодержащих аминокислот, которые не являются коммерчески доступными, азидогруппы могут быть получены сравнительно легко с помощью стандартных способов, известных специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, путем вытеснения подходящей уходящей группы (включая, но не ограничиваясь этим, галогенид, мезилат, тозилат) или через открытие надлежащим образом защищенного лактона. См., например, Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Е. Аминотиоловые реакционные группы.

Уникальная реактивность β -замещенных аминотиоловых функциональных групп делает их чрезвычайно полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул, содержащих альдегидные группы, через формирование тиазолидина. См., например, J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. В некоторых вариантах осуществления β -замещенные аминотиоловые аминокислоты могут быть включены в полипептиды релаксина и затем использованы в реакции с водорастворимыми полимерами, содержащими альдегидную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления водорастворимый полимер, конъюгат лекарства или другие введенные полезные заместители могут быть связаны с полипептидом релаксина, содержащим β -замещенную аминотиоловую аминокислоту, через образование тиазолидина.

Ф. Дополнительные реакционные группы.

Дополнительная реакционная группа и не кодируемые в природных условиях аминокислоты, в том числе, но не ограничиваясь этим, парааминофенилаланин, которые могут быть включены в полипептиды

релаксина изобретения, как описано в следующих патентных заявках, которые все включены в настоящее описание путем ссылки в настоящий документ полностью: заявке США № 2006/0194256, заявке США № 2006/0217532, заявке США № 2006/0217289, предварительной заявке США № 60/755 338; предварительной заявке США № 60/755 711; предварительной заявке США № 60/755 018; международной патентной заявке № PCT/U S06/49397; WO 2006/069246; предварительной заявке США № 60/743041; предварительной заявке США № 60/743040; международной патентной заявке № PCT/US 06/47822, предварительной заявке США № 60/882819; предварительной заявке США № 60/882500 и предварительной заявке США № 60/870594. В этих заявках также описаны реакционные группы, которые могут присутствовать на ПЭГ или других полимерах, в том числе, но не ограничиваясь этим, гидроксил-мин(аминоксид)группы для конъюгирования.

Поглощение клетками неприродных аминокислот.

Поглощение неприродных аминокислот клеткой является одним из вопросов, которые обычно учитываются при разработке и выборе неприродных аминокислот, в том числе, но не ограничиваясь этим, для встраивания в белок. Например, высокая плотность заряда α -аминокислот указывает на то, что эти соединения вряд ли способны проникать в клетки. Природные аминокислоты усваиваются в эукариотической клетке путем сбора транспортной системой на основе белков. Может быть осуществлен быстрый скрининг для оценки того, какие неприродные аминокислоты, если таковые имеются, поглощаются клетками. См., например, анализы токсичности, например, в патенте США № 2004/0198637, озаглавленном "Protein Arrays", который включен в настоящее описание путем ссылки, и Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785. Хотя поглощение легко исследовать различными тестами, альтернативой разработки неприродных аминокислот, которые поддаются клеточным путям поглощения, является обеспечение биосинтетических путей для создания аминокислот *in vivo*.

Биосинтез неприродных аминокислот.

Существует много путей биосинтеза в клетках для продукции аминокислот и других соединений. В то время как биосинтетических способов конкретной неприродной аминокислоты может не существовать в природных условиях, в том числе, но не ограничиваясь этим, в клетке, изобретение обеспечивает такие способы. Например, биосинтез неприродных аминокислот необязательно генерируется в клетке-хозяине путем добавления новых ферментов или изменения существующих путей клетки-хозяина. Среди новых ферментов необязательно естественные ферменты или искусственно полученные ферменты. Например, биосинтез *p*-аминофенилаланина (как представлено в качестве примера в WO 2002/085923, озаглавленной "In vivo включение неприродных аминокислот") основан на добавлении комбинации известных ферментов из других организмов. Гены этих ферментов могут быть введены в эукариотическую клетку путем трансформации клетки с плазмидой, содержащей гены. Гены в процессе экспрессии в клетке обеспечивают ферментативные пути синтеза целевого соединения. Примеры типов ферментов, которые необязательно добавляют, представлены в приведенных ниже примерах. Дополнительную последовательность ферментов можно найти, например, в Genbank. Искусственно полученные ферменты, также могут быть добавлены в клетку аналогичным образом. Таким образом, манипулирование клеточными механизмами и ресурсами позволяет получить неприродные аминокислоты.

Различные способы доступны для получения новых ферментов для использования в биосинтетических путях или для преобразования существующих путей. Например, рекурсивная рекомбинация, в том числе, но не ограничиваясь этим, разработанная Maxygen, Inc. (доступно на World Wide Web в maxygen.com), может использоваться для разработки новых ферментов и путей. См., например, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391; и, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. Точно так же DesignPath™, разработанная Genencor (доступно на World Wide Web в genencor.com) может использоваться для конструирования метаболических путей включая, но не ограничиваясь этим проектированием пути для продукции *O*-метил-*L*-тирозина в клетке. Эта технология воссоздает существующие пути в организме-хозяине, используя комбинацию из новых генов, включая, но не ограничиваясь этим, выявленные методами функциональной геномики и молекулярной эволюции и дизайна. Diversa Corporation (доступны на World Wide Web в diversa.com) также обеспечивает методики для быстрого скрининга библиотеки генов и генных путей, в том числе для создания новых путей, но не ограничиваясь этим.

Обычно неприродная аминокислота продуцируется с использованием биосинтетического пути согласно настоящему изобретению в концентрации, достаточной для эффективного биосинтеза белка, в том числе, но не ограничиваясь этим, обычного количества в клетке, но не до такой степени, чтобы повлиять на концентрацию других аминокислот или истощение клеточных ресурсов. Типичные концентрации продукции *in vivo*, таким образом, составляют от приблизительно 10 до приблизительно 0,05 мМ. После трансформации клетки плазмидой, содержащей гены, используемые для продукции ферментов, необходимых для конкретного пути и образования неприродных аминокислот, может быть использована *in vivo* селекция необязательно для дальнейшей оптимизации продукции неприродных аминокислот для

синтеза рибосомных белков и клеточного роста.

Полипептиды с неприродными аминокислотами.

Встраивание неприродных аминокислот может быть осуществлено для различных целей, в том числе, но не ограничиваясь этим, адаптации изменений в структуре и/или функции белка, изменение размера, кислотности, нуклеофильности, водородных связей, гидрофобности, доступности сайтов-мишеней протеаз, ориентации на группу (включая, но не ограничиваясь перечисленными: для белковых чипов), присоединения биологически активных молекул, присоединения полимера, присоединение радионуклидов, модуляции полужизни в сыворотке, модуляции проникновения в ткани (например, опухоли), модуляции активного транспорта, модуляции ткани, тканевой или органной специфичности или распределения, модуляции иммуногенности, модуляции сопротивления протеазам и т.д. Белки, которые содержат неприродные аминокислоты, могут иметь усиленные или даже совершенно новые каталитические или биофизические свойства. Например, следующие свойства могут быть модифицированы путем встраивания неприродных аминокислот в белок: токсичность, биораспределение, структурные свойства, спектроскопические свойства, химические и/или фотохимические свойства, каталитическая активность, время полужизни (включая, но не ограничиваясь временем полужизни в сыворотке), способность реагировать с другими молекулами, в том числе, но не ограничиваясь этим, ковалентно или нековалентно, и тому подобное. Композиции, включающие белки, которые включают по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, пригодны для в том числе, но не ограничиваясь этим, новой терапии, диагностики в качестве каталитических ферментов, промышленных ферментов, белков (включая антитела, но не ограничиваясь ими), и в том числе, но не ограничиваясь этим, для изучения структуры и функции белка. См., например, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

В одном аспекте изобретения композиция содержит по меньшей мере один белок, содержащий по меньшей мере одну, в том числе, но не ограничиваясь, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять или более неприродных аминокислот. Неприродные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными, в том числе, но не ограничиваясь этим, может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных сайтов в белке, которые включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных неприродных аминокислот. В другом аспекте композиция содержит белок, в котором по меньшей мере один, но меньше чем все остатки определенной аминокислоты, присутствующие в белке, заменены на неприродную аминокислоту. Для данного белка с более чем одной неприродной аминокислотой неприродные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными (включая, но не ограничиваясь этим, белок может включать два или более различных типов неприродных аминокислот или может включать две одинаковые неприродные аминокислоты). Для данного белка с более чем двумя неприродными аминокислотами, неприродные аминокислоты могут быть одинаковыми, разными или представлять собой комбинацию нескольких неприродных аминокислот одного типа по меньшей мере с одной другой неприродной аминокислотой.

Белки или полипептиды, представленные хотя бы с одной неприродной аминокислотой, являются признаком изобретения. Изобретение также включает полипептиды или белки, в которых по меньшей мере одна неприродная аминокислота получена с использованием композиций и способов согласно настоящему изобретению. Наполнитель (включая фармацевтически приемлемый наполнитель, но не ограничиваясь этим) также может присутствовать с белком.

При продуцировании белков или полипептидов, содержащих по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, в эукариотических клетках, белках или полипептидах, обычно включают эукариотические посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления белок содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту и по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, сделанную *in vivo* в эукариотической клетке, причем указанная посттрансляционная модификация не осуществляется в прокариотической клетке. Например, посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются перечисленными: ацетилирование, ацилирование, модификации липидами, пальмитоилирование, присоединение пальмитата, фосфорилирование, модификации присоединения гликолипидов, гликозилирование и тому подобное. В одном аспекте посттрансляционная модификация включает присоединение олигосахаридов (включая, но не ограничиваясь этим (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc)) на аспарагин путем образования связи GlcNAc-аспарагин. См. табл. 1, в которой приведены некоторые примеры из N-связанных олигосахаридов эукариотических белков (также могут присутствовать дополнительные остатки, которые не показаны). В другом аспекте посттрансляционная модификация включает прикрепление олигосахаридов (включая, но не ограничиваясь этим, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc и т.д.), к серину или треонину путем образования связи GalNAc-серин или треонин GalNAc или GlcNAc-серин или треонин-GlcNAc.

Таблица 1

Примеры олигосахаридов через GlcNAc-связь	
Тип	Базовая структура
ВЫСОКАЯ МАННОЗА	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \quad \swarrow \\ \text{Man}\alpha 1-6 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \\ \quad \quad \quad \searrow \quad \swarrow \\ \quad \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
ГИБРИД	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \quad \swarrow \\ \quad \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
КОМПЛЕКС	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \quad \swarrow \\ \quad \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
КСИЛОЗА	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \quad \searrow \quad \swarrow \\ \quad \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $

В еще одном аспекте посттрансляционная модификация включает протеолитический процессинг предшественников (включая, но не ограничиваясь этим, предшественника кальцитонина, связанного с геном кальцитонина пептида-предшественника, препропаратиреоидного гормона, препроинсулина, проинсулина, препроопиомеланокортина, проопиомеланокортина и т.п.), сборка белка из нескольких субъединиц или сборку макромолекулы, перемещение в другой участок клетки (включая, но не ограничиваясь перечисленными, в органеллах, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядра, лизосомы, пероксисомы, митохондрии, хлоропласты, вакуоли и т.д. или через секреторный путь). В некоторых вариантах осуществления белок содержит последовательность секреции или локализации, эпитопы меток, метку FLAG теги, полигистидиновую метку, слияние с GST или тому подобное. Одним из преимуществ неприродной аминокислоты является то, что она обеспечивает дополнительные химические фрагменты, которые могут быть использованы для присоединения дополнительных молекул. Эти изменения могут быть сделаны *in vivo* в эукариотических или неэукариотических клетках или *in vitro*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация осуществлена через неприродные аминокислоты. Например, посттрансляционная модификация может быть осуществлена через нуклеофильно-электрофильную реакцию. Большинство реакций, используемых в настоящее время для селективной модификации белков, связаны с формированием ковалентных связей между нуклеофильным и электрофильным партнерами реакции, включая реакции α -галокетонов со стороны цепей гистидина или цистеина, но не ограничиваясь ими. Селективность в этих случаях определяется количеством и доступностью нуклеофильных остатков в белке. В белках согласно настоящему изобретению могут быть использованы другие, более селективные реакции, такие как реакция неприродных кетоаминокислот с гидразидсодержащими или аминокислосоединениями, *in vitro* и *in vivo*. См., например, Cornish, et al., (1996) J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) Science 292:498-500; Chin, et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang, et al., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; и Chin, et al., (2003) Science, 301:964-7, все из которых включены в настоящий документ путем ссылки. Это позволяет избирательно метить практически любой белок большим количеством реагентов, включая флуорофоры, сшивающие агенты, производные сахаров и цитотоксические молекулы. См. также патент США № 6927042, озаглавленный "Синтез гликопротеинов", который включен в настоящее описание путем ссылки. Посттрансляционные модификации, в том числе, но не ограничиваясь этим, через азидоаминокислоты также могут быть осуществлены через легирование по Штаудингеру (включая, триарилфосфиновыми реагентами, но не ограничиваясь этим). См., например, Klicik et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

Настоящее изобретение обеспечивает еще один весьма эффективный способ для селективной модификации белков, который генетическое встраивание неприродных аминокислот, в том числе, но не ограничиваясь этим, содержащих азидную или алкинильную группу, в белки в ответ на селекторный кодон. Эти боковые цепи аминокислот могут быть модифицированы, в том числе, но не ограничиваясь этим, реакцией [3+2] циклоприсоединения Гуисгена (см., например, Padwa, A. в Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4 (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; и, Huisgen, R. в 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176), в том числе, но не ограничиваясь ими, алкинил- или азидпроизводными соответственно. Поскольку этот способ включает циклоприсоеди-

нение, а не нуклеофильное замещение, белки могут быть модифицированы с чрезвычайно высокой селективностью. Эту реакцию можно проводить при комнатной температуре в водной среде с отличной региоселективностью ($1,4 > 1,5$) путем добавления каталитических количеств Cu(I) соли в реакционную смесь. См., например, Togni, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; и, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Другим способом, который может быть использован, является обмен лигандом бисмышьякового соединения с тетрацстеиновым фрагментом, см., например, Griffin, et al., (1998) *Science* 281:269-272.

Молекулы, которые могут быть присоединены к белку согласно настоящему изобретению через [3+2] циклоприсоединение, включают практически любую молекулу с азидным или алкинильным производным. Молекулы включают, но не ограничиваются перечисленным, красители, флуорофоры, сшивающие агенты, производные сахаров, полимеры (включая, но не ограничиваясь производными полиэтиленгликоля), фотокросслинкеры, цитотоксические соединения, аффинные метки, производные биотина, смолы, гранулы, второй белок или полипептид (или более), полинуклеотид(ы) (включая, но не ограничиваясь перечисленными: ДНК, РНК и др.), металлохелаторы, кофакторы, жирные кислоты, углеводороды и тому подобное. Эти молекулы могут быть присоединены к неприродной аминокислоте с алкинильной группой, включая *p*-пропаргиллоксибензилаланин, но не ограничиваясь им, или азидогруппы, включая *p*-азидофенилаланин, но не ограничиваясь им, соответственно. Получение *in vivo* полипептидов релаксина, содержащих не кодируемые в природных условиях аминокислоты.

Полипептиды релаксина изобретения могут быть получены *in vivo* с использованием модифицированных тРНК и тРНК-синтетазы путем добавления или замены аминокислот, не кодируемых в природных системах.

Способы получения тРНК и тРНК-синтетаз, которые используют аминокислоты, не кодируемые в природных системах, описаны, например, в патентных публикациях США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в настоящее описание путем ссылки. Эти способы включают создание механизма трансляции, который действует независимо от синтетазы и тРНК, эндогенных по отношению к системе трансляции (и поэтому иногда называется "ортогональным"). Как правило, система трансляции включает ортогональные тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоацил-тРНК-синтетазу (О-РС). Как правило, в этой системе трансляции О-РС преимущественно аминоацилирует О-тРНК по меньшей мере одной не кодируемой в природных условиях аминокислотой и О-тРНК распознает по меньшей мере один селекторный кодон, не распознаваемый другими тРНК в этой системе. Соответственно, система трансляции встраивает не кодируемые в природных условиях аминокислоты в белок, вырабатываемый в системе, в ответ на закодированный селектор кодон, тем самым "заменяя" аминокислоту в положение кодируемого полипептида. Широкий спектр ортогональных тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз описан в литературе для встраивания, в частности, синтетических аминокислот в полипептиды, которые в целом пригодны для использования в настоящем изобретении. Например, кето-специфическая О-тРНК / аминоацил-тРНК синтетаза описана в Wang, L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:56-61 (2003) и Zhang, Z. Et al., *Biochem.* 42(22):6735-6746 (2003). Представительные О-РС или их части кодируются полинуклеотидными последовательностями и включают аминокислотные последовательности, описанные в патентных публикациях США №№ 7045337 и 7083970, каждая из которых включена в настоящее описание путем ссылки. Соответствующие молекулы О-тРНК для использования с О-РС синтетазами также описаны в патентных публикациях США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в настоящее описание путем ссылки. Дополнительные примеры пар О-тРНК /аминоацил-тРНК синтетазы описаны в WO 2005/007870, WO 2005/007624 и WO 2005/019415.

Пример азидспецифической синтетазы О-тРНК/аминоацил-тРНК описан в Chin, J.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002). Представительные О-РС последовательности *p*-азидо-*L*-фенилаланина включают, но не ограничиваются перечисленным, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 14-16 и 29-32 и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 46-48 и 61-64, описанные в патенте США № 7083970, который включен в настоящее описание путем ссылки. Примеры последовательностей О-тРНК, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-3, описанные в патенте США № 7083970, который включен в настоящее описание путем ссылки. Другие примеры пар О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетаза, специфичных для конкретных не кодируемых в природных условиях аминокислот, описаны в патенте США № 7045337, который включен в настоящее описание путем ссылки. О-РС и О-тРНК, которые встраивают как ацето-, так и азидсодержащие аминокислоты в *S.cerevisiae*, описаны в Chin, J.W., et al., *Science* 301:964-967 (2003). Сообщалось о нескольких других ортогональных парах. Системы для глутамила (см., например, Liu, D.R., and Schultz, P.G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:4780-4785), аспартила (см., например, Past PHKk, M. и et al., (2000) *Helv. Chim. Acta* 83:2277-2286) и тирозила (см., например, Ohno, S., et al., (1998) *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* 124:1065-1068; и, Kowal, A.K., et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:2268-2273), полученные из тРНК синтетазы *S. cerevisiae* были описаны для потенциального встраивания неприродных аминокислот в *E.coli*. Системы из глутаминил синтетазы *Escherichia coli* (см., например, Kowal, A.K., et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:2268-2273) и тирозила (см., например, Edwards, H., and Schimmel, P. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:1633-1641) были описаны для

использования в *S. cerevisiae*. Тирозильная система *Escherichia coli* была использована для встраивания 3-йодо-L-тирозина *in vivo*, в клетках млекопитающих. См., Sakamoto, K., et al., (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:4692-4699. Использование О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетаз предполагает выбор конкретного кодона, кодирующего не кодируемые в природных условиях аминокислоты. Хотя любой кодон может быть использован, обычно желательно выбрать кодон, который редко или никогда не используется в клетке, в которой экспрессируются О-тРНК/аминоацил-тРНК-синтазы. Примеры таких кодонов включают нонсенс-кодон, такой как стоп-кодон (амбер, охра и опал), кодон, состоящий из четырех или более оснований, и другие природные кодоны из трех оснований, которые используются редко или не используются. Специальный селекторный кодон(ы) может быть введен(введены) в соответствующие положения в полинуклеотидной последовательности, кодирующей релаксин, с использованием методов мутагенеза, известных в данной области (включая, но не ограничиваясь перечисленными, сайт-специфический мутагенез, касетный мутагенез, мутагенез с ограничением выбора и т.д.).

Способы для создания компонентов механизма биосинтеза белка, таких как О-РС, О-тРНК, и ортогональных пар О-тРНК/О-РС, которые могут быть использованы для встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот, описаны в Wang, L., et al. *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J.W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Способы и композиции для встраивания *in vivo* не кодируемых в природных условиях аминокислот описаны в патенте США № 7045337, который включен в настоящее описание путем ссылки. Способы выбора пары ортогональная тРНК-тРНК-синтаза для использования *in vivo* системы трансляции организма, также описаны в патентных публикациях США №№ 7045337 и 7083970, которые включены в настоящее описание путем ссылки. В публикации РСТ № WO 04/035743, озаглавленной "Сайт-специфическое включение кетоаминокислот в белки", которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки, описываются ортогональные пары тРНК и РС для встраивания кетоаминокислот. В публикации РСТ WO 04/094593, озаглавленной "Расширенный эукариотический генетический код", которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки, описываются ортогональные пары РС и тРНК для встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот в эукариотических клетках-хозяевах.

Способы для получения по меньшей мере одной рекомбинантной ортогональной аминокацил-тРНК-синтазы (О-РС) включают: (а) получение библиотеки (возможно, мутантных) РС, полученных из по меньшей мере одной аминокацил-тРНК-синтазы (РС) от первого организма, в том числе, но не ограничиваясь, прокариотических организмов, таких как *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* или подобных, или эукариотических организмов; (б) селекции (и/или скрининга) библиотеки РС (не обязательно мутантных РС), направленной на обнаружение членов, которые предпочтительно аминокацилируют ортогональную тРНК (О-тРНК) в присутствии не кодируемой в природных условиях аминокислоты и природной аминокислоты, в результате формируют пул активных (возможно мутантных) РС, и/или (с) селекцию (возможно, путем отрицательного отбора) пула активных РС (включая, но не ограничиваясь мутантными РС), которые преимущественно аминокацилируют О-тРНК в отсутствие не кодируемой в природных условиях аминокислоты, в результате получают по меньшей мере одну рекомбинантную О-РС, причем указанная по меньшей мере одна рекомбинантная О-РС преимущественно аминокацилирует О-тРНК не кодируемой в природных условиях аминокислотой.

В одном варианте осуществления РС является неактивной РС. Неактивная РС может быть получена в результате мутирования РС. Например, неактивная РС может быть получена в результате изменения путем мутации по меньшей мере приблизительно 1, по меньшей мере приблизительно 2, по меньшей мере приблизительно 3, по меньшей мере приблизительно 4, по меньшей мере приблизительно 5, по меньшей мере приблизительно 6 или по меньшей мере приблизительно 10 или более аминокислот на другие различные аминокислоты, в том числе, но не ограничиваясь, аланин. Библиотеки мутантных РС могут быть созданы с использованием различных методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленные, рациональное проектирование на основе трехмерной структуры белка РС, или мутагенеза нуклеотидов РС по методике случайного или рационального дизайна. Например, мутантные РС могут быть получены путем сайт-специфических мутаций, случайных мутаций, рекомбинантных мутаций, обеспечивающих разнообразие, конструирования химер, рационального дизайна и другими способами, описанными в настоящем документе или известными в данной области.

В одном из вариантов осуществления селекция (и/или скрининг) библиотеки РС (не обязательно мутантных РС), направленная на поиск, которые являются активными, включая тех, которые аминокацилируют ортогональную тРНК (О-тРНК) в присутствии не кодируемой в природных условиях аминокислоты и природной аминокислоты, включает введение маркера положительного отбора или скрининга, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, гена устойчивости к антибиотику и т.п., и библиотеки (опционально мутант) РС в множество клеток, причем маркер положительного отбора и/или скрининга содержит по меньшей мере один селекторный кодон, в том числе, но не ограничиваясь, амбер-, охра- или опал-кодон, выращивание этого множества клеток в присутствии агента селекции; идентификацию клеток, которые выживают (или показывают специфический ответ) в присутствии агента селекции и/или скрининга, в результате супрессии по меньшей мере одного селекторного кодона в маркере положитель-

ной селекции или скрининга, с получением подмножества положительно выбранных клеток, которое содержит пул активных (опционально мутантных) РС. Необязательно, концентрацию агента селекции выбор и/или скрининга агента можно варьировать.

В одном из аспектов маркер положительного отбора представляет собой ген хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ), и селекторный кодон представляет собой стоп-кодон амбер в кодона амбер в гене САТ. По желанию маркер положительного отбора является геном β -лактамазы, и селекторный кодон является стоп-кодonom амбер в гене β -лактамазы. В другом аспекте маркер положительного скрининга включает флуоресцентные или люминесцентные маркеры скрининга или аффинные маркеры скрининга (включая, но не ограничиваясь этим, маркер клеточной поверхности). В одном из вариантов осуществления негативная селекция или скрининг пула на активные РС (необязательно мутантные), которые преимущественно аминоацилируют О-тРНК в отсутствие не кодируемой в природных условиях аминокислоты, включает введение маркера негативного отбора или скрининга с пулом активных (необязательно мутантных) РС, отобранных в результате положительной селекции или скрининга в множество клеток второго организма, причем маркеры негативного отбора или скрининга содержат по меньшей мере один селекторный кодон (включая, но не ограничиваясь перечисленными, ген устойчивости к антибиотикам, включая, но не ограничиваясь этим, хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ) гена), и, идентификацию клеток, которые выживают или демонстрируют определенный ответ в первой среде с не кодируемой в природных условиях аминокислотой и агентом селекции или скрининга, но не могут выжить или продемонстрировать определенный ответ в среде, не содержащей не кодируемой в природных условиях аминокислоты и агента скрининга или селекции, что обеспечивает выживание клеток или отбор клеток по меньшей мере с одной рекомбинантной О-РС. Например, протокол идентификации САТ необязательно выступает в качестве положительного отбора и/или отрицательного отбора в определении соответствующих О-РС рекомбинантов. Например, пул клонов необязательно реплицируются на планшеты для выращивания, содержащие САТ (которая содержит по меньшей мере один селекторный кодон) с или без одной или нескольких не кодируемых в природных условиях аминокислот. Соответственно, колонии, растущие исключительно на планшетах, содержащих не кодируемые в природных условиях аминокислоты, таким образом, рассматривают как содержащие рекомбинантную О-РС. В одном аспекте концентрации маркеров отбора (и/или скрининга) могут варьировать. В некоторых аспектах первый и второй организмы различаются. Соответственно, первый и/или второй организм необязательно включают прокариоты, эукариоты, млекопитающих, кишечную палочку, грибы, дрожжи, архабактерии, зубактерии, растения, насекомых, простейших и т.д. В других вариантах осуществления маркер скрининга включает флуоресцентный маркер или люминесцентный маркер скрининга или аффинный маркер скрининга. В другом варианте осуществления скрининг или селекция (включая, но не ограничиваясь отрицательной селекцией) пула на активные (возможно мутантные) РС включает выделение пула активных мутантов РС в результате этапа положительной селекции (b) введение маркеров негативного скрининга или селекции, причем маркеры негативного отбора или селекции содержат по меньшей мере один селекторный кодон (включая, но не ограничиваясь этим, токсичный маркерный ген, в том числе, но не ограничиваясь, ген бамазерибонуклеазы, содержащий по меньшей мере один селекторный кодон) и пул активных (возможно мутант) РС в множество клеток второго организма, и идентификацию клеток, которые выживают или демонстрируют конкретный ответ, используемый для отбора, в первой среде, не дополненной не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, но не могут выжить или продемонстрировать определенный ответ, используемый для отбора, во второй среде с не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, что обеспечивает выживание или отбор клеток по меньшей мере с одной рекомбинантной О-РС, причем указанная по меньшей мере одна рекомбинантная О-РС является специфической для не кодируемой в природных условиях аминокислоты. В одном аспекте по меньшей мере один селекторный кодон включает два или более селекторных кодона. Такие варианты могут необязательно включать по меньшей мере один селекторный кодон, который состоит из двух или более селекторных кодонов, и при этом первый и второй организмы различаются (при этом каждый организм может включать прокариот, эукариот, млекопитающее, кишечную палочку, грибки, дрожжи, архебактерии, зубактерии, растения, насекомых, простейших и т.д., но не только перечисленные организмы). Предусмотрены некоторые аспекты, в которых маркер отрицательной селекции включает ген рибонуклеазы барназы (которая включает по меньшей мере один селекторный кодон). Также предусмотрены другие аспекты, в которых маркеры скрининга необязательно включают флуоресцентные или люминесцентные маркеры скрининга или аффинные маркеры скрининга. В описанных вариантах осуществления скрининг и/или селекция (отбор) необязательно включает изменение жесткости скрининга и/или выбора.

В одном из вариантов осуществления способ получения по меньшей мере одной рекомбинантной ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазы (О-РС) может дополнительно включать: (d) выделение по меньшей мере одной рекомбинантной О-РС; (e) получение второго набора О-РС (опционально мутантных), полученный по меньшей мере из одной рекомбинантной О-РС, и (f) повторение стадий (b) и (c) до получения мутированной О-РС, которая обладает способностью преимущественно аминоацилировать О-тРНК. При необходимости шаги (d)-(f) повторяют, включая, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере

примерно два раза. В одном аспекте второй набор мутированных О-РС, полученный по меньшей мере из одной рекомбинантной О-РС, может быть получен путем мутагенеза, в том числе, но не ограничиваясь, случайного мутагенеза, сайт-специфического мутагенеза, рекомбинации или их комбинации.

Строгость этапов селекции/скрининга, включая, но не ограничиваясь перечисленными, положительными этапами селекции/скрининга (b), или стадиями негативной селекции/скрининга (c) или обоих этапов позитивной и негативной селекции/скрининга (b) и (c), в описанных выше способах, необязательно включает варьирование жесткости селекции/скрининга. В другом варианте осуществления этапы положительной селекции/скрининга (b), этапы отрицательной селекции/скрининга (c) или этапы и позитивной и негативной селекции/скрининга (b) и (c) включают использование репортера, причем указанный репортер детектируется методом активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) или репортер детектируется люминесцентным методом. Необязательно, репортер располагается на клеточной поверхности, на дисплее фагов и т.п. и выбирается по аффинности или каталитической активности, связанных с не кодируемой в природных условиях аминокислотой или аналогом. В одном варианте осуществления мутированная синтетаза представлена на клеточной поверхности, на фаговом дисплее или тому подобное.

Способы получения ортогональных рекомбинантных тРНК (О-тРНК), включают: (a) создание библиотеки мутантных тРНК, полученных по меньшей мере из одной тРНК, в том числе, но не ограничиваясь, супрессорной тРНК, из первого организма; (b) отбор (включая, но не ограничиваясь перечисленными: отрицательный выбор) или скрининг библиотеки (возможно мутантных) тРНК, аминокислотилируемых аминокислот-тРНК-синтазой (RS) из второго организма в отсутствие РС из первого организма, что обеспечивает пул (возможно мутантных) тРНК, и (c) селекцию или скрининг пула возможно мутантных тРНК, направленные на поиск членов, аминокислотилируемых введенной ортогональной РС (О-РС), что обеспечивает по меньшей мере одну рекомбинантную О-тРНК, причем указанная по меньшей мере одна рекомбинантная О-тРНК распознает селекторный кодон и при этом не распознается эффективно РСазой из второго организма и преимущественно аминокислотилируется О-РСазой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна тРНК является супрессорной тРНК и/или включает уникальные кодоны из трех природных и/или не природных оснований или представляет собой нонсенс-кодон, редкий кодон, не природный кодон, кодон, содержащий по меньшей мере 4 основания, стоп-кодон амбер, охра или опал. В одном варианте осуществления рекомбинантная О-тРНК обладает улучшенной ортогональностью. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления О-тРНК возможно импортируют в первый организм из второго организма без необходимости модификации. В различных вариантах осуществления первый и второй организмы являются одинаковыми или разными и возможно выбраны из прокариот (включая, но не ограничиваясь перечисленными, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, кишечная палочка, *Halobacterium* и т.д.), эукариот, млекопитающих, грибов, дрожжей, археобактерий, зубобактерий, растений, насекомых, простейших и т.д., но не ограничиваются перечисленными организмами. Кроме того, рекомбинантная тРНК возможно аминокислотилируется не кодируемой в природных условиях аминокислотой, причем не кодируемые в природных условиях аминокислоты синтезируются *in vivo* либо естественным путем или с помощью генных манипуляций. Не кодируемые в природных условиях аминокислоты могут быть добавлены в ростовую среду, по меньшей мере, первого или второго организма.

В одном аспекте селекция (включая негативную селекцию, но не ограничиваясь ей) или скрининг библиотеки (возможно мутантных) тРНК, аминокислотилируемых аминокислот-тРНК-синтазой (стадия (b)) включает введение токсичного маркерного гена, причем токсичный маркерный ген содержит по меньшей мере один селекторный кодон (или генов, которые приводят к образованию токсичных или статического агента или генов, необходимых для организма, где такой ген-маркер содержит по меньшей мере один селекторный кодон) и библиотеки (опционально мутант) тРНК в множество клеток из второго организма, и, выбрав выжившие клетки, в которых выжившие клетки содержат пул (опционально мутант) тРНК, содержащий по меньшей мере одну ортогональную тРНК или нефункциональные тРНК. Например, выжившие клетки могут быть выбраны с помощью мобильного сравнения анализа соотношения плотности. В другом аспекте токсичный маркерный ген может включать два или более селекторных кодона. В другом варианте осуществления способов токсичный маркерный ген является геном рибонуклеазы барназы, причем ген рибонуклеазы барназы содержит по меньшей мере один амбер-кодон, и ген рибонуклеазы барназы может необязательно содержать два или более амбер-кодона.

В одном из вариантов осуществления селекция или скрининг пула (возможно мутантных) тРНК, направленный на идентификацию членов, аминокислотилируемых введенной ортогональной РС (О-РС), может включать: введение положительной селекции или скрининга маркерных генов, причем положительный маркерный ген включает ген устойчивости к лекарственным средствам (включая, но не ограничиваясь перечисленными, ген β -лактамазы, содержащий по меньшей мере один селекторный кодон, такой как по меньшей мере один стоп-кодон амбер) или ген, необходимый для организма, или ген, который обеспечивает детоксикацию токсичных агентов, вместе с О-РС, и пула (необязательно мутантных) тРНК в множество клеток из второго организма, и идентификацию выживших или прошедших отбор клеток, выращенных в присутствии агентов селекции или скрининга, включая, но не ограничиваясь антибиоти-

ками, что обеспечивает пул клеток, содержащих по меньшей мере одну рекомбинантную тРНК, где указанная по меньшей мере одна рекомбинантная тРНК аминоацилируется О-РСазой и встраивает аминокислоты в продукт трансляции, кодируемый положительным маркерным геном, в ответ на хотя бы один селекторный кодон. В другом варианте осуществления возможно варьирование концентрации агента выбор и/или скрининг. Предложены способы создания конкретных пар О-тРНК/О-РС. Эти способы включают: (а) получение библиотеки мутантных тРНК, полученных по меньшей мере из одной тРНК из первого организма; (б) отрицательную селекцию или скрининг библиотеки (возможно мутантных) тРНК, которые аминоацилируются аминоацил-тРНК-синтетазой (RS) из второго организма в отсутствие РС из первого организма, что обеспечивает пул (возможно мутантных) тРНК; (с) селекцию или скрининг пула (возможно мутантных) тРНК, направленные на идентификацию членов, которые аминоацилируются введенной ортогональной РС (О-РС), в результате чего получают по меньшей мере одну рекомбинантную О-тРНК. По меньшей мере одна рекомбинантная О-тРНК распознает селекторный кодон, и при этом не распознается эффективно РСазой из второго организма и преимущественно аминоацилируется на О-РСазой. Способ дополнительно включает (d) создание библиотеки (возможно мутантных) РС, полученных по меньшей мере из одной аминоацил-тРНК-синтетазы (RS, PC) из третьего организма; (е) селекцию или скрининг библиотек мутантных РС, направленные на идентификацию членов, которые преимущественно аминоацилируются по меньшей мере одной рекомбинантной О-тРНК в присутствии не кодируемой в природных условиях аминокислоты и природной аминокислоты, что обеспечивает пул активных (возможно мутантных) РС, и (f) отрицательную селекцию или скрининг пула активных (возможно мутантных) РС, которые преимущественно аминоацилируются по меньшей мере одной рекомбинантной О-тРНК в отсутствие неприродной аминокислоты, что обеспечивает по меньшей мере одну конкретную О-тРНК/О-РС пару, где хотя бы одна конкретная О-тРНК/О-РС пара содержит по меньшей мере одну специфичную О-РС, которая включает по меньшей мере одну рекомбинантную О-РС, специфичную для не кодируемой в природных условиях аминокислоты и по меньшей мере одну рекомбинантную О-тРНК. Изобретение также включает специфичные пары О-тРНК/О-РС, полученные этими способами. Например, специфичная пара О-тРНК/О-РС может включать, в том числе, но не ограничиваясь этим, пары *mutPHK*Tyr-*mutTyr*RS, такие как пары *mutPHK*Tyr-SS12TyrRS, пары *mutPHK*Leu-*mutLeu*RS, пары *mutPHK*Thr-*mutThr*RS, пары *mutPHK*Glu - *mutGlu*RS или тому подобное. Кроме того, предусмотрены способы, в которых первый и третий организм представляют собой один и тот же организм (включая, но не ограничиваясь этим, *Methanococcus jannaschii*).

Способы селекции ортогональной пары тРНК-тРНК-синтетаза для использования в *in vivo* системе трансляции второго организма также включены в настоящее изобретение. Способы включают введение маркерного гена, тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы (РС), выделенных или производных из первого организма, в первый набор клеток второго организма; введение маркерного гена и тРНК в дублирующий набор клеток второго организма и селекцию выживших клеток в первом наборе, которые не выживают в дублирующем наборе клеток, или скрининг клеток, демонстрирующих определенный ответ, которые не в состоянии дать такой ответ в дублирующем наборе клеток, причем первый набор и дублирующий набор клеток выращивают в присутствии агента селекции или скрининга, и при этом выжившие или отобранные клетки содержат ортогональные пары тРНК-тРНК-синтетазы для использования в *in vivo* системе трансляции второго организма. В одном из вариантов осуществления сравнение и селекция или скрининг включают в естественных условиях анализ комплементации. Концентрации агента селекции или скрининга могут быть различными.

Организмы согласно настоящему изобретению включают различные организмы и различные комбинации. Например, первый и второй организмы в способах настоящего изобретения могут быть одинаковыми или разными. В одном варианте осуществления организмы необязательно являются прокариотическими, включая, но не ограничиваясь перечисленными, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, кишечная палочка, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. Pernix*, *T. Thermophilus* и тому подобное. Кроме того, организмы необязательно включают эукариотические организмы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, растения (включая, но не ограничиваясь перечисленными, высшие растения, такие как однодольные или двудольные), водоросли, простейшие, грибы (включая, но не ограничиваясь перечисленными, дрожжи и т.д.), животные (включая, но не ограничиваясь перечисленными, млекопитающих, насекомых, членистоногих и др.) и тому подобное. В другом варианте осуществления второй организм является прокариотическим организмом, включая, но не ограничиваясь этим, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, кишечная палочка, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. Pernix*, *T. Thermophilus* и тому подобное. Кроме того, второй организм может быть эукариотическим организмом, включая, но не ограничиваясь этим, дрожжи, клетки животного, клетки растения, грибы, клетки млекопитающих и тому подобное. В различных вариантах осуществления первый и второй организмы различны.

Расположение неприродных аминокислот в полипептида релаксинах.

Настоящее изобретение предполагает встраивание одной или нескольких неприродных аминокислот в полипептиды релаксина. Одна или более неприродные аминокислоты могут быть встроены в определенном положении, которое не нарушает активность полипептида. Это может быть достигнуто путем

"консервативных" замен, включая, но не ограничиваясь перечисленным, замену гидрофобных аминокислот гидрофобными аминокислотами, громоздких аминокислот громоздкими аминокислотами, гидрофильных аминокислот гидрофильными аминокислотами и/или встраивание неприродной аминокислоты в месте, которое не требуется для активности. Различные биохимические и структурные подходы могут быть использованы для выбора желаемого сайта для замены не кодируемых в природных условиях аминокислот в полипептиде инсулина. Как очевидно специалистам в данной области, любое положение полипептидной цепи подходит для выбора сайта встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот, и выбор может быть основан на рациональной дизайне или случайном отборе для любой цели без конкретных предпочтений. Выбор целевых сайтов может быть направлен на получение молекулы релаксина, имеющей любые свойства или активность, в том числе, но не ограничиваясь этим, свойства агониста, супер-агониста, обратного агониста, антагониста, модуляции связывания с рецепторами, модуляции активности рецепторов, образования димеров или мультимеров, отсутствие изменений активности или свойств по сравнению с нативной молекулой, на манипуляции с любым физическим или химическим свойством полипептида, таким как растворимость, агрегация или стабильность. Например, положения в полипептиде, необходимые для биологической активности полипептидов релаксина, могут быть идентифицированы с использованием анализа точечных мутаций, сканирования аланином, насыщающего мутагенеза, скрининга биологической активности, или методом сканирования гомологов, известными в данной области. Другие способы могут быть использованы для идентификации остатков для модификации полипептидов релаксина и включают, но не ограничиваются перечисленными, профилирование последовательности (Bowie and Eisenberg, *Science* 253(5016): 164-70, (1991)), rotamer library selections (Dahiyat and Mayo, *Protein Sci* 5(5): 895-903 (1996); Dahiyat and Mayo, *Science* 278(5335): 82-7 (1997); Desjarlais and Handel, *Protein Science* 4: 2006-2018 (1995); Harbury et al., *PNAS USA* 92(18): 8408-8412 (1995); Kono et al., *Proteins: Structure, Function and Genetics* 19: 244-255 (1994); Hellinga and Richards, *PNAS USA* 91: 5803- 5807 (1994)); и residue pair potentials (Jones, *Protein Science* 3: 567-574, (1994)), и rational design using Protein Design Automation® technology, (см. патенты США №№ 6188965; 6269312; 6403312; WO 98/47089, которые включены в настоящее описание путем ссылки). Остатки, которые важны для биологической активности релаксина, остатки, которые связаны с фармацевтической стабильностью, антитела, эпитопы или остатки связывания с рецепторами могут быть мутированы. Патенты США №№ 5580723, 5834250, 6013478, 6428954 и 6451561, которые включены в настоящее описание путем ссылки, содержат описания способов систематического анализа структуры и функции полипептидов, таких как релаксин, путем выявления активных доменов, которые влияют на активность полипептида в отношении вещества-мишени. Остатки, отличные от тех, которые определены в качестве важных для биологической активности по результатам аланинового или гомологичного мутагенеза, могут быть хорошими кандидатами для замены на не кодируемые в природных условиях аминокислоты в зависимости от желаемой активности искомого полипептида. Кроме того, участки, определенные как важные для биологической активности, также могут быть хорошими кандидатами для замены не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, опять же в зависимости от желаемой активности искомого полипептида. Другая альтернатива заключается в том, чтобы просто осуществить последовательные замены в каждом положении на полипептидной цепи на кодируемые в природных условиях аминокислоты и наблюдать эффект на активности полипептида. Специалистам в данной области очевидно, что любые средства, методики или способы выбора положения для замещения неприродных аминокислот в любом полипептиде подходят для использования в настоящем изобретении.

Структуры и активность мутантных полипептидов релаксина, содержащих делеции, могут быть рассмотрены с целью определения участков белка, которые, вероятно, подходят для замен на кодируемые в природных условиях аминокислоты. Аналогичным образом, расщепляющие протеазы и моноклональные антитела могут быть использованы для идентификации участков релаксина, которые отвечают за связывание рецепторов релаксина. После исключения остатков, которые могут быть нетерпимы к заменам не кодируемыми в природных условиях аминокислотами, может быть исследовано влияние предлагаемых замен в каждом из оставшихся положений. Могут быть созданы модели по трехмерной кристаллической структуре релаксина других членов семейства рецепторов релаксина. База данных белков (PDB, доступная в сети World Wide Web по адресу rcsb.org) представляет собой централизованную базу данных, содержащую данные о трехмерной структуре больших молекул белков и нуклеиновых кислот. Модели могут быть использованы для исследования вторичной и третичной структуры полипептидов, если данных о трехмерной структуре не имеется. Таким образом, специалисты в данной области могут легко определить положения аминокислот, которые могут быть заменены не кодируемыми в природных условиях аминокислотами.

Цепь Релаксина А		Комплекс доступности растворителя			Цепь А/В интерфейса		
остаток	№ остатка /SEQ ID NO: 1	Остаток среднее	Главная цепь среднее	Боковая цепь среднее	Остаток среднее	Главная цепь среднее	Боковая цепь среднее
LEU	2	2.393927	2.336841	2.451013	0.00913	0.018259	0
TYR	3	1.05745	1.412109	0.880121	0.448218	0.164923	0.589865
SER	4	2.039557	1.726208	2.666253	0.094701	0.127334	0.029435
ALA	5	1.47603	1.32887	2.064669	0.040922	0.051152	0
LEU	6	0.520247	0.621696	0.418798	0.174242	0.189235	0.159248
ALA	7	0.476043	0.450361	0.578769	0.512186	0.474717	0.662064
ASN	8	1.252271	0.865912	1.638629	0.32958	0.460124	0.199036
LYS	9	0.886439	0.727133	1.013884	0.424786	0.531522	0.339397
CYS	10	0.307912	0.414588	0.094561	0.731348	0.802621	0.588801
CYS	11	0.791671	0.774527	0.825959	1.267628	1.170385	1.462113
HIS	12	1.644891	1.389182	1.815363	0.902367	0.910146	0.897182
VAL	13	1.432029	1.329367	1.568911	0.865782	1.041144	0.631966
GLY	14	0.721258	0.721258	0	0.814179	0.814179	0
CYS	15	0.405285	0.470822	0.274212	0.79239	0.856379	0.664412
THR	16	0.511268	0.367613	0.702808	1.096358	1.011865	1.209014
LYS	17	0.376592	0.233542	0.491032	2.691742	1.414171	3.713799
ARG	18	0.97893	0.478638	1.264811	1.626733	1.12903	1.911135
SER	19	0.416177	0.424198	0.405482	0.476934	0.49423	0.453873
LEU	20	0.155542	0.267306	0.043778	0.735924	0.711222	0.760627
ALA	21	0.478645	0.507787	0.362075	1.105314	1.045545	1.344386
ARG	22	1.273184	1.102102	1.370945	0.551495	0.572567	0.539454
PHE	23	1.054989	1.153619	0.998629	0.428106	0.829454	0.198764
CYS	24	1.352353	1.506838	1.146374	2.07439	2.22276	1.876563
Цепь Релаксина В		Комплекс доступности растворителя			Цепь А/В интерфейса		
остаток	№ остатка /SEQ ID NO: 2	Остаток среднее	Главная цепь среднее	Боковая цепь среднее	Остаток среднее	Главная цепь среднее	Боковая цепь среднее
SER	2	2.241497	2.362674	1.999142	1.249697	1.108926	1.531239
TRP	3	1.036157	1.320435	0.922445	0.774516	1.009561	0.680498
MET	4	0.765903	0.783709	0.748097	1.378683	1.318601	1.438766
GLU	5	1.401968	1.102195	1.641786	1.60857	1.38927	1.784009
GLU	6	1.209446	0.935167	1.428869	0.994341	1.251666	0.788481
VAL	7	1.123345	1.08403	1.175766	1.917498	1.613757	2.322484
ILE	8	0.478044	0.594216	0.361873	1.329975	1.726264	0.933686
LYS	9	1.135226	0.723724	1.464427	2.332893	1.427852	3.056925
LEU	10	0.579	0.504927	0.653072	0.906043	1.195675	0.616411
CYS	11	0.862862	0.806072	0.976442	1.030881	0.795964	1.500714
GLY	12	1.089858	1.089858	0	0.604306	0.604306	0
ARG	13	3.079311	1.482092	3.992007	0.024047	0.066128	0
GLU	14	1.46883	0.992251	1.680643	0.137036	0.204496	0.107054
LEU	15	0.378917	0.508368	0.249467	0.743117	0.470105	1.016129
VAL	16	1.018006	0.820163	1.281796	0.279417	0.29034	0.264852
ARG	17	1.660023	0.937977	2.072621	0.048147	0.132403	0
ALA	18	0.51055	0.547669	0.362075	0.379088	0.387335	0.346101
GLN	19	0.436502	0.481692	0.400351	1.12185	0.733873	1.432231
ILE	20	1.321723	0.993689	1.649758	0.294635	0.473331	0.115939
ALA	21	1.001017	0.958569	1.170807	0.362917	0.40431	0.197346
ILE	22	0.381207	0.565133	0.197281	0.689578	0.665212	0.713943
CYS	23	0.888302	0.931778	0.80135	0.782559	0.685197	0.977284
GLY	24	1.608804	1.608804	0	0.25224	0.25224	0
MET	25	1.419412	1.489301	1.349524	0.239722	0.18572	0.293724
SER	26	1.07028	1.249672	0.711497	0.582382	0.433677	0.879791
THR	27	2.199516	2.265998	2.110873	0.228179	0.155968	0.32446
TRP	28	4.74167	3.651826	4.971111	0	0	0

В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению включают один или более не кодируемых в природных условиях кодируемых аминокислот, расположенных в области белка, которые не нарушают структуру полипептида.

Примерами остатков для встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот могут служить остатки, исключенные из потенциальных участков связывания с рецептором, могут быть полно-

стью или частично доступны для растворителя, имеют минимальные или не имеют водородных связывающих взаимодействий соседними остатками, могут быть минимально доступны для соседних реакционноспособных остатков, могут быть на одной или нескольких открытых поверхностях, могут образовывать сайт или сайты, близкие второму релаксину или другими молекулам или их фрагментам, могут находиться в участках, которые являются очень гибкими, или структурно жесткими, согласно оценке по трехмерной, вторичной, третичной или четвертичной структуре релаксина, могут участвовать или не участвовать в связывании с рецептором релаксина, могут участвовать или не участвовать в связывании с другими биологически активными молекулами, или могут модулировать конформации собственно релаксина или димера или мультимера, содержащих один или более релаксинов, путем изменения гибкости или жесткости всей конструкции, в зависимости от задач.

Каждый обычный специалист в данной области признает, что такой анализ релаксина позволяет определить, какие аминокислотные остатки ближе к поверхности по сравнению с аминокислотными остатками, которые находятся в глубине в третичной структуре белка. Таким образом, этот вариант осуществления настоящего изобретения относится к замене не кодируемой в природных условиях аминокислотой аминокислоты, которая является остатком, доступным на поверхности. В некоторых вариантах осуществления одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встраивают в одно или более из следующих положений в релаксине: в А-цепи перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (т.е. на карбоксильном конце белка) и любых их комбинациях (SEQ ID NO: 1), или в В-цепи перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID NO: 2).

Изучение кристаллической структуры релаксина и его взаимодействия с рецептором релаксина может указать, какие конкретные аминокислотные остатки имеют боковые цепи, которые полностью или частично доступны для растворителя. Боковая цепь не кодируемой в природных условиях аминокислоты в этих положениях может быть направлена от поверхности белка наружу в растворитель.

В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты в одном или нескольких из этих положений связаны с водорастворимым полимером, в том числе, но не ограничиваясь этим, в положениях в А-цепи перед положением 1 (т.е. на N-конце) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (т.е. при карбоксильном конце белка) и любые их комбинации (SEQ ID NO: 1), или в В-цепи перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID NO: 2). Широкий спектр не кодируемых в природных условиях аминокислот может быть введен заменой или встроен в данном положении в полипептиде релаксина. В общем, конкретную не кодируемую в природных условиях аминокислоту выбирают для встраивания на основе изучения трехмерной кристаллической структуры полипептида релаксина или других членов семейства релаксина или аналога релаксина с его рецептором, и предпочтение отдают консервативным заменам (например, не кодируемые в природных условиях аминокислоты на основе арила, такие как р-ацетилфенилаланин или О-пропаргилтирозин используют для замены аминокислот Phe, Tyr или Trp), а также конкретных химических особенностей конъюгирования, которое желательно осуществить с молекулой релаксина (например, введение 4-азидофенилаланина при желании осуществить [3+2] циклоприсоединение Гуисгенс с водорастворимым полимером, несущим группу алкина или амидную связь с водорастворимым полимером, который несет арилэфир, что, в свою очередь, включает фосфинный фрагмент). В одном варианте осуществления способ включает дополнительно встраивание в белок не природных аминокислот, где не природная аминокислота содержит первую реактивную группу; и осуществление контакта белка с молекулой (включая, но не ограничиваясь перечисленными, маркеры, красители, полимеры, водорастворимые полимеры, производные полиэтиленгликоля, фотокросслинкеры, радионуклиды, цитотоксические соединения, лекарства, аффинные маркеры, маркеры фотоаффинные, реактивные соединения, смолы, второй белок или полипептид или аналоги полипептида, антитело или его фрагмент, металлохелатор, кофактор, жирные кислоты, углеводы, полинуклеотид, ДНК, РНК, антисмысловой полинуклеотид, сахар, водорастворимый дендример, циклодекстрин, ингибирующих рибонуклеиновые кислоты, биоматериал, наночастицы, спин-метки, флуорофор, металл-содержащий фрагмент, радиоактивный фрагмент, новые функциональные группы, группу, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другими молекулами, фоторасщепляемые группы, группы, возбуждаемые актиничным излучением, фотоизомеризующиеся группы, биотин, производные биотина, аналог биотина, группа, содержащая тяжелый атом, химически расщепляемые группы, фоторасщепляемые группы, удлинненную боковую цепь, углерод-связанные сахара, редокс-активные вещества, тиоаминокислоты, токсичные группы, меченные изотопами части, биофизический зонд, фосфоресцирующие группы, хемилюминесцентные группы, электронно-плотные группы, магнитные группы, интеркалирующие группы, хромофоры, агент переноса энергии, биологически активное вещество, детектируемую метку, небольшие молекулы, квантовую точку, нанотрансмиттер, радионуклеотид, радиотрансмиттер, нейтрон-захватывающий агент или любые комбинации из вышеперечисленных или любые другие желательные соединения или вещества), что включает вторую реактивную группу. Первая реактивная группа реагирует со второй реактивной группой с присоединением молекулы к не природной аминокислоте по механизму [3+2] циклоприсоединения. В одном варианте осуществления первая реактивная группа пред-

ставляет собой алкинил или азидогруппу, и вторая реактивная группа представляет собой азидогруппу или алкинил. Например, первая реактивная группа - алкинильная группа (включая, но не ограничиваясь этим, неприродную аминокислоту *p*-пропаргиллоксифенилаланин), а вторая реактивная группа - азидогруппа. В другом примере первая реактивная группа - азидогруппа (включая, но не ограничиваясь неприродной аминокислотой *p*-азидо-*L*-фенилаланином), а вторая реактивная группа представляет собой алкинил.

В некоторых случаях не кодируемые в природных условиях аминокислотные замены(а) комбинируют с другими присоединениями, заменами или делециями в полипептиде релаксина и влияют на другие биологические свойства полипептида релаксина. В некоторых случаях другие добавления, замены или делеции могут увеличить стабильность (включая, но не ограничиваясь этим, устойчивость к протеолитическому расщеплению) полипептида релаксина или увеличить сродство полипептида релаксина к его рецептору. В некоторых случаях другие присоединениями, замены или делеции могут увеличить фармацевтическую стабильность полипептида релаксина. В некоторых случаях другие дополнения, замены или делеции могут усилить противовирусную активность полипептида релаксина. В некоторых случаях другие присоединениями, замены или делеции могут привести к увеличению растворимости (включая, но не ограничиваясь этим, при экспрессии в *E.coli* или других клетках-хозяевах) полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления присоединениями, замены или делеции могут увеличить растворимость полипептида релаксина после экспрессии в *E. coli*. или других рекомбинантных клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления сайты для замены на природную или неприродную аминокислоту выбирают в дополнение к другим сайтам для встраивания неприродных аминокислот, что приводит к увеличению растворимости полипептида при последующей экспрессии в *E.coli* или других рекомбинантных клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина содержат еще одно присоединение, замену или делецию, которое модулирует сродство к рецептору полипептида релаксина, связывающим белкам или связываемым лигандом, модулирует передачу сигнала после связывания с рецептором релаксина, модулирует время полужизни в кровотоке, модулирует высвобождение или биодоступность, облегчает очистку, или улучшает или изменяет характеристики способов введения. В некоторых вариантах осуществления полипептиды релаксина включают, кроме того, замену или удаление, которое увеличивает сродство релаксина варианта для его рецептора. Аналогично, полипептиды релаксина могут содержать последовательности химического или ферментного расщепления, последовательности протеазного расщепления, реакционноспособные группы, антителосвязывающие домены (включая, но не ограничиваясь этим, FLAG или поли-His) или другие аффинные последовательности оснований (включая, но не ограничиваясь этим, FLAG, поли-His, GST и т.д.), связанные молекулы (включая, но не ограничиваясь перечисленными: биотин), которые улучшают детектирование (включая, но не ограничиваясь перечисленными, GFP), очистку, транспорт через ткани или клеточные мембраны, высвобождение или активацию пролекарства, уменьшение размеров релаксина или другие свойства полипептида.

В некоторых вариантах осуществления замена не кодируемой в природных условиях аминокислоты обеспечивает получение антагониста релаксина. В некоторых вариантах осуществления не кодируемые в природных условиях аминокислоты вводят путем замены или встраивают в участке, участвующем в связывании с рецептором. В некоторых вариантах осуществления релаксина антагонисты содержат по меньшей мере одну замену, приводящую к появлению активности антагониста релаксина. В некоторых вариантах осуществления антагонист релаксина содержит не кодируемые в природных условиях аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, который присутствует в области рецепторного связывания молекулы релаксина.

В некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот заменены одной или более неприродно-кодируемыми аминокислотами. В некоторых случаях, полипептид релаксина дополнительно включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или несколько замен одной или более природных аминокислот не кодируемой в природных условиях аминокислотой. Например, в некоторых вариантах осуществления один или нескольких релаксине заменены одной или более не кодируемыми в природных условиях аминокислотами. В некоторых случаях один или более не кодируемых в природных условиях остатков связаны с одним или более низкомолекулярными линейными или разветвленным ПЭГ, что обеспечивает повышенное сродство и сравнимое время полужизни в сыворотке по сравнению с молекулами, связанными с одним ПЭГ с более высокой молекулярной массой.

В некоторых вариантах осуществления до двух из следующих остатков релаксина заменены одной или более не встречающимися в природных условиях аминокислотами.

Экспрессия в не эукариотах и эукариотах.

Чтобы получить высокий уровень экспрессии клонированного релаксина полинуклеотида, один типичный субклон полинуклеотидов, кодирующих полипептид релаксина согласно настоящему изобретению, вводят в вектор экспрессии, содержащий сильный промотор прямой транскрипции, транскрипционно/трансляционный терминатор, и если для нуклеиновой кислоты кодирующей белок, сайт связывания рибосомы для трансляционной инициации. Подходящие бактериальные промоторы известны специалистам в данной области и описаны, например, в Sambrook et al. и Ausubel et al.

Бактериальные системы экспрессии для экспрессии полипептидов релаксина согласно настоящему изобретению доступны, в том числе, для *E. coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, и *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach et al., *Nature* 302:543-545 (1983)), но не ограничиваются этими бактериями. Наборы для таких систем экспрессии являются коммерчески доступными. Эукариотические системы экспрессии для клеток млекопитающих, дрожжей и клеток насекомых, известны специалистам в данной области и также являются коммерчески доступными. В случаях, когда ортогональная тРНК и аминоксил-тРНК синтетаза (описано выше) используются для экспрессии полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению, клетки-хозяева для экспрессии выбирают на основе их способности использовать ортогональные компоненты. Примеры клеток-хозяев включают грамположительные бактерии (включая *B. brevis*, *B. subtilis* или *Streptomyces*, но не ограничиваются ими) и грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), а также дрожжи и другие клетки эукариот. Клетки, содержащие О-тРНК/О-РС пары, могут быть использованы согласно настоящему описанию.

Эукариотическая клетка-хозяин или не эукариотическая клетка-хозяин согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность синтезировать белки, которые состоят из неприродных аминокислот, в больших количествах. В одном аспекте композиция необязательно включает по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 75 мкг, по меньшей мере 100 мкг, по меньшей мере 200 мкг, по меньшей мере 250 мкг, по меньшей мере 500 мкг, по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 100 мг, по меньшей мере 1 г или более белка, который содержит неприродные аминокислоты, или количество, которое может быть достигнуто в способами производства белков *in vivo* (подробнее о рекомбинантного белка производстве и осуществлении очистки здесь), но не ограничивается этим количеством. В другом аспекте белок необязательно присутствует в композиции в концентрации по меньшей мере 10 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 50 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 75 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 100 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 200 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 250 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 500 мкг белка на 1 л, по меньшей мере 1 мг белка на 1 л или по меньшей мере 10 мг белка на 1 л или больше, но не ограничивается этим количеством, в клеточном лизате, буфере, фармацевтическом буфере или другой жидкой суспензии (включая перечисленное, в объеме, в том числе, но не ограничиваясь, приблизительно от 1 мл до приблизительно 100 л или более). Производство больших количеств белка (больше, что обычно возможно в других способах, включая трансляцию *in vitro*, но не ограничиваясь ей) в эукариотической клетке, в том числе по меньшей мере с одной неприродной аминокислотой, является особенностью настоящего изобретения.

Эукариотическая клетка-хозяин или не эукариотическая клетка-хозяин согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность биосинтеза белков, которые содержат неприродные аминокислоты в больших полезных количествах. Например, белки, содержащие неприродные аминокислоты, могут быть получены при концентрации, в том числе, но не ограничиваясь, по меньшей мере 10 мкг/л, по меньшей мере 50 мкг/л, по меньшей мере 75 мкг/л, по меньшей мере 100 мкг/л, по меньшей мере 200 мкг/л, по меньшей мере 250 мкг/л или по меньшей мере 500 мкг/л, по меньшей мере 1 мг/л, по меньшей мере 2 мг/л, по меньшей мере 3 мг/л, по меньшей мере 4 мг/л, по меньшей мере 5 мг/л, по меньшей мере 6 мг/л, по меньшей мере 7 мг/л, по меньшей мере 8 мг/л, по меньшей мере 9 мг/л, по меньшей мере 10 мг/л, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мг/л, 1 г/л, 5 г/л, 10 г/л или больше белка в клеточном экстракте, клеточном лизате, культуральной среде, буфере и/или тому подобное.

Множество векторов, подходящих для экспрессии релаксина, являются коммерчески доступными. Пригодные векторы экспрессии для эукариотических хозяев, включают векторы, содержащие последовательности, контролирующие экспрессию из SV40, бычьего вируса папилломы, аденовируса и цитомегаловируса, но не ограничиваются ими. Такие векторы включают pCDNA3.1 (+)/Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния, США) и pCI-neo (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США), бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *E. coli*, в том числе pBR322, pET3a и pET12a, более широкий круг хозяев плазмид, таких как RP4, ДНК фага, например, многочисленные производные фага лямбда, например, NM989, и другие фаги ДНК, такие как M13 и нитевидные фаги с одноцепочечной ДНК, могут быть использованы. Плазмида 2μ и ее производные, POT1 вектор (патент США. № 4931373, который включен в настоящее описание путем ссылки), pJS037 вектор, описанный в (Okkels, *Ann. New York Acad. Sci.* 782, 202 207, 1996) и pPICZ A, B или C (Invitrogen) могут быть использованы в дрожжевых клетках-хозяевах. Векторы для клеток насекомых включают 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 98 (1986), pBluebac 4.5 и pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA), но не ограничиваются ими.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид релаксина, также может включать или может не включать последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Сигнальный пептид присутствует, когда полипептид секретируется из клеток, в которых она экспрессируется. Такой сигнальный пептид может быть с любой последовательностью. Сигнальный пептид может быть прокариотическим или эукариотическим. Coloma, M (1992) *J. Imm. Methods* 152:89 104, описывает сигнальный пептид для использования в клетках млекопитающих (мышинный Ig каппа-легкой цепи сигнального пептида). Другие

сигнальные пептиды включают α -фактор сигнального пептида из *S. cerevisiae* (патент США № 4870008, который включен в настоящее описание посредством ссылки), сигнальный пептид амилазы слюны мыши (O. Hagenbuchle et al., *Nature* 289, 1981, pp. 643-646), модифицированный сигнальный пептид карбокси-пептидазы (L.A. Vails et al., *Cell* 48, 1987, pp. 887-897), сигнальный пептид BAR1 дрожжей (WO 87/02670, которая включена в настоящее описание посредством ссылки), и сигнальный пептид аспарагиновой протеазы 3 (YAP3) дрожжей (см. M. Egel-Mitani et al., *Yeast* 6, 1990, pp. 127-137), но не ограничиваются ими.

Примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих известны специалистам в данной области. Такими клетками-хозяевами могут быть клетки яичника китайского хомячка (CHO), (например, CHO-K1; ATCC CCL-61), клетки зеленой мартышки (COS) (например, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); клетки мыши (например, NS/O), клеточные линии почек новорожденного хомячка (БНК) (например, ATCC CRL-1632 или ATCC CCL-10), и клетки человека (например, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), а также клетки растений в культуре ткани. Эти и другие клеточные линии доступны в государственных хранилищах, таких как Американская коллекция типовых культур, Роквилл, штат Мэриленд. Для того чтобы обеспечить улучшенное гликозилирование полипептида релаксина, клетка-хозяин млекопитающего может быть изменена таким образом, чтобы экспрессировать сиалилтрансферазу, например 1,6-сиалилтрансферазу, например, как описано в патенте США № 5047335, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

Способы введения экзогенной ДНК в клетки-хозяева млекопитающих включают трансфекцию с использованием фосфата кальция, электропорацию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию с использованием липосом, методики с использованием вирусных векторов и трансфекции, описанные Life Technologies Ltd., Пейсли, Великобритания, с использованием Lipofectamin 2000 и Roche Diagnostics Corporation, Индианаполис, США, с использованием FuGENE 6, но не ограничиваются ими. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области и описаны Ausbel et al. (eds.), 1996, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, USA. Культивирование клеток млекопитающих может быть осуществлено в соответствии с хорошо разработанными способами, например, как описано в (*Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols*, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA и Harrison Mass. and Rae IF, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press 1997).

Системы экспрессии, культуры и выделение.

Полипептиды релаксина могут быть экспрессированы в любом количестве подходящих систем экспрессии, включая, например, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и бактерии. Описание примеров систем экспрессии приводится ниже.

Дрожжи.

В настоящем описании термин "дрожжи" включает любые из различных дрожжей, способных экспрессировать ген, кодирующий полипептид релаксина. Такие дрожжи включают аскоспорогенные дрожжи (Endomycetales), базидиальные спорогенные дрожжи и дрожжи, принадлежащие к группе несовершенных грибов (бластомицеты), но не ограничиваются ими. Аскоспорогенные дрожжи делятся на два семейства, *Spermothoraceae* и *Saccharomycetaceae*. Последнее состоит из четырех подсемейств, *Schizosaccharomycoidae* (например, род *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoidae* и *Saccharomycoidae* (например, роды *Pichia*, *Kluyveromyces* и *Saccharomyces*). Базидиальные спорогенные дрожжи включают роды *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, и *Filobasidiella*. Дрожжи, принадлежащие к группе несовершенных грибов (бластомицеты), делятся на два семейства, *Sporobolomycetaceae* (например, роды *Sporobolomyces* и *Bullera*) и *Cryptococcaceae* (например, рода *Candida*).

Особый интерес для использования в настоящем изобретении представляют виды в пределах рода *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, а также *Candida*, в том числе *P. pastoris*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *C. S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa*, и *H. polymorpha*, но не ограничиваются ими. Выбор подходящих дрожжей для экспрессии полипептидов релаксина находится в компетенции специалиста в данной области. При выборе дрожжей-хозяев для экспрессии подходящие хозяева могут включать в себя дрожжи, для которых показаны, например, хороший потенциал секреции, низкая протеолитическая активность, хорошая способность к секреции, хорошее производство растворимого белка и общая устойчивость. Дрожжи обычно доступны из различных источников, включая Генетический центр хранения дрожжей кафедры биофизики и медицинской физики Калифорнийского университета (Беркли, Калифорния) и Американской коллекции типовых культур ("ATCC") (Manassas, VA), но не ограничиваются ими.

Термин "дрожжи-хозяин" или "дрожжевая клетка-хозяин" включает дрожжи, которые могут быть использованы или уже были использованы в качестве реципиента рекомбинантных векторов или других переносчиков ДНК. Термин включает потомство оригинальной клетки-хозяина дрожжей, которая содержит рекомбинантные векторы или другие переносчики ДНК. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентично по морфологии или геномному или полному хромосомному набору ДНК исходной родительской клетки в результате случайной или преднамеренной мутации. Потомок родительской клетки, который достаточно похож на родительскую,

характеризующийся соответствующими свойствами, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид релаксина, включен в термин "потомок".

Векторы для экспрессии и трансформации, в том числе внехромосомные репликоны или интеграционные векторы, были разработаны для трансформации многих дрожжей-хозяев. Например, векторы для экспрессии были разработаны 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* (U.S. Patent Nos. 5,324,639; 4,929,555; and 4,837,148; Cregg et al., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach et al., NATURE (1982) 300:706); и *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance et al., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn et al., GENE (1983) 26:205-221; и Yelton et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); и мицелиальных грибов, таких как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357), каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Регуляторные последовательности для дрожжевых векторов известны специалистам в данной области техники и включают участок промотора генов, таких как гены алкогольдегидрогеназы (АДГ) (EP 0284044); энолазы; глюкокиназы; глюкоза-6-фосфатизомеразы; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP или GAPDH); гексокиназы; фосфофруктокиназы; 3-фосфоглицерат мутазы и пируваткиназы (Pyk) (EP 0329203), но не ограничиваются ими. Дрожжевой ген *PHO5*, кодирующий кислую фосфатазу, также может предоставить пригодную последовательность промотора (Miyanohara et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). Другие подходящие последовательности промоторов для использования в дрожжах-хозяевах могут включать в себя промоторы 3-фосфоглицераткиназы (Hitzeman и др., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073) и других гликолитических ферментов, таких как пируватдекарбоксилазы, тиофосфатизомеразы и фосфогликозоизомеразы (Holland et al., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess et al., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). Индуцируемые дрожжевые промоторы, имеющие дополнительное преимущество в транскрипции, контролируемой условиями роста, могут включать в себя участки промоторов алкогольдегидрогеназы 2; изоцитохрома C; кислой фосфатазы; металлотионеина; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; ферментов деградации, связанных с метаболизмом азота, а также ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы, используемые для экспрессии в дрожжах, более подробно описаны в EP 0073657. Дрожжевые энхансеры также могут быть использованы с дрожжевыми промоторами. Кроме того, синтетические промоторы могут также функционировать в качестве дрожжевых промоторов. Например, активирующие последовательности (UAS) из дрожжевого промотора могут быть соединены с участком активации транскрипции другого дрожжевого промотора с получением синтетического гибридного промотора. Примеры таких гибридных промоторов включают регуляторную последовательность *ADH*, соединенную с участком активации транскрипции *GAP*. См. патенты США №№ 4880734 и 4876197, которые включены в настоящее описание посредством ссылки. Другие примеры гибридных промоторов включают промоторы, которые состоят из регуляторных последовательностей генов *ADH2*, *GAL4*, *GAL 10*, или *PHO5*, в сочетании с транскрипционным регионом активации генов гликолитических ферментов, таких как *GAP* или *PyK*. См. EP 0164556. Кроме того, дрожжевой промотор может включать в себя естественные промоторы недрожжевого происхождения, которые обладают способностью связывать РНК полимеразу дрожжей и инициировать транскрипцию. Другие регуляторные элементы, которые могут включать в себя часть векторов экспрессии в дрожжах, включают терминаторы, например, из гена *GAPDH* или гена энолазы (Holland et al., J. Biol. CHEM. (1981) 256:1385). Кроме того, ориджин репликации из ориджина плазмиды 2μ пригоден для дрожжей. Подходящий ген маркера селекции для использования в дрожжах представляет собой ген *trp1*, присутствующий в дрожжевых плазидах. См. Tschumper et al., GENE (1980) 10:157; Kingsman et al., GENE (1979) 7:141. Ген *trp1* обеспечивает маркер селекции для мутантного штамма дрожжей, не способный расти в присутствии триптофана. Аналогично *leu2*-дефицитный штамм дрожжей (ATCC 20622 или 38626) дополняется известной плазмидой, несущей ген *leu2*. Способы введения экзогенной ДНК в дрожжи хозяева известны специалистам в данной области, и обычно включают трансформацию либо сферопластов, либо интактных дрожжевых клеток-хозяев путем обработки щелочными катионами, но не ограничиваются ими. Например, трансформация дрожжей может быть проведена в соответствии со способом, описанным в Hsiao et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 и Van Solingen et al., J. BACT. (1977) 130:946. Тем не менее, другие способы введения ДНК в клетки, такие как инъекции в ядро, электропорация или слияние протопластов, также может быть использованы, как описано, в целом, в SAMBROOK ET AL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Дрожжевые клетки-хозяева могут культивироваться с использованием стандартных методов, известных специалистам в данной области.

Другие способы экспрессии гетерологичных белков в дрожжевых клетках-хозяевах являются известными специалистам в данной области. См. главным образом патентные публикации США №

20020055169, патенты США №№ 6361969; 6312923; 6183985; 6083723; 6017731; 5674706; 5629203; 5602034 и 5089398; пересмотренные патенты США №№ RE37343 и RE35749; опубликованные патентные заявки PCT WO 99/07862; WO 98/37208 и WO 98/26080; европейские патентные заявки EP 0946736; EP 0732403; EP 0480480; WO 90/10277; EP 0340986; EP 0329203; EP 0324274 и EP 0164556. См. также Gellissen et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos et al., YEAST 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Штаммы дрожжей-хозяев могут выращиваться в ферментерах в стадии амплификации с использованием способов ферментации с подкормкой, известных специалистам в данной области. Способы ферментации могут быть адаптированы с учетом различий в конкретных путях утилизации углерода дрожжами-хозяевами или способа контроля экспрессии. Например, ферментация дрожжей-хозяев *Saccharomyces* может потребовать разовую подпитку глюкозой, комплексный источник азота (например, гидролизат казеина), и нескольких витаминов. В противоположность этому для метилотрофных дрожжей *P. pastoris* может потребоваться глицерин, метанол и трансмикроэлементы и только простые соли аммония (азот) для оптимального роста и экспрессии. См., например, патент США № 5324639; Elliott et al., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; и Fieschko et al., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113, включенные в настоящее описание посредством ссылки.

Такие способы ферментации, однако, могут иметь некоторые общие черты независимо от применяемого штамма дрожжей-хозяев. Например, питательные вещества, лимитирующие рост, обычно углерод, могут быть добавлены в ферментер во время фазы амплификации, чтобы обеспечить максимальный рост. Кроме того, способы ферментации обычно используют среды для ферментации, составленные таким образом, чтобы содержать достаточное количество углерода, азота, базальных солей, фосфора и других второстепенных питательных веществ (витамины, микроэлементы и соли и т.д.). Примеры сред для ферментации, пригодных для использования *Pichia*, описаны в патентах США №№ 5324639 и 5231178, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

Бакуловирус-инфицированные клетки насекомых.

Термин "насекомое хозяин" или "клетка-хозяин насекомого" относится к насекомым, которые могут быть использованы или уже были использованы в качестве реципиента для рекомбинантных векторов или других переносчиков ДНК. Этот термин включает потомство исходной клетки-хозяина насекомого, которая была трансфицирована. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентично по морфологии или по геномному или полному хромосомному набору ДНК в сравнении с исходной родительской клеткой из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомок родительской клетки, который достаточно похож на родителей, характеризующийся соответствующими свойствами, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид релаксина, включен в определение "потомок". Бакуловирусная экспрессия полипептидов релаксина пригодна в рамках настоящего изобретения с использованием технологии рекомбинантных ДНК, полипептидов или их предшественников, потому что релаксин может быть биосинтезирован в любом количестве клеток-хозяев, включая бактерии, клетки млекопитающих, клетки насекомых, дрожжей или грибов. Вариант воплощения настоящего изобретения включает биосинтез релаксина, модифицированного релаксина, полипептидов релаксина или аналогов релаксина в бактериях, дрожжах или клетках млекопитающих. Другой вариант воплощения настоящего изобретения включает биосинтез, проведенный в *E. coli* или дрожжах. Примеры биосинтеза в клетках млекопитающих и трансгенных животных описаны в Nakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69,(1997)].

Выбор подходящих клеток насекомых для экспрессии полипептидов релаксина известен специалистам в данной области. Несколько видов насекомых хорошо описаны в данной области и являются коммерчески доступными, в том числе *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, и *Trichoplusia*. При выборе насекомых хозяев для экспрессии, подходящие хозяева могут включать хозяев, для которых показаны, в частности, хорошая способность секреции, низкая протеолитическая активность и общая устойчивость. Насекомые, обычно доступны из различных источников, включающих Генетический центр хранения насекомых кафедры биофизики и медицинской физики в Калифорнийском университете (Беркли, Калифорния) и Американскую коллекцию типовых культур ("ATCC") (Manassas, VA), но не ограничиваются ими.

Как правило, компоненты систем экспрессии насекомых, инфицированных бакуловирусами, включают вектор переноса, обычно бактериальную плазмиду, которая содержит фрагмент генома бакуловируса и удобный сайт рестрикции для вставки гетерологичных генов, которые предполагается экспрессировать; бакуловирус дикого типа с последовательностями, гомологичными конкретному фрагменту бакуловируса в векторе переноса (это позволяет проводить гомологичную рекомбинацию гетерологичного гена в геном бакуловируса), а также соответствующие клетки насекомых хозяина и среду для роста. Материалы, способы и приемы, используемые при конструировании векторов, трансфекции клеток, отбора бляшек, растущих клеток в культуре, и тому подобного известны в данной области техники и имеются руководства с описаниями этих методов.

После вставки гетерологичных генов в вектор переноса, вектор и вирусный геном дикого типа трансфицируют в клетку-хозяин насекомого, в которой вектор и вирусный геном рекомбинируют. Упа-

кованный рекомбинантный вирус экспрессируется и рекомбинантные бляшки выявляют и очищают. Материалы и методы для системы экспрессии бакуловирус/клетка насекомого являются коммерчески доступными в виде набора, например, из Invitrogen Corp (Карлсбад, Калифорния). Эти способы широко известны специалистам в данной области и полностью описаны в SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLET NO. 1555 (1987), включенном в настоящее описание посредством ссылки. См. также RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); и O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

В самом деле, получение различных гетерологичных белков с использованием системы экспрессии бакуловирус/клетка насекомого, известно специалистам в данной области. См., например, патенты США №№ 6368825, 6342216, 6338846, 6261805, 6245528, 6225060, 6183987, 6168932, 6126944, 6096304, 6013433, 5965393, 5939285, 5891676, 5871986, 5861279, 5858368, 5843733, 5762939, 5753220, 5605827; 5583023, 5571709, 5516657, 5290686, WO 02/06305, WO 01/90390, WO 01/27301, WO 01/05956, WO 00/55345, WO 00/20032, WO 99/51721, WO 99/45130, WO 99/31257, WO 99/10515, WO 99/09193, WO 97/26332, WO 96/29400, WO 96/25496, WO 96/06161, WO 95/20672, WO 93/03173, WO 92/16619, WO 92/02628, WO 92/01801, WO 90/14428, WO 90/10078, WO 90/02566, WO 90/02186, WO 90/01556, WO 89/01038, WO 89/01037, WO 88/07082, включенные в настоящее описание посредством ссылки.

Векторы, которые являются пригодными в системе экспрессии бакуловирус/клетка насекомого, известны в данной области и включают, например, векторы экспрессии и переноса в клетки насекомых, полученные из бакуловируса *Autographa californica* вируса ядерного полиэдроза (AcNPV), который является вспомогательным независимым вектором экспрессии. Вирусные векторы экспрессии, полученные из этой системы, обычно используют сильный вирусный промотор гена полиэдрина для регуляции экспрессии гетерологичных генов. См., главным образом, O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992). До вставки чужеродного гена в геном бакуловируса описанные выше компоненты, содержащие промотор, лидер (по желанию), целевую кодирующую последовательность и последовательность терминирования транскрипции, обычно собирают в промежуточной трансплацентной конструкции (вектор переноса). Промежуточные конструкции переноса часто поддерживаются в репликоне, таком как дополнительные хромосомные элементы (например, плазмиды), способном стабильно поддерживаться в хозяине, таком как бактерии. Поскольку репликон содержит системы репликации, это позволяет ему сохраняться в подходящем хозяине для клонирования и амплификации. Более конкретно, плаزمид может содержать сигнал полиэдрина полиаденилирования (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) и прокариотический гена устойчивости к ампициллину (amp), а также ориджин репликации для оселекции и размножения в *E. coli*. Одним из часто используемых векторов передачи для введения чужеродных генов в AcNPV является pAc373. Множество других векторов, известных специалистам в данной области, также были разработаны, включая, например, pVL985, который меняет старт кодон полиэдрина из ATG в ATT и который вводит сайт клонирования BamHI через 32 пары оснований от ATT в направлении транскрипции. См. Luckow and Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Другие коммерчески доступные векторы включают, например, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). После введения гетерологичных генов, вектором переноса и геномом бакуловируса дикого типа совместно трансфицируют в клетку-хозяин насекомого. Способы введения гетерологичных ДНК в нужном месте в бакуловирус известны в данной области. См. 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. Например, вставка может быть произведена в гене, таком как ген полиэдрина, посредством гомологичной рекомбинации с двойным кроссинговером; вставка также может быть произведена в сайт рестриктазы, сконструированный в нужном гене бакуловируса. См. Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11 (4):91. Трансфекция может быть осуществлена посредством электропорации. См. TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Кроме того, липосомы могут быть использованы для трансфекции клетки насекомых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии и бакуловируса. См., например, Liebman et al., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves et al., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura et al., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22):13570; Schmidt et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert et al., NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS ET AL., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin et al., NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost et al., GENE (1997) 190:139; Jakobsson et al., J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles et al., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey et al., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley et al., J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk et al., J. VIROL. (1994) 68(2):766; и Peng et al., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Коммерчески доступные липосомы включают, например, Cellfectin® и Lipofectin® (Invitrogen, корпорации, Carlsbad, CA). Кроме того, может быть использована трансфекция с использованием фосфата кальция. См. TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MO-

LECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; и Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.

Бакуловирусные векторы экспрессии обычно содержат промотор бакуловируса. Бакуловирусный промотор - это любая последовательность ДНК, способная связывать РНК-полимеразы бакуловируса и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности, расположенной по направлению транскрипции (3'), (например, структурного гена) в мРНК. Промотор должен содержать регион инициации транскрипции, который обычно помещают проксимально к 5'-концу кодирующей последовательности. Этот регион инициации транскрипции обычно включает сайт связывания РНК-полимеразы и сайт инициации транскрипции. Бакуловирусный промотор может также содержать второй домен, называемый энхансером, который, если он присутствует, обычно дистальнее структурного гена. Кроме того, экспрессия может быть регулируемой или конститутивной.

Структурные гены, которые сильно транскрибируются на поздних сроках в инфекционном цикле, обеспечивают особенно полезные последовательности промотора. Примеры включают последовательности, полученные из гена, кодирующего белок вирусного многогранника (FRIESEN ET AL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0127839 и 0155476) и ген, кодирующий белок p10 (Vlak et al., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765). Вновь полученный бакуловирусный вектор экспрессии упакован в инфекционный рекомбинантный бакуловирус и впоследствии выросшие бляшки могут быть очищены с помощью методов, известных специалистам в данной области. См. Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987).

Рекомбинантные бакуловирусные векторы экспрессии были разработаны для инфекций нескольких клеток насекомых. Например, рекомбинантные бакуловирусы были разработаны, в частности, для *Aedes aegypti* (ATCC No. CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC No. CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC No. 1963), *Spodoptera frugiperda*, и *Trichoplusia ni*. См. Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell et al., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. См., в общем, Fraser et al., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. В частности, клеточные линии, используемые для систем экспрессии с использованием бакуловирусных векторов, обычно включают Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC No. CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*), и High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*), но не ограничиваются ими.

Клетки и питательные среды являются коммерчески доступными как для прямой экспрессии гетерологичных полипептидов, так для связанной экспрессии в бакуловирусе, а технология клеточных культур широко известна специалистам в данной области.

E. coli, виды *Pseudomonas* и другие прокариоты.

Бактериальные способы экспрессии известны специалистам в данной области. Большое разнообразие векторов доступно для использования в бактериальных хозяевах. Векторы могут быть однокопийными или мульткопийными векторами с низкой или высокой степенью копийности. Векторы могут служить для клонирования и/или экспрессии. В связи с тем, что имеется достаточно литературы о векторах, коммерческой доступностью многих векторов и даже руководств описывающих векторы, и их карты ограничений и характеристик, широкого обсуждения здесь не требуется. Как известно, векторы обычно содержат маркеры, позволяющие проводить селекцию и которые могут обеспечивать устойчивость к цитотоксическому агенту, прототрофию или иммунитет. Часто, используют множество маркеров, которые обеспечивают различные характеристики. Бактериальный промотор представляет собой любую последовательность ДНК, способную связывать бактериальную РНК-полимеразу и начинать транскрипцию кодирующей последовательности (например, структурный ген), расположенной в направлении транскрипции (3'), в мРНК. Промотор должен иметь участок инициации транскрипции, который обычно помещают проксимально к 5'-концу кодирующей последовательности. Этот участок инициации транскрипции обычно включает сайтом связывания РНК-полимеразы и сайт инициации транскрипции. Бактериальный промотор может также содержать второй домен, который называется оператором, который может перекрываться с соседним сайтом связывания РНК-полимеразы, на котором начинается синтез РНК. Оператор обеспечивает отрицательно регулируемую (индуцибельную) транскрипцию, так как белок рецептора гена может связываться с оператором и тем самым подавлять транскрипцию конкретных генов. Конститутивная экспрессия может происходить в отсутствие негативных регуляторных элементов, таких как оператор. Кроме того, положительная регуляция может быть достигнута за счет последовательности связывания белка активатора гена, которая, если она присутствует, обычно проксимальна (5') по отношению к последовательности связывания РНК-полимеразы. Примером белка активатора гена может быть катаболитный белок активатора (CAP), который помогает инициировать транскрипцию оперона *lac* в кишечной палочке (*E. coli*) [Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Регулируемая экспрессия может быть положительной или отрицательной, тем самым усиливая или снижая транскрипцию. Последовательности, кодирующие ферменты метаболического пути, обеспечивают особенно полезные промоторные последовательности. Примеры включают последовательности промоторов, полученных из генов ферментов метаболизма сахаров, таких как галактоза, лактоза (*lac*) [Chang et al., NATURE (1977) 198:1056] и мальтоза. Дополнительные примеры включают промоторы последовательностей, получен-

ные из генов ферментов биосинтеза, таких как триптофан (*trp*) [Goeddel et al., NUC. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton et al., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; патент США № 4738921; EP Pub. №№ 036776 и 121775, которые включены в настоящее описание посредством ссылки]. Система промотора β -галактозидазы (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], система промотора бактериофага лямбда PL [Shimatake et al., NATURE (1981) 292:128] и T5 [патент США № 4689406, которые включены в настоящее описание посредством ссылки] также предоставляют пригодные последовательности промоторов. Предпочтительные способы настоящего изобретения используют сильные промоторы, такие как промотор T7, чтобы индуцировать синтез полипептида релаксина до высоких уровней. Примеры таких векторов известны специалистам в данной области техники и включают pET29 серии из Novagen, и pPOP векторы, описанные в WO99/05297, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Такие системы экспрессии позволяют получать высокие уровни полипептидов релаксина в хозяине без ущерба для жизнеспособности клеток-хозяев или параметров роста. pET19 (Novagen) является еще одним вектором, известным в данной области техники.

Кроме того, синтетические промоторы, которые не встречаются в природных условиях, также функционируют в качестве бактериальных промоторов. Например, последовательность активатора транскрипции одного бактериального или бактериофагового промотора может быть соединена с последовательностью оперона другого бактериального или бактериофагового промотора с созданием синтетического гибридного промотора [США патент № 4551433, который включен в настоящее описание посредством ссылки]. Например, промотор *tac* представляет собой гибрид *trp-lac* промотора, включающий как промотор *trp*, так и последовательность *lac* оперона, который регулируется репрессором *lac* [Amann et al., GENE (1983) 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Кроме того, бактериальный промотор может включать естественные промоторы небактериального происхождения, которые обладают способностью связываться с бактериальной РНК-полимеразой и инициировать транскрипцию. Естественный промотор небактериального происхождения также может связываться с совместимой РНК-полимеразой для получения высокого уровня экспрессии некоторых генов у прокариот. Система РНК-полимераза/промотор бактериофага T7 представляет собой пример системы со связанным промотором [Studier et al., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. Кроме того, гибридный промотор также может состоять из промотора бактериофага и участка оператора *Escherichia coli* (EP Pub. № 267851).

В дополнение к функционирующей промоторной последовательности эффективный сайт связывания рибосомы также полезен для экспрессии чужеродных генов у прокариот. В *E. coli* сайт связывания рибосомы называется Shine-Dalgarno (SD) и включает последовательность иницирующего кодона (ATG) и последовательность длиной 3-9 нуклеотидов, расположенную на расстоянии 3-11 нуклеотидов перед иницирующим кодоном [Shine et al., NATURE (1975) 254:34]. Считается, что последовательность SD содействует связыванию мРНК с рибосомой за счет спаривания оснований между последовательностью SD и 3'-конца 16S рРНК *E. coli* [Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R.F. Goldberger, 1979)], чтобы экспрессировать эукариотические гены и прокариотические гены со слабым сайтом связывания рибосом [Sambrook et al. "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

Термин "бактериальный хозяин" или "бактериальная клетка-хозяин" относится к бактериальным клеткам, которые могут быть использованы или уже были использованы в качестве реципиента рекомбинантных векторов или других переносчиков ДНК. Этот термин включает потомство исходной бактериальной клетки-хозяина, которая была трансфицирована. Следует понимать, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентично по морфологии или по геномному или полному хромосомному набору ДНК в сравнении с оригинальной родительской клеткой из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомок родительской клетки, который достаточно похож на родительскую клетку, характеризующуюся соответствующими особенностями, такими как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид релаксина, включены в термин "потомок".

Выбор подходящих бактерий хозяина для экспрессии полипептидов релаксина известен специалистам в данной области техники. При выборе бактериальных хозяев для экспрессии, подходящие хозяева могут включать хозяев, для которых показаны, в частности, хорошая способность к формированию телец включения, низкая протеолитическая активность и общую устойчивость. Бактериальные хозяева обычно доступны из различных источников, включая генетический центр хранения бактерий кафедры биофизики и медицинской физики Калифорнийского университета (Беркли, Калифорния) и Американской коллекции типовых культур ("ATCC") (Manassas, VA), но не ограничиваются ими. Для промышленной/фармацевтической ферментации обычно использует бактериальные штаммы, полученные из штаммов K (например, W3110), или бактерий, полученных из штамма B (например, BL21). Эти штаммы наиболее пригодны, потому что их параметры роста очень хорошо известны и надежны. Кроме того, эти штаммы не являются патогенными, что является коммерчески важным для безопасности и по экологическим причинам. Другие примеры подходящих хозяев *E. coli* включают штаммы BL21, DH10B или их производные, но не ограничиваются ими. В другом воплощении способов согласно настоящему изобре-

тению хозяин *E. coli* является штаммом, не содержащим протеазы включая OMP⁺ и LON⁺, но не ограничиваются ими. Штамм клетки-хозяина может быть одним из видов *Pseudomonas*, в том числе *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*, но не ограничивается ими. *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, обозначенный как штамм MB 101, как известно, пригоден для рекомбинантного производства и доступен для процесса производства белка для терапевтических целей. Примеры системы экспрессии *Pseudomonas* включают систему, доступную от компании Dow Chemical в качестве штамма-хозяина (Midland, MI доступны на World Wide Web в dow.com). После того как рекомбинантный штамм клетки-хозяина получен (то есть экспрессионная конструкция введена в клетку-хозяина и клетки-хозяева с соответствующей конструкцией экспрессии выделены), рекомбинантный штамм клетки-хозяина культивируют в условиях, подходящих для производства полипептидов релаксина. Как очевидно для специалиста в данной области, способ культуры рекомбинантного штамма клетки-хозяина будет зависеть от характера использованной экспрессионной конструкции и клетки-хозяина. Рекомбинантные штаммы-хозяева обычно культивируют с использованием способов, которые известны специалистам в данной области. Рекомбинантные клетки-хозяева обычно культивируют в жидкой среде, содержащей усвояемые источники углерода, азота и неорганических солей и, необязательно, содержащие витамины, аминокислоты, факторы роста и другие белковые культуральные добавки, известные специалистам в данной области. Жидкие среды для культивирования клеток-хозяев могут необязательно содержать антибиотики или антифунгицидные препараты, чтобы предотвратить рост нежелательных микроорганизмов и/или соединения, включая антибиотики, но не ограничиваясь ими, чтобы отбирать клетки-хозяева, содержащие вектор экспрессии.

Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать в периодическом или непрерывном формате, либо с отбором клеток (в случае, когда полипептид релаксина накапливается внутриклеточно), или с отбором супернатанта культуры в периодическом или непрерывном формате. Для производства с использованием прокариотических клеток-хозяев периодическое культивирование и отбор клеток являются предпочтительными.

Полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению обычно очищают после экспрессии в рекомбинантных системах. Полипептид релаксина может быть очищен от клеток-хозяев или культуральной среды с помощью различных способов, известных в данной области. Полипептиды релаксина, производимые в бактериальных клетках-хозяевах, могут быть плохо растворимыми или нерастворимыми (в виде телец включения). В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотные замены могут быть легко сделаны в полипептиде релаксина, которые выбираются с целью увеличения растворимости рекомбинантных белков с использованием способов, описанных здесь, а также известных из предшествующего уровня техники. В случае нерастворимого белка белок может быть выделен из лизатов клетки-хозяина путем центрифугирования и последующей гомогенизации клеток. В случае плохо растворимого белка могут быть присоединены соединения, включая полиэтиленмин (PEI), но не ограничиваясь им, чтобы получить осадок частично растворимого белка. Затем осажденный белок может быть выделен центрифугированием. Рекомбинантные клетки-хозяева могут быть разрушены или гомогенизированы для того, чтобы высвободить тельца включения из клеток с использованием различных способов, известных специалистам в данной области. Разрушение клеток-хозяев или гомогенизация может быть выполнена с использованием хорошо известных способов, включая ферментативное разрушение клеток, обработку ультразвуком, обработку гомогенизатором Даунса, или разрушение за счет сброса высокого давления, но не ограничиваясь ими. В одном из вариантов осуществления способа согласно настоящему изобретению техника сброса высокого давления используется для разрушения клеток-хозяев *E. coli*, чтобы высвободить тельца включения полипептидов релаксина. При обработке телец включения полипептида релаксина может быть полезно минимизировать время гомогенизации в повторях для того, чтобы максимизировать выход телец включения без потерь в связи с такими факторами, как растворимость, механические потери или протеолиз. Нерастворимый или осажденный полипептид релаксина затем может быть растворен с использованием любого из ряда подходящих агентов растворения, известных в данной области. Полипептид релаксина может быть растворен с использованием мочевины или гидрохлорида гуанидина. Объем растворяемого полипептида релаксина должен быть сведен к минимуму для того, чтобы большое количество ферментаций могло быть получено с использованием ферментера стандартного размера. Этот фактор может иметь значение в крупномасштабных коммерческих условиях, когда рекомбинантная клетка-хозяин может быть выращена в партиях, которые представляют собой тысячи литров в объеме. Кроме того, при производстве полипептида релаксина в крупномасштабных коммерческих условиях, в частности, для фармацевтических целей для человека, по возможности следует избегать агрессивных химических веществ, которые могут повредить машинам и контейнерам, или самому белковому продукту. Было показано в способе согласно настоящему изобретению, что более мягкий денатурирующий агент мочевины может быть использован для растворения телец включения полипептида релаксина вместо более жесткого денатурирующего агента гидрохлорида гуанидина. Использование мочевины значительно снижает риск повреждения оборудования из нержавеющей стали, которое используется в процессе производства и очистки полипептида релаксина, позволяя при этом эффективно растворять тельца включения полипептида релаксина.

В случае растворимого белка релаксина релаксин может выделяться в периплазматическое пространство или в культуральную среду. Кроме того, растворимый релаксин может присутствовать в цитоплазме клеток-хозяев. Желательно предварительно концентрировать растворимый релаксин до выполнения стадий очистки. Стандартные способы, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для получения концентрата растворимого релаксина, например, от клеточных лизатов или культуральной среды. Кроме того, стандартные способы, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для разрушения клеток-хозяев и высвобождения растворимого релаксина из цитоплазмы или периплазматического пространства клеток-хозяев.

Когда полипептид релаксина производится в виде гибридного белка, присоединенная последовательность может быть удалена. Удаление присоединенной последовательности может быть достигнуто путем ферментативного или химического расщепления. Ферментативное удаление присоединенных последовательностей может быть осуществлено с использованием способов, известных специалистам в данной области. Выбор фермента для удаления присоединенной последовательности будет определяться типом конъюгата, и условия реакции будут определяться выбором фермента, как будет очевидно специалисту в данной области техники. Химическое расщепление может быть осуществлено с использованием реагентов, известных специалистам в данной области, включая цианогенбромид, TEV протеазу и другие реагенты, но не ограничиваясь ими. Расщепленный полипептид релаксина может быть очищен от отщепляемой последовательности способами, известными специалистам в данной области. Такие способы будут определяться особенностью и свойствами присоединенной последовательности и полипептида релаксина, как очевидно специалисту в данной области. Способы очистки могут включать гель-хроматографию, гидрофобную хроматографию, ионообменную хроматографию или диализ или любую их комбинацию, но не ограничиваются ими.

Полипептид релаксина также может быть очищен с целью удаления ДНК из раствора белка. ДНК может быть удалена любым подходящим способом, известным в данной области, таким как осаждение или ионообменная хроматография, но может быть удалена путем осаждения с помощью агента осаждения нуклеиновой кислоты, такого как сульфат протамина, но не ограничивается им. Полипептид релаксина может быть отделен от осажденной ДНК с использованием стандартных хорошо известных способов, включая центрифугирование или фильтрацию, но не ограничиваясь ими. Удаление молекул-хозяев нуклеиновой кислоты является важным фактором в условиях, когда полипептид релаксина будет использоваться для лечения людей, и способы согласно настоящему изобретению снижают содержание ДНК клетки-хозяина до фармацевтически приемлемых уровней.

Способы для малых или больших масштабов ферментации могут быть также использованы для экспрессии белка, в том числе с использованием ферментеров, встряхивающихся колб, биореакторов с кипящим слоем, биореакторов с полыми волокнами, роликовыми бутылочными системами культивирования и систем биореактора с мешалкой, но не ограничиваются ими. Каждый из этих способов может быть выполнен в виде процесса в периодическом режиме, с подпиткой или в непрерывном режиме. Полипептиды релаксина человека согласно настоящему изобретению в общем могут быть получены с использованием стандартных способов в данной области техники. Например, культуральная среда или клеточный лизат может быть отцентрифугирован или отфильтрован для удаления остатков клеток. Супернатант может быть сконцентрирован или разбавлен до нужного объема или диафильтрован в подходящем буфере для подготовки к дальнейшей очистке. Дальнейшая очистка полипептида релаксина согласно настоящему изобретению включает отделение дезамидированных и отщепленных форм варианта полипептида релаксина из интактной формы.

Любая из следующих процедур, приведенных в качестве примера, может быть использована для очистки полипептида релаксина согласно настоящему изобретению: аффинная хроматография; анион или катионообменная хроматография (с использованием, в том числе DEAE Sepharose, но не ограничиваясь ею); хроматография на двуокиси кремния; высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ); обращенно-фазовая ВЭЖХ, гель-фильтрация (с использованием, в том числе, Сефадекса G-75, но не ограничиваясь им); гидрофобная хроматография; гель-хроматография; металл-хелатная хроматография; ультрафильтрация/диафильтрация; осаждение этанолом; преципитация сульфатом аммония; хроматофокусирование, вытеснительная хроматография; электрофоретические процедуры (включая препаративное изoeлектрическое фокусирование, но не ограничиваясь им), дифференциальная растворимость (включая осаждение сульфатом аммония, но не ограничиваясь им), SDS-PAGE или экстракция. Белки согласно настоящему изобретению, включая белки, содержащие неприродные аминокислоты, пептиды, содержащие неприродные аминокислоты, антитела к белкам, содержащим неприродные аминокислоты, связывающие партнеры для белков, содержащих неприродные аминокислоты и т.д., но не ограничиваясь ими, могут быть очищены либо частично, либо существенно до состояния однородности в соответствии со стандартными способами, известными и используемыми специалистами в данной области. Соответственно, полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть выделены и очищены любым из ряда способов, известных специалистам в данной области, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, кислотной или основной экстракцией, колоночной хроматографией, аффинной колоночной хроматографией, анион- или катион-обменной хроматографией, фосфоцеллюлозной хроматографией, хроматогра-

фией гидрофобного взаимодействия, хроматографией на гидроксипатите, хроматографией на лектинах, гель-электрофорезом и тому подобным, но не ограничиваются ими. Можно использовать технику восстановления структуры бела (рефолдинг), если необходимо для того, чтобы получить зрелые белки с восстановленной структурой. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), аффинная хроматография или другие подходящие способы могут быть использованы на окончательных стадиях очистки, где высокая чистота является необходимой. В одном из вариантов осуществления антитела против неприродных аминокислот (или белков либо пептидов, содержащих неприродные аминокислоты) используются в качестве реагентов очистки, в том числе для аффинной очистки на основе белков или пептидов, содержащих одну или более неприродных аминокислот, но не ограничиваются ей. После очистки частично или до однородности, если необходимо, полипептиды необязательно можно использовать для самых разнообразных приложений, в том числе для анализа компонентов, терапии, профилактики, диагностики, исследования реагентов и/или в качестве иммуногенов для получения антител, но не ограничиваются ими. Антитела, генерируемые против полипептидов согласно настоящему изобретению, могут быть получены путем введения фрагментов, несущих полипептиды или эпитопы, или клеток животному, предпочтительно отличному от человека животному, с использованием обычных протоколов. Специалист в данной области может получить антитела, используя различные известные способы. Кроме того, трансгенные мыши или другие организмы, в том числе другие млекопитающие, могут быть использованы для экспрессии гуманизированных антител. Описанные выше антитела могут быть использованы для выделения или обнаружения клонов, экспрессирующих полипептид или для очистки полипептидов. Антитела против полипептидов согласно настоящему изобретению также могут быть использованы для лечения заболеваний.

Полипептиды и полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть также использованы в качестве вакцин. Соответственно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у млекопитающего, который включает прививку млекопитающим полипептида согласно настоящему изобретению, адекватного для получения антител и/или Т-клеточного иммунного ответа, в том числе, например, производства цитокинов Т-клеток или цитотоксических Т-клеток, чтобы защитить указанное животное от болезни, независимо от того, поразила ли болезнь организм или еще нет. Иммунный ответ у млекопитающих также может быть вызван способом, который включает доставку полипептида согласно настоящему изобретению с помощью экспрессии полинуклеотида и с использованием вектора и кодирования полипептида *in vivo* с целью получения такого иммунного ответа для производства антител для защиты указанного животного от болезней согласно настоящему изобретению. Один из путей введения вектора путем впрыскивания его на большой скорости в нужные клетки в виде покрытия на частицах или другим способом. Такой вектор нуклеиновой кислоты может содержать ДНК, РНК, модифицированную нуклеиновую кислоту, или ДНК/РНК гибрид. Для использования в качестве вакцины полипептид или вектор нуклеиновой кислоты будет обычно предоставляться в качестве состава для вакцинирования (композиция). Композиция может дополнительно содержать подходящий носитель. Так как полипептид может быть разрушен в желудке, его можно вводить парентерально (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутрикожными инъекциями). Препараты, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические и растворенные вещества, которые делают композицию изотонической с кровью реципиента; а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты или загустители. Вакцинный препарат также может включать адъювантные системы для повышения иммуногенности препарата, которые известны специалистам в данной области. Дозировка зависит от удельной активности вакцины и может быть легко определена с помощью обычных экспериментов.

Экспрессия в альтернативных системах.

Несколько стратегий было использовано для встраивания неприродных аминокислот в белки в не-рекомбинантных клетках-хозяевах, мутагенизированных клетках-хозяевах или в бесклеточных системах. Эти системы также подходят для применения в создании полипептидов релаксина по настоящему изобретению. Дериватизация аминокислот с реакционноспособными боковыми цепями, такими как Lys, Cys и Tug, обеспечила превращение лизина в N²-ацетиллизин. Химический синтез также обеспечивает простой способ встраивания неприродных аминокислот. С недавним развитием ферментативного лигирования и нативного химического легирования пептидных фрагментов появилась возможность получать белки большего размера. См., например, P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* 69:923 (2000). Химическое легирование пептидов и нативное химическое легирование описаны в патенте США № 6184344, патенте США № 2004/0138412, патенте США № 2003/0208046, WO 02/098902 и WO 03/042235, которые включены путем ссылки в настоящий документ. Общий биосинтетический способ в пробирке, при котором супрессорную tРНК, химически ацилированную желаемой неприродной аминокислотой, добавляют *in vitro* к экстракту, способному поддерживать биосинтез белка, использовали для сайт-специфического встраивания более 100 неприродных аминокислот в различные белки практически любого размера. См., например, V.W. Cornish, D. Mendel and P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); 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); and, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dila, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013-8014 (1989). Широкий спектр функциональных групп был введен в белки для исследования стабильности белка, укладки белков, ферментного механизма и передачи сигнала.

В дополнение к другим ссылкам, приведенным здесь, разнообразные способы очистки/сворачивания белков известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленными, изложенными в R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Hams 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; and Walker (1998), *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ; и приведенных в них ссылок. Одним из преимуществ получения целевого белка или полипептида с неприродной аминокислотой в эукариотической клетке-хозяине или неэукариотической клетке-хозяине является то, что обычно это позволяет обеспечить укладку белков или полипептидов в их нативных конформациях. Однако, как будет понятно специалистам в данной области техники, в некоторых вариантах осуществления изобретения, что после синтеза, экспрессии и/или очистки, белки или пептиды могут иметь конформацию, которая отличается от желаемой конформации соответствующих полипептидов. В одном аспекте изобретения экспрессированный белок или полипептид необязательно денатурируют, а затем ренатурируют. Это достигается использованием способов, известных в данной области, включая, добавление шаперона к целевому белку или полипептиду, растворение белков в хаотропном агенте, таком как гуанидина гидрохлорид, использование белка дисульфид изомеразы и т.д., но не ограничиваясь перечисленными способами. В целом, иногда желательно вызвать денатурацию, восстановить экспрессированные полипептиды, а затем подвергнуть полипептиды повторной укладке (рефолдингу) в предпочтительной конформации. Например, гуанидин, мочевины, DTT, DTE, и/или шаперонин могут быть добавлены к целевому продукту трансляции. Способы восстановления, денатурации и ренатурации белков известны специалистам в данной области (см. ссылки выше, и Debinski, et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; and Buchner, et al., (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270). Debinski и соавт., например, описывают денатурацию и восстановление белков телес включение в гуанидине-DTE. Рефолдинг белков может быть проведен в окислительно-восстановительном буфере, включая, но не ограничиваясь перечисленными, такие как окисленный глутатион и L-аргинин. Реагенты для рефолдинга можно пропускать через или иным способом приводить в контакт с одним или более полипептидами или другими продуктами экспрессии, или наоборот. В случае прокариотической продукции полипептида релаксина полипептид релаксина, полученный таким образом может быть неправильно свернут и, следовательно, не иметь биологической активности или иметь пониженную биологическую активность. Биологическая активность белка может быть восстановлена путем "рефолдинга". В целом, рефолдинг неправильно свернутого полипептида релаксина осуществляют путем солубилизации (причем полипептид релаксина также нерастворим), разворачивания и восстановления полипептидной цепи, с использованием, например, одного или более хаотропных агентов (например, мочевины и / или гуанидина) и восстановитель, способный восстанавливать дисульфидные связи (например, дитиотреитол, DTT или 2-меркаптоэтанол, 2-ME). При умеренной концентрации хаотропаного агента дополнительно добавляют окислитель (например, кислород, цистин или цистамин), который позволяет повторно сформировать дисульфидные связи. Рефолдинг полипептида релаксина можно осуществить с использованием стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в патентах США №№ 4511502, 4511503 и 4512922, которые включены сюда посредством ссылки. Полипептид релаксина также может быть подвергнут совместной укладке с другими белками с образованием гетеродимеров или гетеромультимеров.

После повторной укладки релаксин может быть дополнительно очищен. Очистка релаксина может быть осуществлена с использованием различных способов, известных специалистам в данной области, в том числе гидрофобной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, ионообменной хроматографии, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, аффинной хроматографии и т.п. или любой их комбинации.

Дополнительная очистка может также включать стадию сушки или осаждения очищенного белка.

После очистки релаксин может быть подвергнут обмену в различных буферах и/или концентрированию любым из множества способов, известных специалисту в данной области, в том числе, но не ограничиваясь, диализацией и диализом. Релаксин, который получают в виде единственного очищенного белка, может агрегировать или осаждаться.

Чистота очищенного релаксина может составлять по меньшей мере 90% (измеряется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, ОФ-ВЭЖХ или додецилсульфата

натрия-полиакриламидном гель-электрофореза, SDS-PAGE, ДСН-ПААГ) или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% или более. Независимо от точного числового значения чистоты релаксина релаксин является достаточно чистым для применения в качестве фармацевтического продукта или для дальнейшей обработки, например связывания с водорастворимым полимером, таким как ПЭГ.

Некоторые молекулы релаксина можно применять в качестве терапевтических средств без других активных ингредиентов или белков (отличных от наполнителей, носителей и стабилизаторов, сывороточного альбумина и т.п.), или они могут быть в комплексе с другим белком или полимером.

Общие способы очистки.

Любой из различных этапов выделения можно применить к клеточному лизату, экстракту, культуральной среде, тельцам включения, периплазматическому пространству клеток-хозяев, цитоплазме клеток-хозяев или другому материалу, содержащему полипептид релаксина, или к любым смесям полипептида релаксина, полученным в результате любого этапа выделения, включая, но не ограничиваясь перечисленными, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействия, хроматографию гель-фильтрацией, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), обращеннофазовую ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ), хроматографию в расширяющемся слое, или любую их комбинацию и/или их повторение и в любом подходящем порядке.

Оборудование и другие необходимые материалы, используемые для осуществления способов, описанных здесь, имеются в продаже. Насосы, коллекторы фракций, мониторы, магнитофоны и целые системы можно приобрести, например, в Applied Biosystems (Foster City, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA), и Amersham Biosciences, Inc (Piscataway, Нью-Джерси). Материалы для хроматографии, включая матрицы для обменной хроматографии, среды и буфера, но не ограничиваясь перечисленными, также доступны от таких компаний.

Уравновешивание и другие шаги в процессах хроматографии на колонке, описанные здесь, таких как отмывка и элюирование, могут более быстрыми темпами осуществляться с использованием специализированного оборудования, такого как насос. Коммерчески доступные насосы включают, но не ограничиваются, HiLOAD® насос P-50, перистальтический насос P-1, насос P-901 и насос P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Примеры коллекторов фракций включают коллекторы фракций RediFrac, FRAC-100 и FRAC-200, а также коллектор фракций SUPERFRAC® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Также доступны смесители для формирования pH и линейных градиентов концентраций. Коммерчески доступные смесители включают смесители Gradient GM-1 и B-Line Смесители (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Мониторинг процесса хроматографии можно осуществлять с помощью любого имеющегося в продаже монитора. Такие мониторы могут быть использованы для сбора такой информации, как УФ, pH и проводимость. Примеры детекторов включают монитор UV-1, UVICORD® S II, монитор УФ-М II, монитор UV-900, монитор UPC-900, монитор pH/C-900 и монитор проводимости (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Фактически, можно приобрести целые системы, в том числе различные АКТА® системы от Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, например, полипептид релаксина может быть восстановлен и денатурирован вначале путем денатурации полученного очищенного полипептида релаксина в мочеvine, с последующим разбавлением в буфере TRIS, содержащем восстановитель (например, DTT) при подходящем pH. В другом варианте осуществления полипептид релаксина денатурируют в мочеvine в диапазоне концентраций от приблизительно 2 до примерно 9 М, с последующим разбавлением в буфере Трис при pH в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0. Смесь для рефолдинга согласно этому варианту осуществления может быть затем инкубирована. В одном варианте осуществления смесь для рефолдинга инкубируют при комнатной температуре в течение от четырех до двадцати четырех часов. Смесь восстановленного и денатурированного полипептида релаксина смесь может затем быть дополнительно выделена или очищена.

В настоящей заявке pH первой смеси полипептида релаксина может быть скорректирован до проведения любых последующих шагов выделения. Кроме того, первую смесь полипептида релаксина или любая последующую его смесь можно концентрировать с использованием способов, известных в данной области. Кроме того, элюирующий буфер, содержащий первую смесь полипептида релаксина или любую последующую его смесь можно заменить на буфер, который подходит для следующего этапа выделения с использованием способов, известных специалистам в данной области.

Ионообменная хроматография.

В одном варианте осуществления и в качестве необязательного дополнительного шага может быть выполнена ионообменная хроматография первой смеси полипептида релаксина. Общую информацию можно найти в ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Коммерчески доступные ионообменные колонки включают колонки HiTrap®, HiPrep® и HiLoad® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Такие колонки используют сильные аниониты, такие как Q Sepharose® Fast Flow, Q Sepharose® High Performance, и Q Se-

pharose® XL, сильные катионообменники, такие как SP Sepharose® High Performance, SP Sepharose® Fast Flow и SP Sepharose® XL, слабые аниониты, такие как DEAE Sepharose® Fast Flow, а также слабые катионообменники, такие как CM Sepharose® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Анион- или катионообменную колоночную хроматографию можно применить к полипептиду релаксина на любой стадии процесса очистки, чтобы выделить, по существу, очищенный полипептид релаксина. Этап катионообменной хроматографии может быть выполнен с использованием любой подходящей катионообменной матрицы. Пригодные катионообменные матрицы включают, но не ограничиваются перечисленными, волокнистые, пористые, непористые, микрозернистые, бисерные или сшитые катионообменные материалы. Такие катионообменные материалы для матриц включают, но не ограничиваются перечисленными, целлюлозу, агарозу, декстран, полиакрилат, поливинил, полистирол, диоксид кремния, полиэферы или композиты любых их перечисленных выше материалов.

Матрицей катионного обмена может быть любой подходящий катионообменник, в том числе сильный и слабый катионообменник. Сильные катионообменники могут оставаться ионизированными в широком диапазоне pH и, таким образом, могут быть способны связывать релаксин в широком диапазоне pH. Слабые катионообменники, однако, могут потерять ионизацию как функцию pH. Например, слабый катионообменник может потерять заряд, когда pH падает ниже примерно pH 4 или pH 5. Подходящие сильные катионообменники включают, но не ограничиваются перечисленными, заряженные функциональные группы, такие как сульфопропил (SP), метил-сульфонат (S) или сульфэтил (SE). Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником, предпочтительно с диапазоном pH связывания с релаксином от приблизительно 2,5 до примерно 6,0. Кроме того, сильный катионообменник может предпочтительно иметь диапазон pH связывания с релаксином от приблизительно pH 2,5 до приблизительно pH 5,5. Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником с диапазоном pH связывания с релаксином предпочтительно около 3,0. Кроме того, катионообменная матрица может быть сильным катионообменником с диапазоном pH связывания с релаксином предпочтительно от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0. Катионообменная матрица может быть сильным катионообменником с диапазоном pH связывания с релаксином предпочтительно от 8,0 до примерно 12,5. Кроме того, сильный катионообменник может иметь диапазон pH связывания с релаксином от приблизительно pH 8,0 до приблизительно pH 12,0.

Перед загрузкой релаксина катионообменная матрица может быть уравновешена, например, с помощью нескольких объемов колонки разбавленной, слабой кислоты, например, четырех объемов колонки 20 mM уксусной кислоты, pH 3. После уравновешивания может быть добавлен релаксин и колонку можно промыть один или более раз до элюирования, по существу, очищенного релаксина, также с помощью слабого раствора кислоты, такой как раствор слабой уксусной кислоты или фосфорной кислоты. Например, примерно 2-4 объемов колонки 20 mM уксусной кислоты, pH 3, может быть использовано для промывки колонки. Дополнительная промывка, например, с использованием 2-4 объемов колонки 0,05 M ацетата натрия, pH 5,5, или 0,05 M ацетата натрия, смешанного с 0,1 M хлорида натрия, pH 5,5, также может быть использована. Кроме того, с использованием способов, известных в данной области, катионообменная матрица может быть уравновешена с использованием нескольких объемов колонки разбавленного слабого основания.

Кроме того, по существу, очищенный релаксин может быть элюирован путем приведения катионообменной матрицы в контакт с буфером с достаточно низким pH или ионной силой для вытеснения релаксина из матрицы. pH элюирующего буфера может составлять примерно от pH 2,5 до примерно pH 6,0. Более конкретно, pH элюирующего буфера может составлять примерно от pH 2,5 до примерно pH 5,5, примерно от pH 2,5 до примерно pH 5,0. Элюирующий буфер может иметь pH приблизительно 3,0. Кроме того, количество буфера элюирования может варьировать в широких пределах и обычно находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 10 объемов колонки. После адсорбции полипептида релаксина на катионообменной матрице, по существу, очищенный полипептид релаксина может быть элюирован путем приведения матрицы в контакт с буфером, имеющим достаточно высокий pH или ионную силу для вытеснения полипептида релаксина из матрицы. Подходящие буферы для использования для элюирования, по существу, очищенного полипептида релаксина при высоких pH могут включать, но не ограничиваться перечисленными, цитратный, фосфатный, формиатный, ацетатный буферы, буферы HEPES и MES в диапазоне концентраций от по меньшей мере приблизительно 5 mM до по меньшей мере приблизительно 100 mM.

Хроматография с обращенной фазой.

ОФ-ВЭЖХ может быть выполнена для очистки белков с использованием подходящих протоколов, которые известны специалистам в данной области. См., например, Pearson et al., ANAL. BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier et al., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani et al. J. CHROM. (1986) 359:391-402. ОФ-ВЭЖХ может быть применена для полипептида релаксина чтобы выделить, по существу, очищенный полипептид релаксина. Для этого можно применять смолы на основе диоксида кремния с алкильными функциональными группами с широким спектром длин, в том числе, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере от приблизительно C3 до по меньшей мере приблизительно C30, от по меньшей

мере приблизительно C3 до по меньшей мере приблизительно C20 или от по меньшей мере приблизительно C3 до по меньшей мере приблизительно C18. Кроме того, может быть использована полимерная смола. Например, может быть использована смола TosoHaas Amberchrome CGL000sd, которая является стиролполимерной смолой. Циано- или полимерные смолы с широким спектром длин алкильных цепей могут быть также использованы. Далее ОФ-ВЭЖХ колонку можно промывать растворителем, таким как этанол. Колонка Source RP является еще одним примером колонки для ОФ-ВЭЖХ. Подходящий элюирующий буфер, содержащий реагент для образования ионных пар и органический модификатор, такой как метанол, изопропиловый спирт, тетрагидрофуран, ацетонитрил или этанол, может быть использован для элюирования полипептида релаксина из колонки ОФ-ВЭЖХ. Наиболее часто используемые реагенты для формирования ионных пар включают, но не ограничиваются перечисленными, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, хлорную кислоту, фосфорную кислоту, трифторуксусную кислоту, гептафтормасляную кислоту, триэтиламин, тетраметиламмоний, тетрабутиламмоний и триэтиламмония ацетат. Элюирование может быть выполнено с использованием одного или нескольких градиентов или в изократических условиях, с градиентом, создающим условия, благоприятные для уменьшения времени разделения и уменьшения ширины пика. Другой способ предполагает использование двух градиентов с различными диапазонами концентраций растворителя. Примеры подходящих буферов элюирования для использования в настоящем изобретении, могут включать, но не ограничиваются перечисленными: растворы ацетата аммония и ацетонитрила.

Способы очистки с использованием хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC) может быть выполнена для полипептида релаксина. Общую информацию можно найти в справочнике HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), который включен в настоящее описание путем ссылки. Подходящие матрицы для HIC могут включать, но не ограничиваются перечисленным, алкил- или арилзамещенные матрицы, такие как бутил-, гексил-, октил- или фенилзамещенные матрицы, в том числе агарозы, сшитые агарозы, сефароза, целлюлозу, матрицы на основе диоксида кремния, декстрана, полистирола, полиметакрилата, и смолы смешанного типа, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, полиэтиленаминовые смолы или бутил- или фенилзамещенные полиметакрилатные матрицы. Коммерчески доступные источники колонок для хроматографии гидрофобных взаимодействий включают, но не ограничиваются перечисленным, колонки HISTRAP®, HIPREP® и HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Вкратце, перед загрузкой колонка для HIC может быть уравновешена с использованием стандартных буферов, которые известны специалистам в данной области техники, таких как смесь уксусная кислота/раствор хлорида натрия или буфер HEPES, содержащий сульфат аммония. Сульфат аммония может быть использован в качестве буфера для загрузки колонки для HIC. После загрузки полипептида релаксина колонку промывают с использованием стандартного буфера и условий, способствующих удалению нежелательных материалов и удерживанию полипептида релаксина на колонке HIC. Полипептид релаксина может быть элюирован с использованием от приблизительно 3 до приблизительно 10 объемов колонки стандартного буфера, такого как буфер HEPES, содержащий ЭДТА и более низкую концентрацию сульфата аммония, чем уравновешивающий буфер или буферной смеси уксусная кислота/хлорид натрия, среди прочих. Понижающийся линейный градиент соли, например, с использованием градиента фосфата калия, также может быть использован для элюирования молекул релаксина. Элюат можно подвергнуть концентрированию, например, путем фильтрации, такой как диафильтрация или ультрафильтрация. Диафильтрация может быть использована для удаления соли, используемой для элюирования полипептида релаксина.

Другие методы очистки.

Для первой смеси полипептида релаксина или любой последующей их смеси может быть применен еще один этап выделения с использованием, например, гель-фильтрации (GELFILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18, 1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, которая включена в настоящее описание путем ссылки), хроматографии на гидроксиапатите (подходящие матрицы, включают, но не ограничиваются, HA-Ultrogel высокого разрешения (Calbiochem), керамический гидроксиапатит СНТ (BioRad), био-гель-гидроксиапатита НТР (BioRad)), ВЭЖХ, хроматографии в расширяющемся слое, ультрафильтрации, диафильтрации, лиофилизации и т.п., чтобы удалить излишки соли и заменить буфер подходящим буфером для следующего этапа выделения или даже получения конечного лекарственного продукта.

Выход полипептида релаксина, в том числе, по существу, очищенного полипептида релаксина, можно контролировать на каждом этапе с использованием описанных здесь методик, известных специалистам в данной области. Такие способы также могут быть использованы для оценки выхода, по существу, очищенного полипептида релаксина, после последнего этапа выделения. Например, выход полипептида релаксина можно контролировать с помощью любой из нескольких колонок обращеннофазовой хроматографии высокого давления с различными длинами алкильной цепи, таких как циано ОФ-ВЭЖХ, C18ОФ-ВЭЖХ, а также катионообменной ВЭЖХ и ВЭЖХ гель-фильтрации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выход релаксина после каждой

стадии очистки может составлять по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 99,9% или по меньшей мере 99,99% количества релаксина в исходном материале для каждой стадии очистки. Чистота может быть определена с использованием стандартных методик, таких как электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия или путем измерения полипептида релаксина с использованием вестерн-блоттинга и ИФА. Например, могут быть получены поликлональные антитела против белков, выделенных из дрожжевой культуры отрицательного контроля брожения и вещества, полученного в результате катионообменной очистки. Антитела могут быть также использованы для исследования на присутствие загрязняющих белков клетки-хозяина.

Материал для ОФ-ВЭЖХ Vydac C4 (Vydac) состоит из частиц силикагеля, поверхности которых несут С4-алкильные цепи. Выделение полипептида релаксина из белковых примесей основано на различиях в силе гидрофобных взаимодействий. Элюирование осуществляют градиентом ацетонитрила в разбавленной трифторуксусной кислоте. Препаративную ВЭЖХ осуществляют с использованием колонки из нержавеющей стали (заполняется от 2,8 до 3,2 л Vydac C4 силикагеля). Элюат с гидроксипатитовой колонки Ultrogel подкисляют путем добавления трифторуксусной кислоты и загружают на колонку Vydac C4 для промывки и элюирования градиентом ацетонитрила в разбавленной трифторуксусной кислоте. Фракции собирают и сразу же нейтрализуют фосфатным буфером. Фракции полипептида релаксина, которые полученные ион-парной хроматографией, объединяют.

Материал DEAE Sepharose (Pharmacia) состоит из диэтиламиноэтил (DEAE)-групп, которые ковалентно связаны с поверхностью сефарозных шариков. Связывание полипептида релаксина с группами DEAE опосредовано ионными взаимодействиями. Ацетонитрил и трифторуксусная кислота проходят через колонку без задержки. После вымывания этих вещества следы примеси удаляют путем промывания колонки ацетатным буфером с низким pH. Затем колонку промывают нейтральным фосфатным буфером и полипептид релаксина элюируют буфером с повышенной ионной силой. Колонка наполнена материалом DEAE Sepharose Fast Flow. Объем колонки регулируют для обеспечения загрузки полипептидом релаксина в диапазоне 3-10 мг полипептида релаксина/мл геля. Колонку промывают водой и уравнивающим буфером (фосфат натрия / калия). Загружают объединенные фракции элюата ВЭЖХ, колонку промывают уравнивающим буфером. Затем колонку промывают промывочным буфером (буфер ацетата натрия) с последующей промывкой уравнивающим буфером. Затем полипептид релаксина элюируют из колонки элюирующим буфером (хлорид натрия, фосфат натрия/калия) и собирают в одну фракцию в соответствии с основным профилем элюирования. Элюат из колонки DEAE Sepharose доводят до указанной проводимости. Полученную в результате лекарственная субстанция стерильно фильтруют в бутылки из тефлона и хранят при температуре -70°C. Дополнительные способы, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются этапами по удалению эндотоксинов. Эндотоксины представляют собой липополисахары (ЛПС), которые расположены на наружной мембране грамотрицательных клеток-хозяев, таких как, например, *Escherichia coli*. Способы снижения уровня эндотоксина известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, перечисленными, методы очистки с использованием подложек из диоксида кремния, стеклянного порошка или гидроксипатита, с обращенной фазой, аффинной, эксклюзионной, анионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, сочетания этих способов и тому подобное. Модификации или дополнительные способы могут потребоваться для удаления загрязняющих веществ, такие как совместная миграция белков из целевого полипептида. Способы измерения уровня эндотоксина, как известно специалистам в данной области техники, включают, но не ограничиваются, анализы на основе лизата амебоцит *Limulus* (LAL). Анализ Endosafe TM-PTS является колориметрическим осуществляемым в одном объеме емкости анализом, в котором используют картриджи с предварительно загруженным реагентом LAL, хромогенный субстрат и контроль стандартного эндотоксина в комбинации с ручным спектрофотометром. Альтернативные способы включают, но не ограничиваются перечисленными, кинетический LAL-тест, который является турбидиметрическим и использует 96-луночный формат. Широкий спектр способов и процедур может быть использован для оценки выхода и чистоты белков релаксина, содержащих одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, анализ Бредфорда, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), SDS-PAGE с окрашиванием серебром, SDS-PAGE с окрашиванием ку-масси, масс-спектрометрия (включая, но не ограничиваясь перечисленными, MALDI-TOF) и другие методы исследования белков, известные специалистам в данной области. Дополнительные способы включают, но не ограничиваются: SDS-PAGE в сочетании с методами окрашивания белков, иммуноблоттинг,

лазерная десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия MALDI (MALDI-MS), жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, изоэлектрофокусирование, аналитический анионный обмен, хроматофокусирование, и круговой дихроизм.

Метод *in vivo*, называемый селективным встраиванием под давлением, был разработан для использования разнообразных синтетаз дикого типа. См., например, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F.M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Ауксотрофное напряжение, которое появляется, когда соответствующий метаболический путь снабжения клетки определенной природной аминокислотой выключен, представляет собой выращивание в минимальной среде, содержащей ограниченную концентрацию природной аминокислоты, при подавлении транскрипции генов-мишеней. В начале стационарной фазы роста природная аминокислота будет истощаться и заменяется на неприродный аналог. Индукция экспрессии рекомбинантного белка приводит к накоплению белка, содержащего неприродный аналог. Например, с помощью этой стратегии, *o*-, *m*- и *p*-фторфенилаланины встраивали в белки, что проявлялось в виде двух характерных плеч в УФ-спектре, которые могут быть легко идентифицированы, см., например, C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); трифторметионин был использован для замены метионина в лизоциме бактериофага T4 для изучения его взаимодействия с цитоолигосахарными лигандами методом ЯМР ^{19}F , см., например, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); и трифторлейцин был включен вместо лейцина, что приводит к увеличению термической и химической стабильности белка с лейциновой "молнией". См., например, Y. Tang, G. Ghirlanda, W.A. Petka, T. Nalcajima, W.F. DeGrado and D.A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Кроме того, селенометионин и теллуromетионин встраивали в различные рекомбинантные белки для облегчения разделения фаз в рентгеноструктурном анализе. См., например, W.A. Hendrickson, J.R. Horton and D.M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J.O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J.D. Odom, B. Dunlap, L. Lebiada and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); и N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). Также эффективно встраивали аналоги метионина с алкеновой или алкиновой функциональными группами, что обеспечивало дополнительные возможности для химических модификаций белка. См., например, 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); и K.L. Kiick and D.A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); патент США № 6586207; патентная публикация США 2002/0042097, которые включены в настоящее описание путем ссылки.

Успех этого способа основан на распознавании неприродных аналогов аминокислот аминоксил-тРНК-синтетазой, которое обычно требует высокой селективности для обеспечения точности трансляции белка. Одним из способов расширить возможности этого способа, является ослабление субстратной специфичности аминоксил-тРНК-синтетазы, которое было достигнуто в ограниченном количестве случаев. Например, замена Ala на Gly в фенилаланил-тРНК-синтетазе кишечной палочки (PheRS) увеличивает размер кармана связывания с субстратом, и в результате происходит ацилирование тРНК Phe *p*-Cl-фенилаланином (*p*-Cl-Phe), см. M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). Штамм *Escherichia coli*, содержащий эту мутантную PheRS, обеспечивает встраивание *p*-Cl-фенилаланина или *p*-Br-фенилаланина вместо фенилаланина. См., например, M. Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); и N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D.A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). Аналогично, было показано, что точечная мутация Phe130Ser вблизи сайта связывания аминокислоты в тирозил-тРНК синтетазе *Escherichia coli* приводит к тому, что азатирозин может быть включен более эффективно, чем тирозин. См. 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).

Еще одна стратегия встраивания неприродных аминокислот в белки *in vivo* состоит в модификации синтетаз, обладающих механизмом проверки. Эти синтетазы не могут различить и, соответственно, активируют аминокислоты, которые структурно похожи на соответствующие природные аминокислоты. Эта ошибка корректируется в отдельном сайте, который деацилирует слабозаряженные аминокислоты от тРНК и сохраняет надежность трансляции белка. Если корректирующая активность синтетазы отключена, структурные аналоги, которые ошибочно активируются, могут скрыться от функции редактирования и встроиться в белок. Этот подход был продемонстрирован недавно с валил-тРНК-синтетазой (ValRS). См. 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 может ошибочно аминоксиллировать тРНКVal цистеином, треонином или аминобутиратом (Abu); эти неродственные аминокислоты в дальнейшем гидролизуются редактирующим доменом. После случайного мутагенеза хромосомы *Escherichia coli* был выбран мутантный штамм *E. coli*, который имеет мутацию в редактирующем сайте ValRS. Это дефектное редактирование ValRS неправильно нагружает тРНКVal цистеином. В результате того, что Abu стерически близко Cys (-SH группы Cys заменяют -CH₃ в Abu-), мутант ValRS также встраивает в белки Abu, если этот штамм мутант *Escherichia coli* выращивают в присутствии Abu. Масс-спектрометрический анализ показывает, что приблизительно 24% валина заменено на Abu в каждом положении Abu в нативном белке.

Далее для синтеза ряда белков можно использовать твердофазные синтезы и полусинтетические

методы, содержащие новые аминокислоты. Например, см. следующие публикации и цитируемые в них источники: 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..CRC Crit Rev Biochem. II(3):255-301 (1981); Oford, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.* 1(3): 151-157 (1987); и Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, *Science*. 266(5183):243 (1994). Химическая модификация была использована для введения различных неприродных боковых цепей, в том числе кофакторов, спиновых меток и олигонуклеотидов в белки in vitro. См. 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); и, Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*.242(4881): 1038-1040 (1988).

Кроме того, биосинтетические способы с использованием химически модифицированных аминокислот-тРНК применяли для встраивания некоторых биофизических зондов в белки, которые синтезируются in vitro. См. следующие публикации и содержащиеся в них ссылки: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem.* 62:483-514 (1993); and Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl.Acad. Sci.* 83(22):8604-8608 (1986). Ранее было показано, что неприродные аминокислоты могут быть сайт-специфическим образом встроены в белки in vitro путем добавления химически аминокислотированных супрессорных тРНК в реакции синтеза белка, программируемой геном, содержащим нужную нонсенс-мутацию амбер. Используя эти подходы, можно заменить некоторые из двадцати обычных аминокислот их близкими структурными гомологами, например фторфенилаланином заменить фенилаланин, с использованием ауксотропических штаммов для конкретной аминокислоты. См., например, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc.* 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51; Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); и, Mendel, D., Comish, V.W. & Schultz, P.G. Site- Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

Например, была разработана супрессорная тРНК для распознавания стоп-кодона UAG и химически аминокислотирована неприродной аминокислотой. Обычный сайт-направленный мутагенез был использован для введения стоп-кодона TAG в целевом сайте гена белка. См., например, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res.* 16(3):791-802 (1988). Когда аминокислотированная супрессорная тРНК и мутантный ген объединяли в in vitro системе транскрипции/трансляции, неприродная аминокислота встраивалась в ответ на кодон UAG, в результате чего был получен белок, содержащий указанную аминокислоту в указанном положении. Эксперименты с использованием [³H]-Phe и эксперименты с α-гидроксильными кислотами показали, что только нужные аминокислоты встраиваются в положение, определяемое кодоном UAG, и что эта аминокислота не встраивается в других местах белка. См., например, Noren, et al., выше, Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; и, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*.255(5041): 197-200 (1992).

тРНК могут быть аминокислотированы требуемой аминокислотой с использованием любого способа или методики, в том числе, но не ограничиваясь химическим или ферментативным аминокислотированием.

Аминокислотирование может быть осуществлено с использованием аминокислот тРНК синтетазы или других ферментативных молекул, включая рибозимы, но не ограничиваясь ими. Термин "рибозим" равнозначен "каталитическим РНК". Чех с соавт. (Cech, 1987, *Science*, 236:1532- 1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) продемонстрировали наличие природных РНК, которые могут выступать в качестве катализаторов (рибозимов). Однако несмотря на то, что действие этих природных каталитических РНК было продемонстрировано только в отношении расщепления и сплайсинга рибонуклеиновых кислот, недавнее развитие искусственной эволюции рибозимов расширило репертуар катализа различных химических реакций. Исследования выявили, что молекула РНК может катализировать связывание

аминоацил-РНК на своих (2')3'-концах (Illangakekare et al., 1995 Science 267:643-647), и что существуют молекулы РНК, которые могут передавать аминокислоты от одной молекулы РНК на другую (Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444).

В публикации патентной заявки США 2003/0228593, которая включена в настоящее описание путем ссылки, описаны способы конструирования рибозимов и их применение в аминоацилировании тРНК природными кодируемыми и не кодируемыми в природных условиях аминокислотами. Имобилизованные на подложке формы ферментативных молекул, которые могут аминоацилировать тРНК, включая рибозимы, но не ограничиваясь ими, могут обеспечить эффективную аффинную очистку аминоацилированных продуктов. Примеры подходящих подложек включают агарозы, сефарозу и магнитные шарики. Производство и использование иммобилизованных на подложке форм рибозимов для аминоацилирования описано в Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 и публикации патентной заявки США 2003/0228593, которые включены в настоящее описание путем ссылки.

Химические способы аминоацилирования включают, но не ограничиваются описанным в 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) и Schultz, Chamberlin, Dougherty и другие (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, 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; Hoshida, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34),), которые включены в настоящее описание путем ссылки, но не ограничиваются ими. Эти способы позволяют избежать использования синтетазы в аминоацилировании. Такие способы или другие способы химического аминоацилирования могут быть использованы для аминоацилирования молекулы тРНК.

Способы для получения каталитических РНК могут включать наработку отдельных пулов рандомизированных последовательностей рибозимов, осуществление направленной эволюции в пулах, скрининг пула на желательную активность аминоацилирования и выбор последовательностей рибозимов, которые демонстрируют желаемую активность аминоацилирования.

Рибозимы могут включать в себя мотивы и/или участки, которые облегчают ацилирование, такие как мотив GGU и U-богатый регион. Например, сообщалось, что U-богатые регионы могут способствовать распознаванию аминокислоты-субстрата, а GGU-мотив может образовывать пары оснований на 3'-конце тРНК. В сочетании GGU и мотив, и U-богатый регион облегчают одновременно распознавание аминокислоты и тРНК, и тем самым облегчают аминоацилирование 3'-конца тРНК.

Рибозимы могут быть получены в процессе *in vitro* отбора с использованием частично рандомизированного r24mini, конъюгированного конъюгата с тРНК^{Asn}_{CCCG}, с последующим систематическим изменением консенсусной последовательности обнаруживаемой в активных клонах. Пример рибозима, полученного этим способом, называется "рибозим Fx3" и описан в патентной публикации США № 2003/0228593, содержание которой включено в настоящее описание путем ссылки. Он действует как универсальный катализатор синтеза различных аминоацил-тРНК, нагруженных соответствующими неприродными аминокислотами.

Иммобилизация на подложку может быть использована для эффективной аффинной очистки аминоацилированных тРНК. Примеры подходящих подложек включают агарозы, сефарозу и магнитные шарики, но не ограничиваются ими. Рибозимы могут быть иммобилизованы на смолах за счет особенностей химической структуры РНК, например, 3'-цис-диол на рибозе в РНК может быть окислен периодатом с получением соответствующего диальдегида для облегчения иммобилизации РНК на смоле. Различные типы смол могут быть использованы, в том числе недорогие гидразидные смолы, в которых восстановительное аминирование обеспечивает взаимодействие, приводящее к необратимому связыванию между смолой и рибозимом. Синтез аминоацил-тРНК может быть значительно активирован путем использования этой методики аминоацилирования в колонке. В Kourouklis et al. Methods 2005; 36:239-4 описана система аминоацилирования на основе колонки.

Выделение аминоацилированных тРНК может быть осуществлено различными способами. Один подходящий способ включает люирование аминоацилированных тРНК из колонки буфером, таким как ацетат натрия, раствор 10 мМ ЭДТА, буфер, содержащий 50 мМ N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(3-пропансульфоновой кислоты), 12,5 мМ KCl, pH 7,0, 10 мМ ЭДТА или просто ЭДТА буферная вода (pH 7,0). Аминоацилированные тРНК могут быть добавлены в реакционные смеси, где осуществляется трансляция, в целях включения аминокислоты, аминоацилированной тРНК, в выбранное положение в полипептиде, определенной реакцией трансляции. Примеры систем трансляции, в которых могут быть использованы аминоацилированные тРНК согласно настоящему изобретению, включают клеточные лизаты, но не ограничиваются ими. Клеточные лизаты обеспечивают компоненты реакционной смеси, необходимые для трансляции полипептида *in vitro* с исходной мРНК. Примеры таких компонентов реакции включают рибосомные белки, рРНК, аминокислоты, тРНК, ГТФ, АТФ, факторы инициации трансляции и

элонгации, а также дополнительные факторы, связанные с трансляцией. Кроме того, трансляционные системы могут представлять собой объединенные системы трансляции или компартментализованные системы. В объединенных системах трансляции компоненты реакции находятся в одном отсеке, в то время как в компартментализованных системах трансляции компоненты реакции трансляции отделены от продуктов реакции, которые могут снижать эффективность трансляции. Такие системы трансляции являются коммерчески доступными.

Кроме того, может быть использована сопряженная система транскрипции/трансляции. Сопряженная система транскрипции/трансляции обеспечивает транскрипцию исходной ДНК в соответствующую мРНК, которая, в свою очередь транслируется в компоненты реакции. Примером коммерчески доступных систем сопряженной транскрипции/трансляции является система Rapid Translation System (RTS, Roche Inc.) Система включает в себя смесь, содержащую лизат *Escherichia coli* для обеспечения компонентов трансляции, таких как рибосомы и факторы трансляции. Кроме того, система содержит РНК-полимеразы для исходной ДНК в мРНК для использования в трансляции. В RTS можно использовать компартментализацию компонентов реакции посредством мембраны, расположенной между отсеками реакции, включающими компартменты исходные материалы/отходы и компартмент транскрипции/трансляции. Аминоацилирование тРНК может осуществляться другими агентами, включая трансферазы, полимеразы, каталитические антитела, многофункциональные белки и т.п., но не ограничиваясь ими.

Stephan в Scientist 2005 Oct 10; стр. 30-33 описывает дополнительные способы встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот в белки. Lu et al. в Mol Cell. 2001 Oct; 8(4):759-69 описывают способ, в котором белок химически лигировали с синтетическим пептидом, содержащим неприродные аминокислоты (лигирование экспрессируемого белка).

Способы микроинъекции также можно использовать для встраивания неприродных аминокислот в белки. См., например, M.W. Nowak, P.C. Kearney, J.R. Sampson, M.E. Saks, C.G. Labarca, S.K. Silverman, W.G. Zhong, J. Thorson, J.N. Abelson, N. Davidson, P.G. Schultz, D.A. Dougherty and H.A. Lester, Science, 268:439 (1995); и D.A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000). Ооцит *Xenopus* инъецировали одновременно двумя видами РНК, созданными *in vitro*: мРНК, кодирующей белок-мишень со стоп-кодоном UAG в целевом положении аминокислоты и амбер супрессорную тРНК, аминоацилированную желаемой неприродной аминокислотой. Затем механизм трансляции яйцеклетки встраивает неприродные аминокислоты в положениях, определяемых кодоном UAG. Этот способ сделал возможными структурно-функциональные исследования интегральных мембранных белков *in vivo*, которые обычно не поддаются экспрессии в системах *in vitro*. Примеры включают встраивание флуоресцентной аминокислоты в тахикинина нейрокинина-2 рецептор для измерения расстояний методом флуоресцентного резонансного переноса энергии, см., например, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, J. Biol. Chem., 271:19991 (1996); встраивание биотинилированных аминокислот для выявления экспонированных на поверхности остатков в ионных каналах, см., например, J.P. Gallivan, H.A. Lester and D.A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997); использование каркасных аналогов тирозина для мониторинга конформационных изменений в ионных каналах в реальном времени, см., например, J.C. Miller, S.K. Silverman, P.M. England, D.A. Dougherty and H.A. Lester, Neuron, 20:619 (1998); и использование альфа-гидроксильных аминокислот для изменения магистралей ионного канала для исследования механизмов их стробирования. См., например, P.M. England, Y. Zhang, D.A. Dougherty and H.A. Lester, Cell 96:89 (1999); и T. Lu, A.Y. Ting, J. Mainland, L.Y. Jan, P.G. Schultz and J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001).

Возможность встраивания неприродных аминокислот прямо в белки в естественных условиях обеспечивает широкий спектр преимуществ, включая высокие выходы мутантных белков, техническую простоту, возможность изучения мутантных белков в клетках или, возможно, в живых организмах и использование этих мутантных белков в лечебных процедурах и диагностических целях, но не ограничиваясь перечисленным. Возможность встраивать неприродные аминокислоты различных размеров, свойств кислотности, нуклеофильности, гидрофобности и других свойств в белки может значительно расширить возможности рационального и системного управления структурой белков, так для исследования функцию белка и создания новых белков или организмов с новыми свойствами.

В одной попытке сайт-специфического встраивания пара-F-Phe, пару дрожжевая амбер-супрессорная тРНК PheCUA/фенилаланил-тРНК-синтаза использовали в p-F-Phe устойчивом, Phe аутокотрофном штамме *Escherichia coli*. См., например, R. Furter, Protein Sci., 7:419(1998).

Также возможно получить экспрессию полинуклеотида релаксина согласно настоящему изобретению с использованием бесклеточной (*in vitro*) системы трансляции. Трансляционные системы могут быть клеточными или бесклеточными и могут быть прокариотическими или эукариотическими. Клеточные системы трансляции включают, но не ограничиваются перечисленными: все клеточные препараты, такие как пермеабиллизованные клетки или клеточные культуры, в которых желаемая последовательность нуклеиновых кислот может быть транскрибирована в мРНК, а мРНК транслирована. Бесклеточные трансляционные системы доступны для приобретения, многие различные типы систем хорошо известны. Примеры бесклеточной системы включают, но не ограничиваются перечисленными, прокариотические лиза-

ты, такие как *Escherichia coli* лизаты, и эукариотические лизаты, такие как экстракт зародышей пшеницы, насекомых клеточные лизаты, лизаты ретикулоцитов кролика, лизаты ооцитов кролика и лизаты клеток человека. Эукариотические экстракты или лизаты могут быть предпочтительными, если получаемый белок гликозилирован, фосфорилирован или содержит другую модификацию, поскольку многие такие изменения возможны только в эукариотических системах. Некоторые из этих экстрактов и лизатов являются коммерчески доступными (Promega, Мэдисон, штат Висконсин, Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния; Amersham, Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL, Grand Island, NY). Мембранные экстракты, такие как экстракты поджелудочной железы собаки, содержащие микросомальные мембраны, также доступны, их можно использовать для трансляции секреторных белков. В этих системах, которые могут включать либо мРНК в качестве шаблона (*in vitro* трансляция), либо ДНК в качестве матрицы (в сочетании транскрипции и трансляции *in vitro*), синтез *in vitro* направляется рибосомами. Значительные усилия направлены на разработку бесклеточных систем экспрессии белка. См., например, Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); and Patnaik, R. And J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); патент США № 6337191, патент США № 2002/0081660, WO 00/55353, WO 90/05785, которые включены в настоящее описание путем ссылки. Другой подход, который может быть применен для экспрессии полипептидов релаксина, содержащих не кодируемые в природных условиях аминокислоты, включает методики гибридизации мРНК-пептида. См., например R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003). При таком подходе матрица мРНК, связанная с пуромицином, транслируется в пептид на рибосоме. Если одна или более молекул тРНК были модифицированы, неприродные аминокислоты также могут быть включены в пептид. После считывания последнего кодона мРНК пуромицин захватывает С-конец пептида. Если полученный в результате конъюгат мРНК-пептид проявляет интересные свойства в анализе *in vitro*, его можно легко идентифицировать по последовательности мРНК. Соответственно, можно осуществить скрининг библиотек полипептида релаксина, содержащих одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот для идентификации полипептидов, обладающих желаемыми свойствами. Позднее сообщалась о рибосомальной трансляции *in vitro* с очищенными компонентами, которая позволит синтезировать пептиды, содержащие замены не кодируемыми в природных условиях аминокислотами. См., например, A. Forster et al., *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 100:6353 (2003). Восстановленные системы трансляции также могут быть использованы. Смеси очищенных факторов трансляции также успешно используются для трансляции мРНК в белок, а также комбинации из лизатов или лизатов, дополненных очищенными факторами трансляции, такими как фактор инициации-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α или β), фактор элонгации Т (EF-Tu), или фактор терминации. Бесклеточные системы также могут представлять собой сопряженную систему транскрипции/трансляции, где ДНК вводят в систему, транскрибируют в мРНК, а мРНК транслируют как описано в источнике *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., editors, Wiley Interscience, 1993), который конкретно включен в настоящее описание путем ссылки. РНК транскрибируется в эукариотической транскрипционной системе и может быть в форме гетероядерных РНК (hnRNA) или 5'-концевых экзонов (7-метилгуанозина) и зрелой мРНК 3'-концевым поли-А хвостом, что может быть полезно в некоторых системах трансляции. Например, кэпированная мРНК транслируется с высокой эффективностью в системах на основе лизата ретикулоцитов.

Макромолекулярные полимеры, присоединяемые к полипептидам релаксина.

Различные модификации полипептидов, содержащих неприродные аминокислоты, описанные в данной заявке, могут быть осуществлены с использованием композиций, способов, методик и стратегий, описанных в дано заявке. Эти модификации включают включение дополнительной функциональной группы на неприродном аминокислотном компоненте полипептида, включая, но не ограничиваясь перечисленными группами, маркер; краситель; полимер; водорастворимым полимер, производное полиэтиленгликоля; фотокросслинкер; радионуклид; цитотоксическое соединение; лекарственный агент; аффинный маркер; фотоаффинный маркер; реакционноспособное соединение, смола, второй белок или полипептид или аналог полипептида; антитело или его фрагмент, комплексообразователь металлов; кофактор; жирную кислоту, углевод; полинуклеотид; ДНК, РНК; антисмысловой полинуклеотид; сахар, водорастворимый дендример; циклодекстрин; ингибиторы рибонуклеиновой кислота; биоматериал; наночастицы; спин-метки; флуорофор, металлосодержащий фрагмент; радиоактивный фрагмент; новая функциональная группа; группа, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другими молекулами; фотоактивируемая группа; группы, возбудимые актиничным излучением; фотоизомеризующийся фрагмент; биотин; производные биотина; аналог биотина, группа, содержащая тяжелый атома; химически расщепляемые группы; фоторасщепляемые группы; удлиненную боковую цепь; углерод-связанный сахар; редокс-активный агент; тиаминокислоты; токсичный фрагмент; меченная изотопом группа; биофизический зонд; фосфоресцирующие группы; хемилюминесцентные группы; электронноплотные группы; магнитные группы; интеркалирующие группы; хромофоры; агент переноса энергии; биологически активные соединения; детектируемая метка, небольшие молекулы, квантовые точки; нанотрансмиттер; радионуклеотид; радиотрансмиттер; нейтрон-захватывающий агент, или любое сочетание указанных выше

соединений, или любые другие желательные соединения или вещества. Иллюстративного, неограничивающего примера композиций, способов, приемов и стратегий, описанных здесь, ниже внимание будет уделено присоединению высокомолекулярных полимеров к содержащим неприродные аминокислоты полипептидам. При этом следует понимать, что композиции, способы, приемы и стратегии, описанные в ней, также можно применять (с соответствующими изменениями, в случае необходимости, которые специалист сможет сделать на основании данного описания) для присоединения других функциональных групп, включая перечисленные выше, но не ограничиваясь ими. Разнообразные высокомолекулярные полимеры и другие молекулы могут быть присоединены к полипептидам релаксина по настоящему изобретению для модуляции биологических свойств полипептида релаксина, и/или придания новых биологических свойств молекулы релаксина. Эти высокомолекулярные полимеры могут быть связаны с полипептидом релаксина через кодируемые в природных условиях аминокислоты, через не кодируемые в природных условиях аминокислоты или любые функциональные заместители природной или не природной аминокислоты, или любой заместитель или функциональную группу, присоединенную к природной или неприродной аминокислоте. Молекулярная масса полимера может варьировать в широком диапазоне, включая, но не ограничиваясь, от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да или более. Молекулярная масса полимера может составлять от приблизительно 100 до приблизительно 100000 Да, включая, но не ограничиваясь приведенными значениями, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 100 до приблизительно 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 100 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 1000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 5000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 10000 и до приблизительно 40000 Да.

Настоящее изобретение обеспечивает, по существу, гомогенные препараты конъюгатов полимер:белок. "По существу, гомогенный" в настоящем описании означает, что полимер:белковые конъюгированные молекулы составляют больше половины общего белка. Полимер:белковый конъюгат обладает биологической активностью, и настоящие "по существу, гомогенные" препараты пегилированного полипептида релаксина согласно настоящему описанию представляют собой препараты, достаточно гомогенные для проявления преимуществ гомогенного препарата, например легкость в клиническом применении, в предсказуемости фармакокинетики от партии к партии. Также может быть желательно приготовить смесь молекул конъюгатов полимер:белок, и преимуществом настоящего изобретения является то, что оно позволяет выбрать долю конъюгата монополимер:белок для включения в смесь. Таким образом, при желании, можно приготовить смесь различных белков с различным количеством присоединенных групп полимера (например, ди-, три-, тетра- и т.д.) и объединить указанные конъюгаты с конъюгатом монополимер:белок, подготовленным с использованием способов согласно настоящему изобретению, и получить смесь с заранее определенной долей конъюгатов монополимер:белок.

Выбранный полимер может быть водорастворимым, благодаря чему белок, с которым он связывается, не осаждается в водной среде, такой как физиологическое окружение. Полимер может быть разветвленным или неразветвленным. Для терапевтического использования конечного продукта полимер должен быть фармацевтически приемлемым.

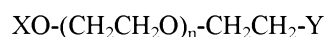
Примеры полимеров включают, но не ограничиваются перечисленными, полиалкилэфиры и их алкоксипированные аналоги (например, полиоксиэтиленгликоль, полиоксиэтилен/пропиленгликоль и их метокси- или этоксиэтиленгликоль, в частности полиоксиэтиленгликоль, который также известен как полиэтиленгликоль или ПЭГ); поливинилпирролидоны; поливинилалкиловые эфиры; полиоксазолины, полиалкилоксазолины и полигидроксиалкильные оксазолины; полиакриламиды, полиалкилакриламиды и полигидроксиалкильные акриламиды (например, полигидроксипропилметакриламид и его производные); полигидроксиалкильные акрилаты; полисиаловые кислоты и их аналоги; гидрофильные пептидные последовательности, полисахариды и их производные, в том числе декстран и производные декстрана, например карбоксиметилдекстран, декстран сульфат, аминодекстран, целлюлоза и ее производные, например карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиалкилцеллюлозы, хитин и его производные, например хитозан, сукцинилхитозан, карбоксиметилхитин, карбоксиметилхитозан, гиалуроновая кислота и ее производные; крахмалы, альгинаты, хондроитин сульфат, альбумин, пуллулан и карбоксиметилцеллюлозы пуллулан; полиаминокислоты и их производные, например полиглутаминовая кислота, полилизины, полиаспарагиновые кислоты, полиаспартамиды; сополимеры малеинового ангидрида, такие как стирол и малеиновый ангидрид, дивинилэтиловый эфир малеинового ангидрида; поливиниловый спирт, его сополимеры, его тройные сополимеры; их смеси, а также производные вышеприведенных соединений. Соотношение молекул полиэтиленгликоля и молекул белка будет меняться, как и их концентрация в реакционной смеси, в целом, оптимальное соотношение (с точки зрения эффективности реакции, выражающейся в минимизации избытка непрореагировавшего белка или полимера) может определяться молекуляр-

ной массой выбранного полиэтиленгликоля и количеством доступных реакционноспособных групп. По отношению к молекулярной массе обычно чем выше молекулярная масса полимера, тем меньше число молекул полимера, которые могут быть присоединены к белку. Аналогично, ветвление полимера должно быть принято во внимание при оптимизации этих параметров. Обычно, чем выше молекулярная масса (или больше ветвей), тем выше отношение полимер:белок.

В настоящем описании применительно к конъюгатам ПЭГ:полипептид релаксина термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое дает желаемую пользу пациенту. Это количество будет различаться для разных субъектов, будет зависеть от ряда факторов, включая общее физическое состояние пациента и основную причину состояния, которое лечат. Количество полипептида релаксина, используемое для терапии, дает приемлемую скорость изменения и сохраняет желаемый ответ на выгодном уровне. Терапевтически эффективное количество композиции согласно настоящему изобретению может быть легко определено специалистом с использованием общедоступных материалов и процедур.

Водорастворимый полимер может быть в любой структурной форме, включая, но не ограничиваясь перечисленным, линейный, двоящийся или разветвленный. Как правило, водорастворимый полимер представляет собой полиалкиленгликоль, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), но также можно применять другие водорастворимые полимеры. Так, например, ПЭГ использован для описания некоторых вариантов осуществления данного изобретения.

ПЭГ является хорошо известным водорастворимым полимером, его можно приобрести, получить путем полимеризации этиленгликоля с раскрытием кольца способами, известными специалистам в данной области (Sandier and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Термин "ПЭГ" используется в широком смысле, он охватывает любую молекулу полиэтиленгликоля, независимо от размера или модификации конца ПЭГ, и в форме, связанной с релаксином, может быть представлен следующей формулой:



где $n =$ от 2 до 10 000, X представляет собой H или концевую модификацию, C_{1-4} алкил, защитную группу или концевую функциональную группу, но не ограничиваясь ими. В некоторых случаях ПЭГ, используемый в изобретении, заканчивается на одном конце гидроксигруппой, т.е. X является H или CH_3 (метокси-ПЭГ). Кроме того, ПЭГ может заканчиваться реактивной группой, полимером и в этом случае является бифункциональным полимером. Типичные реактивные группы могут включать реактивные группы, которые обычно используются для взаимодействия с функциональными группами, присутствующими в 20 обычных аминокислотах (включая, но не ограничиваясь группами малеимида группы, активированными карбонатами (включая р-нитрофенил эфир, но не ограничиваясь им), активированные сложные эфиры (включая, но не ограничиваясь перечисленными, N-гидроксисукцинимид, р-нитрофенил эфир) и альдегиды), а также функциональные группы, которые являются инертными по отношению к 20 известным аминокислотам, но могут специфически реагировать с дополнительными функциональными группами, присутствующими в не кодируемых в природных условиях аминокислотах (включая, но не ограничиваясь перечисленными, азидные группы, алкиновые группы). Следует отметить, что другой конец ПЭГ, который показан в приведенной выше формуле Y, будет прямо или опосредованно связан с полипептидом релаксина через природные или не кодируемые в природных условиях аминокислоты. Например, Y может быть амидной, карбаматной или мочевиной связью с аминогруппой (включая, но не ограничиваясь перечисленными, эпсилон-амино лизина или N-конца) полипептида. Кроме того, Y может быть малеимидной связью с тиоловой группой (включая, но не ограничиваясь перечисленными: тиоловую группу цистеина). В альтернативном варианте Y может быть связан с остатком, обычно не доступным в 20 обычных аминокислотах. Например, азидная группа в ПЭГ может взаимодействовать с алкиновой группой полипептида релаксина с образованием продукта Гуисгена [3+2] циклоприсоединения. В альтернативном варианте алкиновая группа в ПЭГ может взаимодействовать с азидной группой, присутствующей в не кодируемых в природных условиях аминокислотах, с образованием аналогичного продукта. В некоторых вариантах осуществления сильный нуклеофил (включая, но не ограничиваясь перечисленными, гидразин, гидразид, гидроксилламин, семикарбазид) может вступать в реакцию с альдегидной или кетонной группой, присутствующей в не кодируемой в природных условиях аминокислоте для формирования гидразона, оксима или семикарбазона, когда это применимо, которая в некоторых случаях может быть редуцирована при использовании с соответствующим восстановителем. В альтернативном варианте сильный нуклеофил может быть введен в полипептид релаксина через не кодируемые в природных условиях аминокислоты и использован для обеспечения предпочтительного взаимодействия с кетонной или альдегидной группой, присутствующей в водорастворимом полимере.

По существу, любая желаемая молекулярная масса ПЭГ может быть использована включая, но не ограничиваясь перечисленным, от приблизительно 100 до 100 000 Да или более по желанию (включая, но не ограничиваясь перечисленными, иногда 0,1-50 кДа или 10-40 кДа). Молекулярная масса ПЭГ может варьировать в широком диапазоне, включая, но не ограничиваясь перечисленными, от приблизительно 100 и до приблизительно 100000 Да или более. ПЭГ может составлять от приблизительно 100 до приблизительно 100000 Да, включая, но не ограничиваясь перечисленными значениями, 100000, 95000, 90000,

85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах осуществления масса ПЭГ составляет от приблизительно 100 и до приблизительно 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления масса ПЭГ составляет от приблизительно 100 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления масса ПЭГ составляет от приблизительно 1000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления масса ПЭГ составляет от приблизительно 5000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления масса ПЭГ составляет от приблизительно 10000 и до приблизительно 40000 Да. ПЭГ с разветвленной цепью, включая, но не ограничиваясь молекулами ПЭГ с цепью, имеющей ММ 1-100 кДа (включая, но не ограничиваясь перечисленными, 1-50 кДа или 5-20 кДа), также могут быть использованы. Молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью может составлять от приблизительно 1000 до приблизительно 100000 Да или более, но не ограничивается приведенными значениями. Молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью может составлять от приблизительно 1000 и до приблизительно 100000 Да, включая, но не ограничиваясь приведенными значениями, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью составляет от приблизительно 1000 и до приблизительно 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью составляет от приблизительно 1000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью составляет от приблизительно 5000 и до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью составляет от приблизительно 5000 и до приблизительно 20000 Да. Широкий спектр молекул ПЭГ описан среди прочих источников в каталоге Shearwater Polymers, каталоге Inc, каталоге Nektar Therapeutics, которые включены в настоящее описание путем ссылки.

Обычно по меньшей мере один конец молекулы ПЭГ доступен для взаимодействия с не кодируемой в природных условиях аминокислотой. Например, производные ПЭГ, содержащие алкиновые и азидные группы для реакции с боковыми цепями аминокислот, могут быть использованы для присоединения ПЭГ к не кодируемому в природных условиях аминокислотам согласно настоящему описанию. Если не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит азид, то ПЭГ обычно содержит либо алкиновую группу, что обеспечивает возможность формирования [3+2] продукта циклоприсоединения или активированного ПЭГ (например, сложные эфиры, карбонат), либо фосфиновую группу, которая обеспечивает возможность образования амидной связи. В альтернативном варианте, если не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит алкины, то ПЭГ обычно содержит азидную группу, что обеспечивает возможность образования [3+2] продукта циклоприсоединения по Гуйсгену. Если не кодируемая в природных условиях аминокислота содержит карбонильную группу, ПЭГ обычно содержит мощный нуклеофил (включая, но не ограничиваясь перечисленными, гидразид, гидразин, гидроксилламин или семикарбазидную функциональности), что обеспечивает возможность образования соответствующей гидразонной, оксимной и семикарбазонной связи соответственно. В других альтернативах может быть использована обратная ориентация реактивных групп, описанных выше, например азидный остаток в не кодируемой в природных условиях аминокислоте может вступать в реакцию с производным ПЭГ, содержащим алкин.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида релаксина с производным ПЭГ содержит химическую функциональную группу, реагирует с химической функциональной группой, присутствующей на боковой цепи не кодируемой в природных условиях аминокислоты.

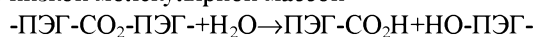
В некоторых вариантах осуществления азид- и ацетиленсодержащие производные полимера содержат водорастворимые цепи полимера, имеющие среднюю молекулярную массу от приблизительно 800 до примерно 100000 Да. Основой водорастворимого полимера может быть полиэтиленгликоль. Тем не менее, следует понимать, что широкий спектр водорастворимых полимеров, включая полиэтиленгликоли и другие соответствующие полимеры, но не ограничиваясь ими, в том числе поли(декстран) и полипропиленгликоль также подходят для осуществления настоящего изобретения, и что термины ПЭГ или полиэтиленгликоль охватывают и включают все такие молекулы. Термин ПЭГ включает полиэтиленгликоль в любых его формах, в том числе бифункциональный ПЭГ, звездчатый ПЭГ, производные ПЭГ, ПЭГ раздвоенный, разветвленный ПЭГ, ПЭГ с боковыми группами (т.е. ПЭГ или аналогичные полимеры, содержащие одну или несколько функциональных групп, прикрепленных к остову полимера) или ПЭГ, содержащий разрушаемые связи, но не ограничивается перечисленными.

ПЭГ обычно прозрачен, бесцветен, не имеет запаха, растворим в воде, устойчив к нагреванию, инертен по отношению ко многим химическим веществам, не гидролизуются и не разрушаются и обычно не токсичен. Полиэтиленгликоль считается биосовместимым, т.е. ПЭГ способен существовать совместно с живыми тканями или организмами, не причиняя им вреда. В частности, ПЭГ, по существу, не иммуногенен, т.е. ПЭГ обычно не вызывает иммунный ответ в организме. При присоединении к молекуле, выполняющей некоторые желательные функции в организме, такой как биологически активное вещество, ПЭГ обычно маскирует этот агент и может уменьшить или устранить любой иммунный ответ, благодаря

чему организм будет проявлять толерантность в отношении присутствия данного агента. ПЭГ-содержащие конъюгаты обычно не вызывают существенного иммунного ответа, не вызывают свертывания или других нежелательных эффектов ПЭГ, имеющий формулу $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, где n от приблизительно 3 до примерно 4000, обычно от приблизительно 20 до приблизительно 2000, можно использовать в настоящем изобретении. ПЭГ, имеющий молекулярную массу от приблизительно 800 до приблизительно 100000 Да, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения особенно предпочтителен в качестве основной полимерной цепи. Молекулярная масса ПЭГ может варьировать в широких пределах, включая следующие значения, но не ограничиваясь ими, от приблизительно 100 до приблизительно 100000 Да или более. Молекулярная масса ПЭГ может составлять от 100 до приблизительно 100000 Да, включая следующие значения, но не ограничиваясь ими, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 100 до приблизительно 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 100 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 1000 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 5000 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса ПЭГ составляет от приблизительно 10000 до приблизительно 40000 Да. Цепи полимера могут быть линейными или разветвленными. Разветвленные магистральные полимеры широко известны в данной области, обычно разветвленный полимер имеет центральную часть, основную ветвь и множество линейных полимерных цепей, связанных с основной центральной ветвью. ПЭГ обычно используется в разветвленной форме, которая может быть получена путем добавления этилена оксида к различным полиолам, таким как глицерин, олигомеры глицерина, пентаэритрит и сорбит. Центральная ветвь может также быть получена из нескольких аминокислот, таких как лизин. Разветвленные полиэтиленгликоли могут быть представлены в общем виде: $\text{R}-(\text{ПЭГ}-\text{ОН})_m$, в котором R является производным основной части, такой как глицерин, олигомеры глицерина или пентаэритриол, а m представляет собой количество фрагментов. Мультифрагментные ПЭГ молекулы, такие как описанные в патентах США №№ 5932462, 5643575, 5229490, 4289872, патентных заявках US 2003/0143596, WO 96/21469 и WO 93/21259, каждая из которых включена в настоящее описание путем ссылки в полном объеме, также могут быть использованы в качестве основной полимерной цепи. Разветвленный ПЭГ может также иметь форму раздваивающегося ПЭГ, представленного формулой $\text{ПЭГ}(-\text{YCHZ}_2)_n$, где Y является связывающей группой и Z является активированной концевой группой, связанной с СН цепью атомов определенной длины.

Еще одна разветвленная форма ПЭГ с боковыми группами имеет реактивные группы, такие как карбоксильные, расположенные по длине полиэтиленгликолевого остова, а не в конце цепи ПЭГ.

В дополнение к этим формам ПЭГ также может быть получен полимер со слабыми или раслагаемыми связями в скелете. Например, могут быть получены ПЭГ с эфирной связью в основной цепи полимера, которая подвергается гидролизу. Как показано ниже, этот гидролиз приводит к расщеплению полимера на фрагменты с более низкой молекулярной массой



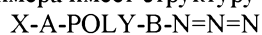
Для специалиста понятно, что термин полиэтиленгликоль или ПЭГ представляет или включает в себя все формы, известные в данной области, включая описанные в данном документе, но не ограничиваясь ими.

Многие другие полимеры также пригодны для применения в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления полимерные остовы, которые являются водорастворимыми и имеют от 2 до приблизительно 300 концов, особенно пригодны для целей настоящего изобретения. Примеры подходящих полимеров включают, но не ограничиваются перечисленным, другие полиалкиленгликоли, такие как полипропиленгликоль (PPG), сополимеры (включая, но не ограничиваясь этим, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля), их терполимеры, их смеси и тому подобное, хотя молекулярный вес каждой цепи полимера может меняться, он обычно находится в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 100000 Да, часто от приблизительно 6000 до приблизительно 80000 Да. Молекулярная масса каждой цепи полимера может составлять от 100 до приблизительно 100000 Да, включая, но не ограничиваясь приведенными значениями, 100000, 95000, 90000, 85000, 80000, 75000, 70000, 65000, 60000, 55000, 50000, 45000, 40000, 35000, 30000, 25000, 20000, 15000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи полимера составляет от приблизительно 100 до приблизительно 50000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи полимера составляет от приблизительно 100 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи полимера составляет от приблизительно 1000 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи полимера составляет от приблизительно 5000 до приблизительно 40000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса каждой цепи полимера составляет от приблизительно 10000 до приблизительно 40000 Да.

Специалистам в данной области понятно, что приведенный выше перечень, по существу, водорастворимых остовов отнюдь не является исчерпывающим и имеет лишь иллюстративный характер, и что все полимерные материалы, имеющие свойства, описанные выше, рассматриваются как пригодные для использования в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения производные полимера "мульти-функциональны", это означает, что цепи полимера имеют не менее двух концов, возможно, до приблизительно 300 концов, функционализированных или активированных функциональной группой. Многофункциональные производные полимеров включают линейные полимеры с двумя концами, где каждый конец связан с функциональной группой, которые могут быть одинаковыми или разными, но не ограничиваются такими полимерами.

В одном варианте производное полимера имеет структуру



где $N=N=N$ представляет собой азидную группу;

В представляет собой связывающую группу, которая может присутствовать или отсутствовать;

POLY является водорастворимым неантигенным полимером;

А-связывающая группа, которая может присутствовать или отсутствовать, и которая может быть такой же, как В или другой,

Х является второй функциональной группой.

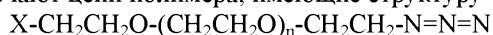
Примеры связывающих групп для А и В включают, но не ограничиваются перечисленными, многократно функционализированную алкильную группу, содержащую до 18, и возможно 1-10 атомов углерода. Гетероатомы, такие как азот, кислород и сера, содержатся в алкильной цепи. Алкильная цепь также может быть разветвленной по гетероатому. Другие примеры связывающей группы для А и В, включают, но не ограничиваются многократно функциональным арилом, содержащим до 10 и возможно 5-6 атомов углерода. Арильная группа может быть замещена одним и более атомами углерода, азота, кислорода или серы. Другие примеры подходящих связывающих групп включают связывающие группы, описанные в патенте США №№ 5932462, 5643575 и публикации заявки США 2003/0143596, каждая из которых включена в настоящее описание путем ссылки. Специалистам в данной области будет понятно, что приведенный выше перечень для связывающих групп отнюдь не является исчерпывающим и лишь носит иллюстративный характер, и что все связывающие группы, имеющие свойства, описанные выше, могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении. Примеры подходящих функциональных групп для использования в качестве Х включают приведенные ниже группы, но не ограничиваются ими, гидроксил, защищенную гидроксильную, алкокси-, активный эфир, такой как N-гидроксисукцинимидил эфир и 1-бензотриазолил эфиры, активный карбонат, такой как N-гидроксисукцинимидил карбонаты и 1-бензотриазолил карбонаты, ацеталь, альдегид, альдегид гидрат, алкенил, акрилат, метакрилат, акриламид, активный сульфон, амин, аминоксид, защищенный амин, гидразид, защищенный гидразид, защищенные тиол, карбоновые кислоты, защищенные карбоновые кислоты, изоцианат, изотиоцианат, малеимид, винилсульфон, дитиопиридином, винилпиридин, иодацетамид, эпоксидные группы, глиоксали, дионы, мезилаты, тозилаты, трезилаты, алкены, кетоны и азид. Для специалиста очевидно, что выбранная группа Х должен быть совместима с азидной группой, т.е. что реакция с азидной группой не происходит. Азидсодержащие производные полимеры могут быть гомобифункциональны, что означает, что вторая функциональная группа (например, Х) также представляет собой азидную группу или гетеробифункциональным, т.е. вторая функциональная группа представляет собой другую функциональную группу.

Термин "защищенный" означает присутствие защитной группы или фрагмента, который предотвращает реакцию химически активных функциональных групп в определенных условиях реакции. Защитная группа будет различной в зависимости от типа защищаемых химически активных групп. Например, если химически активные группы представляют собой амин или гидразид, защитная группа может быть выбрана из трет-бутилоксикарбонила (трет-Вос) и 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc). Если химически активные группы представляют собой тиол, защитная группа может представлять собой орто-пиримидилдисульфид. Если химически активные группы представляют собой карбоновые кислоты, такие как бутановая или пропионовая кислоты, или гидроксильные группы, защитная группа может представлять собой бензил или алкильную группу, такую как метил-, этил или трет-бутил. Другие защитные группы, известные в данной области, также могут быть использованы в настоящем изобретении.

Конкретные примеры концевых функциональных групп, описанные в литературе, включают, но не ограничиваются перечисленными, N-сукцинимидил карбонат (см., например, патенты США №№ 5281698, 5468478), амин (см., например, Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), гидразид (см., например, Andresz et al., Makromol. Chem. 179:301 (1978)), сукцинимидил пропионата и сукцинимидил бутаноат (см., например, Olson et al., В поли (этилен гликоль) Химия и биологические приложения, стр. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; см. также патент США № 5672662), сукцинимидил сукцинат (см., например, Abuchowski и др. Pак Biochem. Biophys. 7:175 (1984) и др. Jorppich. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), сукцинимидил эфир (см., например, патент США № 4670417), бензотриазол карбонат (см., например, патент США № 5650234), глицидиловый эфир (см., например, Pithaetal. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Bio-

chem. 13:354 (1991), оксикарбонилимидазол (см., например, Beauchamp et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al., J. Controlled Release 1:251 (1985)), р-нитрофенил карбонат (см., например, Veronese, et al., Appl. Biochem Biotech, 11:141 (1985); Sartore et al., Appl Biochem Biotech, 27:45 (1991)), альдегид (см., например, Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. ред. 22:341 (1984), патент США № 5824784, патент США № 5252714), малеимид (см., например, Goodson et al., Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani et al. в Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), и Kogan, Synthetic ComM. 22:2417 (1992)), ортопиридил-дисульфид (см., например, Woghiren, et al., Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), акрилол (см., например, Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), винилсульфон (см., например, патент США № 5900461). Все приведенные выше ссылки и патенты включены в настоящее описание путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения производные полимера согласно настоящему изобретению включают цепи полимера, имеющие структуру



где X представляет собой функциональную группу, как описано выше,

n равен от приблизительно 20 до приблизительно 4000.

В другом варианте осуществления производные полимеров согласно настоящему изобретению содержат полимерный скелет, имеющий структуру



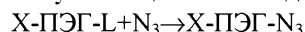
где W представляет собой алифатический или ароматический фрагмент, содержащий линкер из 1-10 атомов углерода;

n равен от приблизительно 20 до приблизительно 4000 и

X представляет собой функциональную группу, как описано выше,

m составляет от 1 до 10.

Азидсодержащие производные ПЭГ согласно настоящему изобретению могут быть получены различными способами, известными в данной области и/или описанными здесь. В одном из способов, показанных ниже, водорастворимые цепи полимера, имеющие среднюю молекулярную массу от приблизительно 800 до 100000 Да, цепи полимера, имеющего первый конец, связанный с первой функциональной группой, и второй конец, связанный с подходящей уходящей группой, взаимодействуют с катионом азид-да (который может работать в паре с любым из ряда подходящих противоионов, в том числе натрия, калия, трет-бутиламмония и т. д.). Уходящая группа претерпевает нуклеофильное замещение и заменяется азидным фрагментом, что обеспечивает получение целевого азидсодержащего полимера ПЭГ.



Как показано, подходящие цепи полимера для использования в настоящем изобретении имеют формулу X-ПЭГ-L, где ПЭГ является полиэтиленгликолем и X представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с азидной группой, L является подходящей уходящей группой. Примеры подходящих функциональных групп включают, но не ограничиваются перечисленными: гидроксил, защищенную гидроксильную группу, ацеталь, алкенил, аминов, аминоксид, защищенный амин, защищенный гидразид, защищенные тиол, карбоновые кислоты, защищенные карбоновые кислоты, малеимид, дитиопиридин, и винилпиридин и кетон. Примеры подходящих уходящих групп включают, но не ограничиваются перечисленными, хлор, бром, йод, мезилат, трезилат и тозилат.

В другом способе получения азидсодержащих производных полимеров согласно настоящему изобретению сшивающий агент, содержащий азидную функциональную группу, приводят в контакт водорастворимым остовом полимера, имеющим среднюю молекулярную массу от приблизительно 800 до приблизительно 100000 Да, причем сшивающий агент несет химическую функциональную группу, которая будет реагировать избирательно с химическими функциональными группами полимера ПЭГ с образованием азидсодержащего полимерного производного продукта, в котором азид отделен от основной цепи полимера связывающей группой.

Образцовая схема реакции приведена ниже.



где ПЭГ является полиэтиленгликолем, X является уходящей группой, такой как алкокси- или функциональные группы, как описано выше, и M представляет собой функциональную группу, которая не вступает в реакцию с азидной функциональной группой, но эффективно и избирательно реагирует с функциональной группой N.

Примеры подходящих функциональных групп включают, но не ограничиваются перечисленными, M - карбоновая кислота, карбонат или активный эфир, если N является амином, M - кетон, если N является гидразидом или аминоксид-фрагментом; и M будет уходящей группой, если N - нуклеофил.

Очистка сырого продукта может быть осуществлена с помощью известных способов, включающих осаждение продукта с последующей хроматографией, если это необходимо, но не ограничивающихся этими способами.

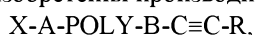
Более конкретный пример приведен ниже для случая ПЭГ диамина, в котором один из аминов защищен защитной группой, такой как трет-бутил-Вос, и получаемый в результате монозащищенный ПЭГ диамин взаимодействует с линкерным фрагментом, который несет азидную функциональную группу



В этом случае аминогруппа может быть связана с группой карбоновой кислоты с использованием различных активирующих агентов, таких как тионилхлорид или карбодиимид и N-гидроксисукцинимид или N-гидроксисбензотриазол, с образованием амидной связи между моноаминовым производным ПЭГ и азидсодержащим линкерным фрагментом. После успешного формирования амидной связи полученные N-трет-бутил-Вос-защищенные азидсодержащие производные могут быть использованы непосредственно для модификации биологически активных молекул или могут быть доработаны для встраивания других полезных функциональных групп. Например, N-t-Вос группу можно гидролизовать путем обработки сильной кислотой с получением омега-амино-ПЭГ-азида. Полученный таким образом амин может быть использован в качестве синтетической основы для присоединения других полезных функциональных групп, таких как малеимидные группы, активированные дисульфиды, активированные сложные эфиры и т.д. с получением гетеробифункциональных реагентов.

Гетеробифункциональные производные особенно полезны, когда желательно присоединить различные молекулы ко всем концам полимера. Например, омега-N-амино-N-азидоПЭГ позволяет присоединять молекулы с активированными электрофильными группами, такие как альдегиды, кетоны, активированный сложный эфир, активированный карбонат и так далее, к одному концу ПЭГ и молекулу, содержащую ацетиленовую группу, к другому концу ПЭГ.

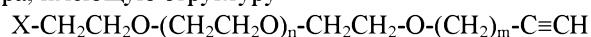
В другом варианте осуществления изобретения производное полимера имеет структуру



где R может представлять собой H или алкил, алкен, алкокси, или арил, или замещенный арил; B представляет собой связывающую группу, которая может присутствовать или отсутствовать; POLY является водорастворимым неантигенным полимером; A - связывающая группа, которая может присутствовать или отсутствовать, и которая может быть такой же, как B или другой, и X является второй функциональной группой.

Примеры связывающих групп для A и B, включают, но не ограничиваются перечисленными, многократно функционализированная алкильная группа, содержащая до 18 и возможно 1-10 атомов углерода. Гетероатомы, такие как азот, кислород и сера, могут быть включены в алкильную цепь. Алкильная цепь также может быть разветвленной по гетероатому. Другие примеры связывающих групп для A и B включают, но не ограничиваются, многократно функционализированный арил, содержащий до 10, возможно, 5-6 атомов углерода. Арильная группа может быть замещена одним и более атомами углерода, азота, кислорода или серы. Другие примеры подходящих связывающих групп включают связывающие группы, описанные в патенте США №№ 5932462 и 5643575 и в патенте патентной публикации США 2003/0143596, каждый из которых включен в настоящее описание путем ссылки. Специалистам в данной области будет понятно, что приведенный выше перечень связывающих групп отнюдь не является исчерпывающим и предназначен только для иллюстрации, и разнообразные связывающие группы, имеющие свойства, описанных выше, могут быть использованы в настоящем изобретении.

Примеры подходящих функциональных групп для использования в качестве X включают гидроксил, защищенную гидроксильную группу, алкокси, активный эфир, такой как N-гидроксисукцинимидил эфир и 1-бензотриазолил эфиры, активный карбонат, такой как N-гидроксисукцинимидил карбонатов и 1-бензотриазолил карбонат, ацеталь, альдегид, гидратов, алкенил, акрилата, метакрилата, акриламида, активный сульфен, амин, аминоксид, защищенный амин, гидразид, защищенные гидразиды, защищенные тиолы, карбоновые кислоты, защищенные карбоновые кислоты, изоцианаты, изотиоцианат, малеимид, винилсульфон, дитиопиридином, винилпиридин, иодацетамида, эпоксидные, глиоксальные, дионы, мезилаты, тозилаты и трезилат, алкен, кетон и ацетилен. Следует понимать, что выбранный фрагмент X должен быть совместим с ацетиленовой группой, т.е. реакция с ацетиленовой группой не происходит. Ацетиленсодержащие полимерные производные могут быть гомобифункциональными, это означает, что вторая функциональная группа (например, X) также является ацетиленовым фрагментом, или гетеробифункциональными, это означает, что вторая функциональная группа представляет собой другую функциональную группу. В другом воплощении настоящего изобретения производные полимера составляют основу полимера, имеющую структуру

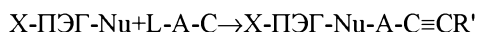


где X представляет собой функциональную группу, как описано выше, n составляет примерно от 20 до примерно 4000 и m составляет от 1 до 10.

Конкретные примеры каждого из гетеробифункциональных полимеров ПЭГ приведены ниже.

Ацетиленсодержащие производные ПЭГ изобретения могут быть получены с использованием способов, известных специалистам в данной области, и/или согласно настоящему описанию. В одном способе водорастворимые цепи полимера, имеющие среднюю молекулярную массу от приблизительно 800 до приблизительно 100000 Да, где один конец полимера связан с первой функциональной группой, а второй конец связан с подходящей нуклеофильной группой, взаимодействует с соединением, которое несет как функциональную группу ацетилена, так и уходящую группу, которая подходит для реакции с нуклеофильными группами на ПЭГ. Когда полимер ПЭГ, несущий нуклеофильную группу, и молекулу, несущую

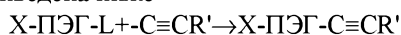
щую уходящую группу, приводят в контакт, уходящая группа претерпевает нуклеофильное замещение и заменяется нуклеофильной частью, в результате чего образуется желаемый ацетиленсодержащий полимер.



Как показано, предпочтительные цепи полимера для использования в реакции имеют формулу X-ПЭГ-Nu, где ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль, Nu является нуклеофильным фрагментом и X представляет собой функциональную группу, которая не вступает в реакцию с Nu, L или ацетиленовой функциональной группой. Примеры Nu включают, но не ограничиваются перечисленными, амины, алкокси, арилокси, сульфидрильные, имино, карбоксилат, гидразид, аминоксигруппы, которые реагируют в основном механизме по SN2-типа. Дополнительные примеры групп Nu включают функциональные группы, которые будут реагировать в первую очередь по механизму реакции нуклеофильного присоединения. Примеры группы L включают хлор, бром, йод, мезилат, трезилат, тозилат и другие группы, которые, как ожидается, подвергнутся нуклеофильному замещению, а также кетоны, альдегиды, тиоэфиры, олефины, альфа-бета-ненасыщенные карбонильные группы, карбонаты и другие электрофильные группы, которые как ожидается будут присоединены нуклеофилами. В другом варианте осуществления настоящего изобретения A является алифатическим линкером, содержащим 1-10 атомов углерода, или замещенным арильным кольцом, содержащим 6-14 атомов углерода. X представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с азидной группой, и L представляет собой подходящую уходящую группу.

В другом способе получения ацетиленсодержащего производного полимера изобретения ПЭГ полимер, имеющий среднюю молекулярную массу от приблизительно 800 до примерно 100000 Да, сочлененный с либо защищенной функциональной группой или замыкающим агентом на одном конце и подходящей уходящей группой на другом конце связывается посредством ацетилена аниона.

Образцовая схема реакции приведена ниже



где ПЭГ является полиэтиленгликоль и X является замыкающей группой, такой как алкокси или функциональной группой, как описано выше, и

R' является либо H, алкил, алкокси, арил или арилоксигруппой или замещенный алкил, алкокси, арил или арилоксигруппой.

В приведенном выше примере, уходящая группа L должно быть достаточно активной для прохождения SN2-типа замещения при контакте с достаточной концентрацией ацетилена аниона. Условия реакции, необходимые для выполнения SN2 замещения уходящей группы посредством ацетилена аниона, известны специалистам в данной области.

Очистка сырого продукта, обычно осуществляется способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленными: осаждения продукта с последующей хроматографией, если это необходимо.

Водорастворимые полимеры могут быть связаны с полипептидами релаксина согласно настоящему изобретению. Водорастворимые полимеры могут быть присоединены через не кодируемые в природных условиях аминокислоты, встроенные в полипептид релаксина, или любую функциональную группу или заместитель природной или не кодируемой в природных условиях аминокислоты, или любую функциональную группу или заместитель, присоединенный к кодируемой в природных условиях или кодируемой в природных условиях аминокислоте. В альтернативном варианте водорастворимые полимеры связаны с полипептидом релаксина, включающим не кодируемые в природных условиях аминокислоты, с помощью природных аминокислот (включая, но не ограничиваясь перечисленными, цистеин, лизин или аминогруппа N-концевого остатка). В некоторых случаях полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 неприродных аминокислот, причем одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот связаны с водорастворимым полимером(ами) (включая, но не ограничиваясь перечисленными, ПЭГ и/или олигосахариды). В некоторых случаях полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению дополнительно включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более кодируемых в природных условиях аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. В некоторых случаях полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению включают одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, связанных с водорастворимым полимером, и одну или более природных аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления водорастворимые полимеры, используемые в настоящем изобретении, повышают период полужизни полипептида релаксина в сыворотке крови по отношению к неконоъюгированной форме.

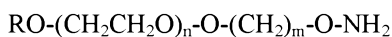
Количество водорастворимых полимеров, связанных с полипептидом релаксина (например, степень пегилирования или гликозилирования), согласно настоящему изобретению может быть скорректировано для обеспечения изменения (включая увеличение или уменьшение, но не ограничиваясь ими) фармакологических, фармакокинетических или фармакодинамических характеристик, таких как время полужизни *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления время полужизни релаксина увеличивается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, в 2 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в

11 раз, в 12 раз, в 13 раз, в 14 раз, в 15 раз, в 16 раз, в 17 раз, в 18 раз, в 19 раз, в 20 раз, в 25 раз, в 30 раз, в 35 раз, в 40 раз, в 50 раз или по меньшей мере приблизительно в 100 раз относительно немодифицированного полипептида.

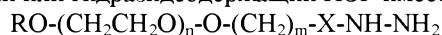
Производные ПЭГ, содержащие сильные нуклеофильные группы (то есть гидразид, гидразин, гидроксилламин или семикарбазид).

В одном из вариантов реализации изобретения полипептид релаксина, содержащий карбонилсодержащие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, модифицирован производным ПЭГ, которое содержит концевой гидразин, гидроксилламин, гидразид или семикарбазидфрагменты, которые непосредственно связаны с остовом ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления модифицированной на конце гидроксилламином производное ПЭГ имеет структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса имеет массу 5-40 кДа). В некоторых вариантах осуществления производное гидразин или гидразидсодержащий ПЭГ имеет структуру



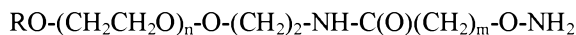
где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000 и X необязательно является карбонильной группой (C=O), которая может присутствовать или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления семикарбазидсодержащее производное ПЭГ имеет структуру

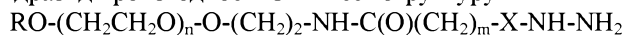


где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий карбонилсодержащие аминокислоты, модифицирован производным ПЭГ, которое содержит концевую гидроксилламинную, гидразидную, гидразинную или семикарбазидную группу, которая связана с остовом ПЭГ амидной связью. В некоторых вариантах осуществления содержащие на конце гидроксилламин производные ПЭГ имеют структуру

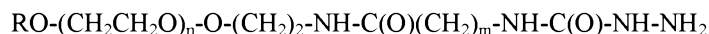


где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5-40 кДа). В некоторых вариантах содержащее гидразин или гидразид производное ПЭГ имеет структуру



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

В некоторых вариантах осуществления семикарбазидсодержащие производные ПЭГ имеют структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000.

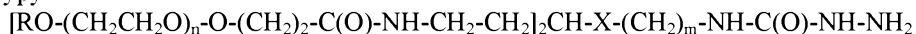
В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий карбонилсодержащие аминокислоты, модифицирован разветвленным производным ПЭГ, которое содержит концевую группу гидразина, гидроксилламина, гидразида или семикарбазида, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ имеет MM, начиная от 10-40 кДа и, возможно, 5-20 кДа.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий не кодируемые в природных условиях аминокислоты, модифицирован производным ПЭГ, имеющим разветвленную структуру. Например, в некоторых вариантах осуществления содержащее на конце гидразин или гидразид производное ПЭГ имеет следующую структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10, n составляет 100-1000, а X возможно представляет собой карбонильную группу (C=O), которая может присутствовать или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления производное ПЭГ, содержащее семикарбазидную группу, имеет структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), X необязательно представляет собой NH, O, S, C(O) или отсутствует, m составляет 2-10 и n составляет 100-1000.

В некоторых вариантах осуществления производные ПЭГ, содержащие группу гидроксилламина, имеют структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), X возможно представляет собой NH, O, S, C(O) или отсутствует, m составляет 2-10, n составляет 100-1000.

Степени и сайты, в которых водорастворимый полимер(ы) связан с полипептидом релаксина, могут изменять связывание полипептида релаксина с рецептором полипептида релаксина. В некоторых вариантах осуществления связи расположены так, что полипептид релаксина связывается с рецептором полипептида релаксина с Kd приблизительно 400 нМ или ниже, с Kd 150 нМ и ниже, а в некоторых случаях с Kd 100 нМ или ниже, измеренной в равновесном анализе связывания, таком, как описано в Spencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988).

Методы и химические материалы для активации полимеров, а также для присоединения пептидов, описаны в литературе и известны в данной области. Часто используемые способы для активации полимеров включают, но не ограничиваются перечисленными, активацию функциональных групп цианогенбромидом, периодатом, глутаральдегидом, биэпоксидами, эпихлоргидрином, дивинилсульфоном, карбодимидом, сульфонилалогенидами, трихлортриазином и т.д. (см., R.F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILIZATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, NY.; 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, NY.; Dunn, R.L., et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Существует несколько обзоров и монографий по функционализации и конъюгации ПЭГ. См., например, Hams, 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).

Способы активации полимеров также описаны в WO 94/17039, патенте США № 5324844, WO 94/18247, WO 94/04193, патенте США № 5219564, патенте США № 5122614, WO 90/13540, патенте США № 5281698 и WO 93/15189, информацию о конъюгировании активированными полимерами и ферментами, включая фактор свертывания крови VIII (WO 94/15625), гемоглобин (WO 94/09027), молекулы, переносящие кислород (патент США № 4412989), рибонуклеазу и супероксиддисмутазу (Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)), но не ограничиваясь ими. Все цитируемые источники и патенты включены в настоящее описание путем ссылки.

Пегилирование (например, добавление любого водорастворимого полимера) полипептида релаксина, содержащего не кодируемые в природных условиях аминокислоты, такие как p-азидо-L-фенилаланин, осуществляют любым пригодным способом. Например, полипептид релаксина пегилируют содержащим концевой алкин производным мПЭГ. Вкратце, избыток твердого мПЭГ (5000)-O-CH₂-C≡N добавляют при перемешивании в водный раствор p-азидо-L-Phe-содержащего полипептида релаксина при комнатной температуре. Как правило, водный раствор буферизуют буфером, имеющим значение pKa, близкое к pH, при котором осуществляют реакцию (как правило, pH 4-10). Примеры подходящих буферов для пегилирования при pH 7,5, например включают, но не ограничиваются перечисленными, HEPES, фосфатный, боратный, Трис-HCl, EPPS и ТЭС буферы. pH непрерывно контролируется и корректируется в случае необходимости. Реакцию, обычно осуществляют в течение примерно 1-48 ч. Продукты реакции затем подвергают хроматографии гидрофобного взаимодействия для отделения пегилированных вариантов полипептида релаксина полипептидных от свободного мПЭГ (5000)-O-CH₂-C≡N и любых высокомолекулярных комплексов пегилированного полипептида релаксина, которые могут образоваться при активации а разблокированного ПЭГ на обоих концах молекулы, что приводит к поперечному сшиванию вариантных молекул полипептида релаксина. Условия во время хроматографии гидрофобного взаимодействия таковы, что свободный мПЭГ (5000)-O-CH₂-C≡N проходит через колонку, а любой вариантный сшитый комплекс пегилированного полипептида релаксина элюирует после целевых форм, которые содержат одну молекулу варианта полипептида релаксина варианта, связанную с одной или несколькими группами ПЭГ. Подходящие условия варьируют в зависимости от относительных размеров поперечно-сшитых комплексов по отношению к желаемому конъюгату и легко определяются специалистами в данной области. Элюент, содержащий целевой конъюгат, концентрируют ультрафильтрацией и обессоливают диализацией.

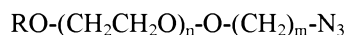
Если необходимо, пегилированный полипептид релаксина, полученный после гидрофобной хроматографии, может быть очищен с использованием одной или более процедур, известных специалистам в данной области техники, включая аффинную хроматографию; анион- или катионообменную хроматографию (с использованием, в том числе, но не ограничиваясь, DEAE Sepharose); хроматографию на двуокиси кремния; обращенно-фазовую ВЭЖХ, гель-фильтрацию (с использованием, в том числе, но не ограничиваясь, сефадекса G-75); гидрофобную хроматографию, гель-хроматографию, металло-хелатную хроматографию; ультрафильтрацию/диализацию; осаждение этанолом, осаждение сульфатом аммония; хроматофокусирование, вытеснительную хроматографию; электрофоретические процедуры (включая, но не ограничиваясь препаративной изоэлектрической фокусировкой), дифференциальную растворимость (включая, но не ограничиваясь осаждением сульфатом аммония) или экстракцию, но не ограни-

чиваясь перечисленными. Молекулярная масса может быть оценена методом гель-проникающей хроматографии по сравнению со стандартами глобулярных белков (Preneta, AZ in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). Чистота конъюгата релаксин-ПЭГ может быть оценена протеолитическим разрушением (включая расщепление трипсином, но не ограничиваясь) с последующим масс-спектрометрическим анализом. Pepinsky RB., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3): 1059-66 (2001).

Водорастворимый полимер, связанный с аминокислотой полипептида релаксина согласно настоящему изобретению, может быть дополнительно дериватизирован или замещен без ограничений.

Азидсодержащие производные ПЭГ.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина модифицированный производным ПЭГ, которое содержит азидную группу, которая будет реагировать с алкиновой группой, присутствующей в боковой цепи не кодируемой в природных условиях аминокислоты. Обычно производные ПЭГ будут иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне от 1-100 кДа, в некоторых вариантах от 10-40 кДа. В некоторых вариантах осуществления содержащее на конце азид ПЭГ производное имеет структуру

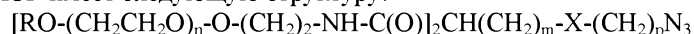


где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10 и n составляет 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5-40 кДа). В другом воплощении азид-концевое ПЭГ производное имеет структуру



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m=2-10, p=2-10 и n=100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5-40 кДа).

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий алкинсодержащую аминокислоту, модифицированную с разветвленным производным ПЭГ, который содержит фрагмент терминального азиды, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ имеет ММ в диапазоне 10-40 кДа и может составлять 5-20 кДа. Например, в некоторых вариантах осуществления содержащее на конце азид производной ПЭГ имеет следующую структуру:

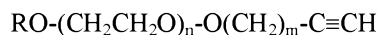


где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m=2-10, p=2-10 и n=100-1000, а X возможно представляет собой O, N, S или карбонильную группу (C=O), в каждом случае, и может присутствовать или отсутствовать.

Алкинсодержащие производные ПЭГ.

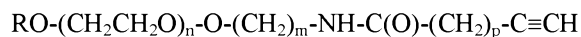
В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид релаксина модифицирован производным ПЭГ, которое содержит алкиновую группу, которая вступает в реакцию с азидной группой, присутствующей в боковой цепи не кодируемой в природных условиях аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления содержащее на конце алкин производное ПЭГ имеет следующую структуру:



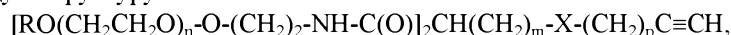
где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m составляет 2-10, и n=100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5-40 кДа). В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий алкинсодержащие не кодируемые в природных условиях аминокислоты, модифицирован производным ПЭГ, которое содержит концевую азидную или алкиновую группу, которая связана со скелетом ПЭГ амидной связью.

В некоторых вариантах осуществления содержащее концевой алкин производное ПЭГ имеет следующую структуру:



где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m=2-10, p=2-10 и n=100-1000.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина, содержащий азидсодержащую аминокислоту, модифицирован разветвленным производным ПЭГ, которое содержит концевую алкиновую группу, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ имеет ММ в диапазоне 10-40 кДа, возможно 5-20 кДа, например, в некоторых вариантах осуществления, содержащее концевой алкин, производное ПЭГ имеет следующую структуру:



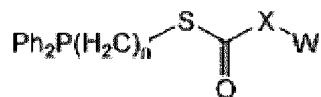
где R представляет собой простой алкил (метил-, этил-, пропил и т.д.), m=2-10, p=2-10, и n=100-1000, а X возможно представляет собой O, N, S или карбонильную группу (C=O), или не присутствует.

Фосфинсодержащие производные ПЭГ.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид релаксина модифицирован производным ПЭГ, которое содержит активированную функциональную группу (включая, но не ограничиваясь перечисленными, эфир, карбонат), дополнительно содержащую группу арилфосфина, которая будет реагировать с азидной группой, присутствующей на боковой цепи не кодируемой в природных условиях

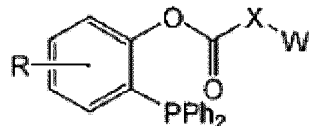
аминокислоты. Обычно производные ПЭГ имеют среднюю молекулярную массу в диапазоне от 1-100 кДа и, в некоторых вариантах от 10-40 кДа.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ производное имеет структуру



где $n=1-10$; X может быть O, N, S или отсутствует, Ph представляет собой фенил и W представляет собой водорастворимый полимер.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ производное имеет структуру



где X может представлять собой O, N, S или отсутствует, Ph представляет собой фенил, W является водорастворимым полимером и R может представлять собой H, алкил, замещенный алкил и замещенную арильную группу. Примеры групп R включают, но не ограничиваются перечисленными, $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, -галоген, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ и $-\text{NO}_2$, R' , R'' , R''' и R'''' независимо друг от друга обозначают водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный арил, включая, но не ограничиваясь перечисленными, арил, замещенный 1-3 галогенами, замещенный или незамещенный алкил, алкокси- или тиалкоксигруппы или ариалкильную группу. Если соединение согласно настоящему изобретению включает более одной группы R, например, каждая из групп R независимо выбрана, как каждая из групп R' , R'' , R''' и R'''' , если присутствует более одной группы. Когда R' и R'' присоединены к одному атому азота, они могут быть объединены с этим атомом азота с образованием 5-, 6- или 7-членных колец. Например, предполагается, что $-\text{NR}'\text{R}''$ включает, но не ограничивается перечисленными, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей специалисту в данной области техники будет понятно, что предполагается, что термин "алкил" включает группы, содержащие атомы углерода, связанные с группами, отличными от водородных групп, такими как галогеналкил (включая CF_3 и $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, но не ограничиваясь ими) и ацил (включая $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$, но не ограничиваясь ими и т.п.). Другие производные ПЭГ и основные методики пегирования. Другие примеры молекул ПЭГ, которые могут быть присоединены к полипептидам релаксина, а также способы пегирования включают, например, описанные в патентах США №№ 2004/0001838, 2002/0052009, 2003/0162949, 2004/0013637, 2003/0228274, 2003/0220447, 2003/0158333, 2003/0143596, 2003/0114647, 2003/0105275, 2003/0105224, 2003/0023023, 2002/0156047, 2002/0099133, 2002/0086939, 2002/0082345, 2002/0072573, 2002/0052430, 2002/0040076, 2002/0037949, 2002/0002250, 2001/0056171, 2001/0044526, 2001/0021763, патенте США № 6646110, 5824778, 5476653, 5219564, 5629384, 5736625, 4902502, 5281698, 5122614, 5473034, 5516673, 5382657, 6552167, 6610281, 6515100, 6461603, 6436386, 6214966, 5990237, 5900461, 5739208, 5672662, 5446090, 5808096, 5612460, 5324844, 5252714, 6420339, 6201072, 6451346, 6306821, 5559213, 5747646, 5834594, 5849860, 5980948, 6004573, 6129912, WO 97/32607, EP 229108, EP 402378, 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 921131, WO 98/05363, EP 809996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605963, EP 510356, EP 400472, EP 183503 и EP 154316, которые включены в настоящее описание путем ссылки, но не ограничиваются ими. Любая из молекул ПЭГ, описанных здесь, может быть использована в любой форме, включая, однопечочную, разветвленную, звездчатую цепь, однофункциональную, бифункциональную, многофункциональную или любую их комбинацию.

Дополнительные полимеры и производные полиэтиленгликоля (ПЭГ), включая гидроксилamina аминоксиды) производные ПЭГ, но не ограничиваясь ими, описаны в следующих заявках на патент, каждая из которых полностью включена в настоящее описание путем ссылки: публикация патента США № 2006/0194256, публикация патента США № 2006/0217532, публикация патента США № 2006/0217289, предварительная заявка на изобретение США № 60/755338; предварительная заявка на изобретение США № 60/755711; предварительная заявка на изобретение США № 60/755018; международная заявка на патент № PCT/US 06/49397; WO 2006/069246; предварительная заявка на изобретение США № 60/743041; предварительная заявка на изобретение США № 60/743040; международная заявка на патент № PCT/US 06/47822; предварительная заявка на изобретение США № 60/882819; предварительная заявка на изобретение США № 60/882500 и предварительное описание изобретения США № 60/870594.

Гетерологичные Fc-содержащие гибридные белки.

Соединения релаксина, описанные выше, могут быть соединены непосредственно или через пептидный линкер с Fc-участком иммуноглобулина. Иммуноглобулины являются молекулами, содержащими полипептидные цепочки, удерживаемые вместе дисульфидными связями, обычно включающими две

легкие цепи и две тяжелые цепи. В каждой цепочке один домен (V) имеет вариабельную аминокислотную последовательность, зависящую от специфичности молекулы антитела. Другие домены (C) имеют более постоянную последовательность, обычную для молекул подобного класса.

В контексте данного изобретения Fc-фрагмент иммуноглобулина имеет значение, широко принятое в области иммунологии. В частности, этот термин относится к фрагменту антитела, который получается в результате удаления из антитела двух антигенсвязывающих областей (Fab-фрагменты). Один из способов удаления Fab-фрагментов состоит в расщеплении иммуноглобулина папаинпротеазой. Таким образом, Fc-фрагмент состоит из примерно одинаковых по размеру фрагментов константных областей обеих тяжелых цепей, которые соединяются нековалентными взаимодействиями и дисульфидными связями. Fc-фрагмент может включать шарнирные области и включать домены CH_2 и CH_3 до C-конца антитела. Примеры шарнирных областей для иммуноглобулинов человека и мыши можно найти в *Antibody Engineering, A Practical Guide*, Borrebaeck, C.A.K., ed., W.H. Freeman and Co., 1992. Принципы, изложенные в этом источнике, включены в настоящее описание путем ссылки. Fc-фрагмент может дополнительно включать один или более сайтов гликозилирования. Аминокислотные последовательности многочисленных примеров Fc-белков, содержащих шарнирную область, домены CH_2 и CH_3 и один сайт N-гликозилирования, хорошо известны в данной области.

Существует пять типов Fc-областей иммуноглобулина человека с различными эффекторными функциями и фармакокинетическими свойствами: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. IgG является наиболее распространенным иммуноглобулином в сыворотке. IgG также имеет самый длительный период полужизни в сыворотке из всех иммуноглобулинов (23 дня). В отличие от других иммуноглобулинов IgG эффективно рециркулирует после связывания с Fc-рецептором. Существует четыре подкласса IgG - G1, G2, G3 и G4, каждый из которых имеет различные эффекторные функции. G1, G2 и G3 могут связывать C1q и фиксировать комплемент, а G4 не может. Хотя G3 способен связывать C1q более эффективно, чем G1, G1 более эффективен в комплемент-направляемом лизисе клеток. G2 фиксирует комплемент очень неэффективно. Участок связывания C1q в IgG расположен в карбоксиконцевой области домена CH_2 .

Все подклассы IgG способны связываться с Fc-рецепторами (CD16, CD32, CD64), причем G1 и G3 являются более эффективными, чем G2 и G4. Область связывания IgG с Fc-рецептором образована остатками, находящимися как в шарнирной области, так и в карбоксиконцевой области домена CH_2 .

IgA может существовать как в мономерной, так и в димерной форме, удерживаемой J-цепью. IgA является вторым по распространенности Ig в сыворотке, однако его период полужизни составляет всего 6 дней. IgA имеет три эффекторные функции. Он связывается со специфичным рецептором IgA на макрофагах и эозинофилах, что приводит, соответственно, к фагоцитозу или дегрануляции. Он также может фиксировать комплемент по неизвестному альтернативному механизму.

IgM является либо пентамером, либо гексамером, обе формы удерживаются J-цепью. Период полужизни IgM в сыворотке составляет 5 дней. Он слабо связывается с C1q через сайт связывания, расположенный в домене CH_3 . Период полужизни IgD в сыворотке составляет 3 дня. Остается неизвестным, какие именно эффекторные функции присущи этому Ig. IgE является мономерным Ig, период его полужизни в сыворотке равен 2,5 дням. IgE связывается с двумя Fc-рецепторами, что приводит к дегрануляции, с последующим высвобождением провоспалительных агентов.

В зависимости от желательного эффекта *in vivo* гетерологичные гибридные белки согласно настоящему изобретению могут содержать любой изотип из описанных выше, или могут содержать мутированные Fc-области с измененными функциями связывания комплемента и/или Fc-рецептора. Таким образом, гетерологичные гибридные белки согласно настоящему изобретению могут содержать полный Fc-фрагмент иммуноглобулина, фрагменты Fc-части иммуноглобулина или их аналоги, соединенные в композицию бета-интерферона.

Гибридные белки согласно настоящему изобретению могут состоять из одноцепочечных белков или представлять собой мультицепочечные полипептиды. Могут быть получены два или более Fc-содержащих гибридных белка, взаимодействующих через дисульфидные связи, которые естественным образом образуются между Fc-фрагментами. Эти мультимеры могут быть гомогенными по соединению бета-интерферона, или могут содержать различные соединения бета-интерферона, соединенные на N-концах Fc-фрагмента гибридного белка.

Независимо от конечной структуры гибридного белка, Fc или Fc-подобные области могут служить для продления периода полужизни в плазме *in vivo* бета-интерферона, присоединенного на N-конце. В альтернативном варианте компонент бета-интерферона в составе гибридного белка должен сохранить по меньшей мере одну биологическую активность бета-интерферона. Увеличение периода полужизни при терапевтическом использовании или в циркулирующей крови может быть продемонстрировано с использованием способа, описанного здесь, или известного в данной области, при котором период полужизни гибридного белка сравнивают с периодом полужизни отдельно взятого соединения бета-интерферона. Биологическое действие может определяться методами *in vitro* и *in vivo*, известными в данной области.

Поскольку Fc-область IgG, полученная в результате протеолиза, имеет такой же период полужизни *in vitro*, что и интактная молекула IgG, а Fab-фрагменты быстро разлагаются, предполагается, что подходящая последовательность, отвечающая за продление периода полужизни, содержится в CH_2 и/или CH_3 .

Далее из литературы известно, что скорость катаболизма вариантов IgG, которые не связывают высоко-аффинные Fc-рецепторы или C1q, не отличается от скорости выведения гибридного немутантного антитела, что указывает на то, что катаболический участок отличается от участков, участвующих в связывании с Fc-рецепторами или C1q. [Wawrzynczak et al., (1992) *Molecular Immunology* 29:221]. Исследование методом сайт-направленного мутагенеза Fc-области мышиного IgG1 показало, что участок Fc-области IgG1, который отвечает за скорость катаболизма, расположен на границе доменов CH₂-CH₃. Fc-области могут быть модифицированы на катаболическом участке для оптимизации периода полужизни гибридных белков. Fc-область, используемая для гибридных белков согласно настоящему изобретению может быть получена из Fc-области IgG1 или IgG4 и может содержать как область CH₂, так и область CH₃, включая шарнирную область.

Гетерологичные гибридные белки, содержащие альбумин.

Релаксин, описанный здесь, может быть непосредственно или через пептидный линкер, водорастворимый полимер или пролекарственный линкер соединен с альбумином или аналогом, фрагментом или производным, альбумина. В общем случае белки альбумина, входящие в состав гибридных белков, согласно настоящему изобретению могут быть получены из альбумина, выделенного от любого организма, включая человека. Сывороточный альбумин человека (HSA) состоит из единственной негликозилированной полипептидной цепи из 585 аминокислот с молекулярной массой 66500, согласно расчету по формуле. Аминокислотная последовательность сывороточного альбумина человека известна [см. Meloun, et. al. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et. al. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; Minghetti, et. al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747, каждая ссылка настоящим упоминанием считается включенной в данную заявку]. Уже описано множество полиморфных вариантов, а также аналогов и фрагментов альбумина. [См. Weitkamp, et al., (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219]. Например, в EP 322094 описаны различные укороченные формы сывороточного альбумина человека. Некоторые из фрагментов сывороточного альбумина человека, включая HSA(1-373), HSAQ-388), HSAQ-389), HSA(1-369) и HSAQ-419), а также фрагменты между 1-369 и 1-419 описаны. В EP 399666 приведена информация о фрагментах альбумина, включающих HSAQ-177) и HSAQ-200), и фрагментах между HSAQ-177) и HSA(1-200). Понятно, что гетерологичные гибридные белки согласно настоящему изобретению включают композиции релаксина, которые соединены с любым белком альбумина, включая фрагменты, аналоги и производные, и такой гибридный белок является биологически активным и имеет более длительный период полужизни в плазме, чем соединение релаксина отдельно. Таким образом, альбуминовая часть гибридного белка не обязательно будет иметь период полужизни, равный периоду полужизни нативного альбумина человека. Известны или могут быть получены фрагменты, аналоги и производные, имеющие более длительный период полужизни или периоды полужизни, средние между периодом полужизни нативного альбумина человека и целевого соединения релаксина.

Гетерологичные гибридные белки согласно настоящему изобретению включают белки, содержащие консервативные замены аминокислот в молекуле релаксина и/или Fc-фрагмент или альбумин в составе гибридного белка. "Консервативная замена" является заменой некоторой аминокислоты другой аминокислотой, имеющей такой же суммарный электронный заряд и примерно такие же размер и форму. Аминокислоты с алифатическими или замещенными алифатическими боковыми цепями имеют примерно одинаковый размер, если общее число атомов углерода и гетероатомов в их боковых цепях различается не более чем примерно на четыре. Они имеют приблизительно одинаковую форму, если количество ветвей в их боковых цепях различается не более чем на одну. Аминокислоты с фенильными группами или замещенными фенильными группами в боковых цепях считаются имеющими приблизительно одинаковый размер и форму. Если здесь не указано иное, консервативные замены предпочтительно осуществляются с использованием природных аминокислот.

Белки альбумина и иммуноглобулина дикого типа могут быть получены из различных источников. Например, эти белки могут быть получены из библиотеки кДНК, приготовленной из тканей или клеток, которые экспрессируют целевую мРНК на уровне, достаточном для детектирования. Библиотеки могут быть подвергнуты скринингу зондами, разработанными с использованием известных из публикаций дикого типа ДНК или белков для конкретного целевого белка. Например, константные области легких или тяжелых цепей иммуноглобулина описаны в Adams, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027-6031; Rice et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) *Nature* 298:286-288; и Morrison, et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Некоторые ссылки, описывающие последовательности белка и ДНК альбумина, включают Meloun, et al. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et al. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; и Minghetti, et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747. Характеристика гетерологичных гибридных белков согласно настоящему изобретению

Существуют многочисленные методы для определения характеристик гибридных белков согласно настоящему изобретению. Некоторые из этих методов включают электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) совместно с методами окрашивания белка или иммуноблоттинг с использованием антител к IgG или к HSA, но не ограничиваются только указанными. Другие методы

включают, например, матричную лазерную десорбционную/ионизационную масс-спектрометрию (MALDI-MS), жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию, изoeлектрическое фокусирование, аналитический анионный обмен, хроматофокусирование и циркулярный дихроизм.

Усиление аффинности к сывороточному альбумину.

Различные молекулы также можно гибридизовать с полипептидами релаксина согласно настоящему изобретению для изменения периода полужизни полипептидов релаксина в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы присоединяют к или гибридизуют с полипептидами релаксина согласно настоящему изобретению для повышения аффинности к эндогенному сывороточному альбумину в организме животного.

Например, в некоторых случаях осуществляют рекомбинантную гибридизацию полипептида релаксина и связывающей последовательности альбумина. Примером связывающей последовательности альбумина является связывающий домен альбумина стрептококкового белка G, (см., например, Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 и Sjolander et al., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997))) или альбуминсвязывающие пептиды, такие как описаны, например, в Dennis, et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002), но не ограничиваясь только перечисленным.

В других вариантах осуществления данного изобретения полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению ацилируют жирными кислотами. В некоторых случаях жирные кислоты способствуют связыванию с сывороточным альбумином. См., например, Kurtzhals, et al., *Biochem. J.* 312:725-731 (1995).

В других вариантах осуществления данного изобретения полипептиды релаксина соединяют непосредственно с сывороточным альбумином (включая сывороточный альбумин человека, не ограничиваясь только им). Специалисты в данной области понимают, что широкое разнообразие других молекул также может связываться с релаксином согласно настоящему изобретению для изменения связывания с сывороточным альбумином или другими компонентами сыворотки.

Гликозилирование полипептидов релаксина.

Данное изобретение включает полипептиды релаксина, включающие одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, несущих группы сахаров. Группы сахаров могут быть как природные (включая N-ацетилглюкозамин, но не ограничиваясь только им), так и не природные, включая 3-флюорогалактозу, но не ограничиваясь только ею). Эти сахара могут быть присоединены к не кодируемому в природных условиях аминокислотами N- или O-связной гликозидной связи (включая N-ацетилгалактоза-L-серин, но не ограничиваясь только им) или искусственной связью (включая оксим или соответствующий C- или S-связанный гликозид, но не ограничиваясь только ими). Компоненты сахара (включая гликозид, но не ограничиваясь только им) могут быть присоединены к полипептидам релаксина либо *in vivo*, либо *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид релаксина, включающий карбонилсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, модифицируют сахаром, дериватизированным аминооксигруппой, с получением соответствующего гликозилированного полипептида, связанного оксимной связью. После присоединения к не кодируемой в природных условиях аминокислоте этот сахар может быть далее изменен обработкой с использованием гликозилтрансферазы и других ферментов с образованием олигосахарной связи с полипептидом релаксина. См., например, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид релаксина, включающий карбонилсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, непосредственно модифицируют гликаном, имеющим определенную структуру, приготовленного в виде аминоксипроизводного. Обычный специалист в данной области понимает, что другие функциональные компоненты, включая азид, алкин, гидразид, гидразин и семикарбазид, могут быть использованы для связывания сахара с не кодируемой в природных условиях аминокислотой.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид релаксина, включающий азид- или алкинилсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может быть далее модифицирован с использованием реакции циклоприсоединения Хьюсена [3+2], но не ограничиваясь только ею, включая, соответственно, производные алкинила или азиды, но не ограничиваясь только ими. Этот метод позволяет модифицировать белки с чрезвычайно высокой степенью избирательности.

Димеры и мультимеры релаксина.

Настоящее изобретение также предусматривает применение релаксина и комбинаций аналогов релаксина, таких как гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры или гетеромультимеры (т.е. тримеры, тетрамеры и т.д.), в которых релаксин, содержащий одну или более не кодируемых в природных условиях аминокислот, связан с еще одним релаксином или его вариантом или другим полипептидом, т.е. не релаксином и не вариантом релаксина, либо непосредственно через остов полипептида, либо посредством линкера. Благодаря своей повышенной по сравнению с мономерами молекулярной массе димерные или мультимерные конъюгаты релаксина могут проявлять новые или желаемые свойства, включая (но не ограничиваясь только этим) другие фармакологические, фармакокинетические, фармакодинамические, измененные периоды терапевтической полужизни или измененные периоды полураспада в плазме по сравнению с мономерным релаксином. Примеры мономерных аналогов релаксина приведены, например,

в Balschmidt, P., et al., Патент США № 5164366, выдан 17 ноября 1992 г.; Brange, J., et al., патент США № 5618913, выдан 8 апреля 1997 г.; Chance, R.E., et al., патент США № 5514646, выдан 7 мая 1996 г.; и Ertl, J., et al., публикация ЕРО номер 885961, 23 декабря 1998 г. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают мономерные аналоги релаксина, содержащие одну или несколько групп не кодируемых в природных условиях аминокислот, а некоторые варианты осуществления настоящего изобретения - мономерные аналоги релаксина, где в положении B28 находится Asp, Lys, Ile, Leu, Val или Ala, а аминокислотный остаток в положении B29 представляет собой Lys или Pro; мономерный аналог релаксина Lys(B28)Pro(B29)-релаксин человека; мономерный аналог релаксина Asp(B28)-релаксин человека и мономерный аналог релаксина Lys(B3)Ile(B28)-релаксин человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения димеры релаксина согласно настоящему изобретению модулируют передачу сигналов рецептора релаксина. В других вариантах осуществления настоящего изобретения димеры или мультимеры релаксина действуют как антагонисты, агонисты или модуляторы рецептора релаксина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более молекул релаксина присутствуют в димере или мультимере релаксина, которые включают не кодируемую в природных условиях аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером.

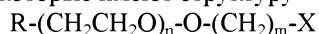
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептиды релаксина непосредственно связаны амидной связью Asn-Lys амидной связи или дисульфидной связью Cys-Cys, не ограничиваясь только ими. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептиды релаксина и/или связанные нерелаксиновые молекулы включают различные не кодируемые в природных условиях аминокислоты, которые способствуют димеризации, алкин в одной не кодируемой в природных условиях аминокислоте первого полипептида релаксина и азид второй не кодируемой в природных условиях аминокислоты второй молекулы, которые конъюгируют в результате реакции циклоприсоединения Хьюсена [3+2] (но не ограничиваясь только этим). Необязательно, релаксин и/или связанная нерелаксиновая молекула, включающая кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может быть конъюгирована со вторым полипептидом, включающим гидроксилминсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, эти полипептиды реагируют с образованием соответствующего оксима.

В альтернативном варианте два полипептида релаксина и/или связанная нерелаксиновая молекула соединены с использованием линкера. Любой гетеро- или гомобифункциональный линкер может использоваться для связывания двух молекул и/или связанных нерелаксиновых молекул, которые могут иметь одну и ту же или различные исходные последовательности. В некоторых случаях в качестве линкера, используемого для связывания релаксина, может выступать функциональный ПЭГ-реагент.

Молекулярная масса и длина молекулы линкера могут находиться в широком диапазоне. Линкеры с большей или меньшей молекулярной массой могут использовать для обеспечения желаемой структуры или пространственных связей между релаксином и связанным соединением, или между релаксином и его рецептором, или между связанным соединением и его партнером по связыванию, если таковой имеется.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает водорастворимые бифункциональные линкеры, имеющие структуру в форме гантели, которые включают: а) азид-, алкин-, гидразин-, гидразид-, гидроксилмин- или карбонилсодержащий компонент по меньшей мере на одном конце остова полимера; и б) по меньшей мере одну вторую функциональную группу на втором конце остова полимера. Вторая функциональная группа может быть такой же, как и первая функциональная группа или отличаться от нее. Вторая функциональная группа в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения не реагирует с первой функциональной группой. Настоящее изобретение предусматривает в некоторых вариантах осуществления водорастворимые соединения, которые включают по меньшей мере один фрагмент с разветвленной молекулярной структурой. Например, разветвленная молекулярная структура может быть дендритной.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предусматривает мультимеры, включающие один или более полипептидов релаксина, образованных в результате реакции с водорастворимыми активированными полимерами, которые имеют структуру



где n находится в пределах примерно от 5 до 3000, m в пределах от 2 до 10, X может быть азид-, алкин-, гидразин-, гидразид-, аминоксид-, гидроксилмин-, ацетил- или карбонилсодержащей группой и R - это эпирующая группа, функциональная группа или уходящая группа, которая может быть такой же, как X, или отличаться от него. R может быть, например, функциональной группой, выбранной из группы, состоящей из гидроксила, экранированного гидроксила, алкоксила, N-гидроксисуксинимида эфира, 1-бензотриазолила эфира, N-гидроксисуксинимида карбоната, 1-бензотриазолила карбоната, ацетала, альдегида, альдегид гидратов, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, активного сульфона, амина, аминоксид, экранированного амина, гидразида, экранированного гидразида, экранированного тиола, карбоксильной кислоты, экранированной карбоксильной кислоты, изоцианата, изотиоцианата, малеимида, винилсульфона, дитиопиридина, винилпиридина, йодоацетамида, эпоксида, глиоксала, дионов, месилатов, тосилатов, тресилата, алкена и кетона.

Измерение активности полипептида релаксина и аффинность полипептида релаксина к рецепторам

релаксина.

Активность полипептида релаксина может быть определена с использованием стандартных или известных аналитических тестов *in vitro* или *in vivo*. Полипептиды релаксина могут быть исследованы на биологическую активность с использованием подходящих методов, известных в данной области. Такие аналитические исследования включают (но не ограничиваются этим) активизацию генов, чувствительных к интерферону, исследования связывания рецепторов, исследование противовирусной активности, исследования ингибирования цитопатического эффекта (Familletti et al., Meth. Enzymol. 78:387-394), исследования антипролиферативных свойств (Aebersold and Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582), исследование иммуномодуляторных свойств (патенты США №№ 4914033 и 4753795) и исследования, контролирующее индуцирование МНС-молекул (например, Hokland et al., Meth. Enzymol. 119:688-693), как описано в Meager, J. Immunol. Meth., 261:21-36 (2002).

Поглощение глюкозы адипоцитами 3T3-L1 может быть оценено с использованием следующего метода. Клетки 3T3-L1 получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.). Клетки культивируют в питательной среде (ПС), содержащей 10% обогащенной железом эмбриональной бычьей сыворотки в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла. Для стандартной дифференцировки адипоцитов через 2 дня после того, как клетки достигнут непрерывности слоя (день 0), клетки в течение 48 ч подвергают воздействию дифференцировочной среды (ДС), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл релаксина, 1 мкМ дексаметазона и 0,5 мкМ изобутилметилксантина. Затем клетки содержат в постдифференцировочной среде, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 10 мкг/мл релаксина. Эффективность *in vitro* может быть определена по аналитическим с использованием тестов на поглощение глюкозы, известным средним специалистам в данной области. Эффективность *In vitro* может быть определена как мера поглощения глюкозы в клеточном анализе с соединением релаксина, которая является мерой биологической эффективности соединения релаксина. Она может быть выражена как EC_{50} , что является эффективной концентрацией композиции, приводящей к 50%-активности в единичном эксперименте по исследованию влияния величины дозы. В исследовании транспорта глюкозы - зависящее от релаксина поглощение глюкозы, исследуемое по накоплению 0,1 мМ 2-деокси-D-[^{14}C]глюкозы измерения осуществляют следующим образом: 3T3-L1 адипоциты в 12-луночном планшете дважды промывали буферным раствором KRP 136 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 10 мМ $NaPO_4$, 0,9 мМ $CaCl_2$, 0,9 мМ $MgSO_4$, pH 7,4), нагревали до температуры 37°C и, содержащей 0,2% БСА, инкубировали в среде L-15 Лейбовица, содержащей 0,2% БСА, в течение 2 ч при температуре 37°C в воздушной среде помещения, снова дважды промывали раствором KRP, содержащим 0,2% буфера БСА, и инкубировали в KRP, 0,2% буфере БСА в отсутствие (только Me_2SO) или в присутствии вортманнина в течение 30 мин при температуре 37°C в воздушной среде помещения. Затем добавляли релаксин к конечной концентрации 100 нМ на 15 мин и измеряли поглощение 2-деокси-D-[^{14}C]глюкозы в течение последних 4 мин. Неспецифическое поглощение, измеренное в присутствии 10 мкМ цитохалазина В, вычитали из всех величин. Концентрации белка определяли по тесту Пирса с бичинхоиновой кислотой. Обычно накопление измеряли трижды или четырежды в каждом эксперименте. Может быть исследован эффект острой и хронической премедикации адипоцитов 3T3-L1 с использованием FGF-21 в присутствии релаксина. Исследование транспорта глюкозы-независящее от релаксина-Фибробласты 3T3-L1 помещали в 96-луночный планшет и дифференцировали в жировые клетки (адипоциты) в течение 2 недель. После дифференцировки их выдерживали в бессывороточной среде и обрабатывали различными полипептидами релаксина согласно настоящему изобретению в течение 24 ч. После обработки клетки дважды промывали буферным раствором KRBH, содержащим 0,1% БСА. Накопление глюкозы происходило в присутствии меченой глюкозы в буфере KRBH. Это позволяет провести количественную оценку разнообразных полипептидов релаксина и аналогов, полученных согласно настоящему изобретению, а также пегилированных полипептидов, поскольку известно, что пегилирование приводит к уменьшению эффективности нативной молекулы, и сравнить эффективность различных инсулинов. Дополнительно может быть показано, что полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению приводят к накоплению глюкозы в модели ткани *ex vivo*.

В модели транспорта глюкозы *ex vivo* аналитическое исследование транспорта глюкозы описано следующим образом: базовый буферный раствор Кребса-Хензеляйта - исходный раствор 1: NaCl (1,16 М); KCl (0,046 М); KH_2PO_4 (0,0116 М); $NaHCO_3$ (0,0253 М). Исходный раствор 2: $CaCl_2$ (0,025 М); $MgSO_4$ ($2H_2O$) (0,0116 М). БСА: используйте непосредственно без диализа фракцию V ICN Cohn, жирную кислоту, не содержащую БСА. Подготовка среды: добавьте 50 мл исходного раствора 1 Кребса к 395 мл dH_2O и газа, содержащего 95% O_2 /5% CO_2 , и выждите 1 ч. Добавьте 50 мл исходного раствора 2 и долейте dH_2O до объема 500 мл. Добавьте 500 мг ICN жирной кислоты, не содержащей БСА. Преинкубационная и инкубационная среды: 32 мМ маннитола, 8 мМ глюкозы. Промывочные среды: 40 мМ маннитола, 2 мМ пирувата. Транспортные среды: 39 мМ маннитола, 1 мМ 2-DG; 32 мМ маннитола, 8 мМ 3-O-MG. Раствор релаксина: (свиной релаксин [Lilly] 100000000 мкЕд/мл) при окончательной концентрации 2000 мкЕд/мл или 13,3 нМ. Приготовление радиоактивно маркированной среды: используются удельные активности: 2-DG = 1,5 МСi/мл; 3-O-MG = 437 мкСi/мл; или маннитол = 8 мкСi/мл. Крысы были анестезированы с использованием 0,1 cc нембутала на 100 г веса тела. Мышечную ткань иссекали и промывали в

0,9% физиологическом растворе, затем на 1 ч ее помещали в прединкубационную среду (2 мл) при температуре 29°C. Мышечную ткань переносили в инкубационную среду (2 мл, такая же, как и прединкубационная, за тем исключением, что она не содержит релаксина и исследуемого соединения) и инкубировали 30 мин. Затем мышечную ткань переносили в промывочную среду (2 мл) на 10 мин при температуре 29°C и затем переносили в среду для мечения (1,5 мл) на 10 мин (3-O-MG) или на 20 мин (2DG). Мышечную ткань обрезали, взвешивали и помещали в полипропиленовые пробирки на сухом льду. В пробирки добавляли 1 мл 1н. КОН, после чего пробирки помещали в водяную ванну на 10-15 мин при температуре 70°C, пробирки переворачивали каждые несколько минут. Пробирки охлаждали на льду и добавляли 1 мл 1н. НСl, затем хорошо смешивали. Затем в двойные сцинтилляционные флаконы наливали 200 мкл надосадочной жидкости и производили сравнительные подсчеты с помощью сцинтилляционного счетчика по известным радиоактивным стандартам.

Для исследования сокращения мышцы сначала инкубируют в течение 1 ч в прединкубационных/инкубационных средах. Спустя 1 ч одну мышцу каждой пары (одна пара на крысу) закрепляют в стимуляционном аппарате, а другую мышцу переносят в новый флакон с инкубационной средой. Сокращение мышцы стимулируют сериями импульсов в течение 200 мс, имеющих частоту 70 Гц, каждый импульс серии длится 0,1 мс. Серия импульсов подается по 1/с при напряжении 10-15 В в течение 2×10 мин с 1-минутным перерывом посередине. В конце периода стимуляции мышцу извлекают из стимуляционного аппарата и помещают в промывочную среду на 10 мин, после чего ее помещают в среды для мечения, как указано выше.

Средние количества релаксина, полипептидов релаксина и/или аналогов релаксина согласно настоящему изобретению настоящего изобретения могут меняться, и, в частности, эти количества могут основываться на рекомендациях и предписаниях квалифицированных врачей. Точное количество релаксина, полипептидов релаксина и/или аналогов релаксина настоящего изобретения является предметом выбора и зависит от таких факторов, как точный тип и/или тяжесть стадии заболевания, которое лечат, состояния пациента, проходящего лечение, а также от других ингредиентов, присутствующих в композиции. Данное изобретение также предусматривает терапевтически эффективные количества другого активного агента. Количество, вводимое пациенту, может быть легко определено средним специалистом в данной области на основе практики проведения терапии релаксином, доступных терапевтических методов с использованием релаксина и/или других аналогов релаксина.

Фармацевтические композиции могут быть изготовлены традиционным способом.

Примеры

Описанные ниже примеры приведены в иллюстративных целях, они не ограничивают заявленное изобретение.

Пример 1.

В этом примере описан один из многих возможных наборов критериев для выбора участков встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот в релаксин. На фиг. 1-4 показана структура и последовательность релаксина, а таблица, приведенная ниже, включает последовательности с А-цепью, В-цепью, релаксином и прорелаксином. Полипептиды релаксина получали путем замены кодируемой аминокислоты не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В каждом полипептиде одна из аминокислот заменена на параацетилфенилаланин (pAcF или pAF). Полученные полипептиды не имели лидерной последовательности и представляли собой полипептиды релаксина с А/В-цепью (SEQ ID NO: 1-3). Каждый полученный пептид содержал замену на не кодируемую в природных условиях аминокислоту в одном из следующих положений: 1, 5, 18, 13, 2 в последовательности SEQ ID NO: 4, или в соответствующих положениях А-цепи любой другой известной последовательности релаксина, или в положениях 5, 7, 18, 28 в последовательности SEQ ID NO: 5 или 6 в соответствующих положениях В-цепи любой известной последовательности релаксина. На фиг. 2 показана структура релаксина человека, маркированного с использованием программного обеспечения PyMOL (DeLano Scientific; Пало Альто, Калифорния) и некоторых аминокислот, соответствующих тем, которые были заменены параацетилфенилаланином в полипептидах релаксина согласно настоящему изобретению. Еще один набор критериев для выбора предпочтительных участков для встраивания не кодируемых в природных условиях аминокислот включает использование и сравнение кристаллических структур из банка данных белков или других банков данных, которые используют для моделирования структуры релаксина, и остатки идентифицируют таким образом, чтобы они 1) не оказывали влияния на связывание с их рецептором, и 2) не присутствовали внутри белка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина, не ограничиваясь только указанными, 1, 5, 18, 13, 2 в последовательности SEQ ID NO: 4, или в соответствующие положения А-цепи любых известных последовательностей релаксина, или в положения 5, 7, 18, 28 в последовательности SEQ ID NO: 5 или 6, или в те же самые позиции В-цепи любой известной последовательности релаксина.

Для оценки каждого положения релаксина и аналогов релаксина для встраивания не кодируемой в природных условиях аминокислоты использовали следующие критерии: остаток (а) не должен оказывать влияния на связывание с рецептором по данным структурного анализа, (b) не должен подвергаться дей-

ствию сканирующего мутагенеза с использованием аланина или гомологов, (с) должен находиться на поверхности и проявлять минимальные ван-дер-Ваальсовы или водородные взаимодействия с окружающими остатками, (d) в вариантах релаксина должен быть либо удален, либо изменен, (е) должен приводить к консервативным изменениям при замене на не кодируемую в природных условиях аминокислоту и (f) может находиться либо в областях с высокой пластичностью, либо в структурно жестких областях. Кроме того, могут быть выполнены дальнейшие расчеты по молекуле релаксина с использованием программы Cx (Pintar et al. (2002) *Bioinformatics*, 18, pp 980) для оценки степени возвышения над поверхностью каждого атома белка.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений в А-цепи релаксина: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (т.е. на карбоксильном конце белка) (SEQ ID NO: 4 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 1-3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений в В-цепи релаксина: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (т.е. на карбоксильном конце белка) (SEQ ID NO: 5 или 6 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 1-3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 1, 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 1, 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 1, 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO: 1, или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или более не кодируемых в природных условиях аминокислот встроены в одном или более из следующих положений релаксина: 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO: 1 или соответствующие аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 2 и 3).

Пример 2.

В этом примере подробно описаны клонирование и экспрессия полипептида релаксина, включающего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, в *E.coli*. Методы клонирования релаксина известны обычным специалистам в данной области. Последовательности полипептидов и полинуклеотидов релаксина и клонирование релаксина в клетки-хозяева подробно описаны в патенте США № 4758516; патенте США № 5166191; патентах США №№ 5179195, 5945402 и 5759807; настоящим упоминанием все указанные патенты считаются включенными в данную заявку. кДНК, кодирующая релаксин, показана как SEQ ID NO: 12, и последовательность зрелой полипептидной аминокислоты показана, как SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Цитируемые последовательности релаксина		
SEQ ID NO:	Название последовательности	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность релаксина	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	Аминокислотная последовательность релаксина B1 Ala	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	Аминокислотная последовательность прорелаксина	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
4	А-цепь релаксина, аминокислотная последовательность	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	В-цепь релаксина, аминокислотная последовательность	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	В-цепь релаксина, аминокислотная последовательность с B1 Ala	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	Аминокислотная последовательность С-пептида	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	Лидерная аминокислотная последовательность релаксина	MKKNIAFLLKR
9	Лидерная аминокислотная последовательность инсулина	MIEGGR
10	А цепь релаксина, нуклеинокислотная последовательность	caactctacagtgcatggcctaataatgttgccatgttggtgtaccaaaagatctctgctagatttgc
11	В-цепь релаксина, нуклеинокислотная последовательность	gactcatggatggaggaaagtatttaataatgcggccgcgaattatgcgcgcagattgccatttgcgc atgagcacctggagc
12	А и В-цепи релаксина, нуклеинокислотная последовательность	caactctacagtgcatggcctaataatgttgccatgttggtgtaccaaaagatctctgctagatttgc gactcatggatggaggaaagtatttaataatgcggccgcgaattatgcgcgcagattgccatttgcgc atgagcacctggagc
13	Лидерная нуклеинокислотная последовательность релаксина	atgaaaaagaatatcgcatctctcttaaacgg
14	Лидерная нуклеинокислотная последовательность инсулина	atgattgaagggtggtcgt
15	Пример экспрессии релаксина аминокислотной последовательности конструкции	M I E G G R D S W M E E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S R R E A E D L Q V G Q V F L G G G P G A G S L Q P L A L E G S L Q K R Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R S L A R F C

Введенная система трансляции, которая включает ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоацил тРНК синтетазу (О-РС) используется для отображения релаксина или аналогов релаксина, содержащих не кодируемую в природных условиях аминокислоту. О-РС предпочтительно аминоацилирует О-тРНК с не кодируемой в природных условиях аминокислотой. В свою очередь, система трансляции встраивает не кодируемую в природных условиях аминокислоту в релаксин или аналог релаксина в ответ на кодируемый селекторный кодон. Подходящие последовательности О-РС и О-тРНК описаны в WO 2006/068802 под заголовком "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" ("Композиции аминокислот-тРНК синтетазы и их применение") (E9; SEQ ID NO: 16) и WO 2007/021297 под заголовком "Compositions of tRNA and Uses Thereof" ("Композиции тРНК и их применение") (F13; SEQ ID NO: 17), которые считаются полностью включенными в данную заявку путем ссылки.

Таблица 2

Цитируемые последовательности		
SEQ ID NO:: 18	<i>M. jannaschii</i> тРНК Tyr Cua	тРНК
SEQ ID NO:: 19	<i>HLAD03</i> ; оптимизированная амбер-супрессорная тРНК	тРНК
SEQ ID NO:: 20	<i>HL325A</i> ; оптимизированная супрессорная тРНК сдвига рамки генетического кода AGGA	тРНК
SEQ ID NO:: 21	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- <i>L</i> -фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(6)	PC
SEQ ID NO:: 22	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -бензоил- <i>L</i> -фенилаланина <i>p</i> -BpaRS(1)	PC
SEQ ID NO:: 23	Аминоацил тРНК синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	PC
SEQ ID NO:: 24	Аминоацил тРНК синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	PC
SEQ ID NO:: 25	Аминоацил тРНК синтетаза для встраивания пропаргил-фенилаланина <i>Propargyl</i> -PheRS	PC
SEQ ID NO:: 26	Аминоацил тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(1)	PC
SEQ ID NO:: 27	Аминоацил тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(3)	PC
SEQ ID NO:: 28	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(4)	PC
SEQ ID NO:: 29	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина <i>p</i> -Az-PheRS(2)	PC
SEQ ID NO:: 30	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -ацетил-фенилаланина (LW1)	PC
SEQ ID NO:: 31	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -ацетил-фенилаланина (LW5)	PC
SEQ ID NO:: 32	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -ацетил-фенилаланина (LW6)	PC
SEQ ID NO:: 33	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина (AzPheRS-5)	PC
SEQ ID NO:: 34	Аминоациловая тРНК синтетаза для встраивания <i>p</i> -азидо- фенилаланина (AzPheRS-6)	PC

Трансформация *E.coli* плазмидами, содержащими ген модифицированного релаксина или аналога релаксина, и ортогональной парой аминоксил тРНК синтетаза/тРНК (специфическую для желаемой не кодируемой в природных условиях аминокислоты) позволяет осуществить сайт-специфическое встраивание не кодируемой в природных условиях аминокислоты в полипептид релаксина.

Зрелый релаксин дикого типа амплифицируют методом ПЦР из реакции синтеза кДНК с использованием стандартных протоколов и клонируют в рЕТ30 (NcoI-BamHI). До или, необязательно, после подтверждения последовательности релаксина, включая N-концевую последовательность ННННННSGG, далее субклонировать в вектор супрессии, содержащий амбер-супрессорную тирозил Tyr/CUA из *Methanospirillum jannaschii* (Mj тРНК Tyr/CUA) под конститутивным контролем синтетического промотора, полученного из последовательности промотора липопротеина *E.coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), а также ортогональную тирозил-тРНК-синтетазу (Mj TyrPC) под контролем промотора GlnPC *E.coli*. Экспрессия релаксина находится под контролем промотора T7. Амбер-мутации вводят с использованием стандартных протоколов мутагенеза QuikChange® (Stratagene; Ла Хойя, Калифорния). Последовательность конструкций верифицировали. Тестирование композиций релаксина длительного действия может быть проведено с использованием модели диабета у крыс STZ (PCO 08-400-209).

Супрессия параацетил-фенилаланином (pAcF).

Плазмиды (например, pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381)) были использованы для трансформации в штамм *Escherichia coli* W3110B57, в результате чего получали штамм *E. coli* RLX-BA1-AV13pAF W3110B2, в котором экспрессия T7 полимеразы была под контролем индуцируемого арабинозой промотора. Суточные бактериальные культуры разбавляли в пропорции 1:100 во встряхиваемых флаконах, содержащих культуральную среду 2X YT, и выращивали при температуре 37°C до ОП₆₀₀ примерно 0,8. Экспрессию белка усиливали добавлением арабинозы (окончательно, 0,2 %) и пара-ацетилфенилаланина (pAcF) до окончательной концентрации 4 мМ. Культуры инкубировали при температуре 37°C в течение 5 часов. Осадок ресуспендировали в лизирующем B-PER буфере (Pierce) 100 мкл/OD/мл +10 мкг/мл ДНКазы и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 минут. Клеточный материал удалялся центрифугированием с удалением супернананта. Осадок ресуспендировали в равном количестве белкового загрузочного буфера для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Все образцы загружали на 4-12% ПААГ с буфером MES и дитиотриэтиолом (DTT). Методы очистки релаксина известны среднему специалисту в данной области и подтверждаются методами SDS-PAGE, Western Blot или масс-спектроскопией с ионизацией электрораспылением и ионными ловушками или иными подобными анализами.

Меченые гистицином мутантные белки релаксина могут быть очищены с использованием методов, известных среднему специалисту в данной области. Для стандартных процедур очистки меченых гистицином белков может быть использована никель-хелатирующая смола ProBond (Инвитроген, Карлсбад, Калифорния, США), которую предоставляет производитель. Функциональные измерения белков могут быть проведены с использованием методов, известных в данной области, методов, приведенных в данной заявке на изобретение и во включенных в нее ссылках, а также в качестве альтернативы метод твердофазного ИФА (ELISA) на живых клетках может быть адаптирован для оценки полипептидов релаксина данного изобретения.

Таблица 3

Анализ вариантов релаксина					
Партия/Описание	Электрофорез в SDS-ПААГ	лизат амебоцит <i>a</i> Limulus LAL (ЭЕ/мг)	опс. при A280	чистота, измеренная ОФ-ВЭЖХ	чистота, измеренная Э-ВЭЖХ, чистота
Релаксин дикого типа ³	NR Основная полоса мигрирует	NT	2,4	91,2%	NT

20K	Пегилированная	вблизи 6 кДа стандарта ММ	NR	Основная	7,7	3,4	100%	NT
Q1pAF ^{1,3,4}		полоса						
20K	Пегилированная	мигрирует			3,6	2,4	100%	NT
A5pAF ^{1,3,4}		между 49 и 38						
20K	Пегилированная	кДа стандарта			16,1	2,4	100%	NT
R18pAF ^{1,3,4}		ММ						
20K	Пегилированная				NT	0,6	99,8%	NT
E5pAF ^{2,3}								
20K	Пегилированная				10,5	2,3	99,4%	NT
V7pAF ^{2,3,4}								
20K	Пегилированная				NT	2,0	99,0%	NT
A18pAF ^{2,3}								
20K	Пегилированная				9,1	2,2	99,4%	NT
W28pAF ^{2,3,4}								
20K	Пегилированная				5,1	3,7	99,5%	NT
V13pAF ^{1,3,4}								
20K	Пегилированная				NT	0,6	99,6%	NT
E5pAF ²								
20K	Пегилированная				0,0	1,6	99,5%	NT
L2pAF ¹								
WT Релаксин ³		NR Основная			0,1	2,5	85,6%	NT
		полоса						
		мигрирует						
		вблизи 6 кДа						
		стандарта ММ						
20K	Пегилированная	NR Основная			< 0,4	2,3	99,3%	99,3%
Q1pAF ^{1,3}		полоса						
		мигрирует						
		между 49 и 38						
		кДа стандарта						
		ММ						
5K	Пегилированная	NR Основная			5,4	1,5	99,4%	99,8%
V13pAF ^{1,3}		полоса						
		мигрирует						
		вблизи 14 кДа						
		стандарта ММ						
10K	Пегилированная	NR Основная			9,8	1,8	99,4%	99,5%
V13pAF ^{1,3}		полоса						
		мигрирует						
		между 28 и 17						
		кДа стандарта						
		ММ						
20K	Пегилированная	NR Основная			4,7	1,9	99,0%	99,5%
V13pAF ^{1,3}		полоса						
		мигрирует						
		между 49 и 38						
		кДа стандарта						
		ММ						
30K	Пегилированная	NR Основная			8,0	2,1	99,5%	99,8%
V13pAF ^{1,3}		полоса						
		мигрирует						
		между 62 и 49						
		кДа стандарта						
		ММ						

Образцы не восстановлены (NR); NT = не протестированы

¹ замена pAcF в А-цепи

² замена pAcF в В-цепи

³ замена Asp на Ala в В-цепи (BA1)

⁴ используют для первичного анализа фармакокинетики

Таблица 4

Потеря активности вариантов релаксина

Вариант	Кратность потери активности <i>in vitro</i>	Размер ПЭГ	<i>In vivo</i> PK Term HL(ч)	<i>In vivo</i> фарм.	Встряхиваемый флакон	Титр фермента (клеточная паста)	Методики анализа
RLX-A-AV13	17	5K, 10K, 20K, 30K	2,6(5K), 8,7(10K), 13,8(20K), 26,8(30K)		да	1 гм/л	ДСН-ПААГ, конц., LAL, ОФ-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ
RLX-A-AQ1	12	20K	10,7	20K проявляется эффект ивность	да	720 мг/л	ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ, LAL, Э-ВЭЖХ
RLX-A-AA5	12	20K	12,2		да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ, LAL
RLX-A-BV7	15	20K	13,1		да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ, LAL
RLX-A-AL2	17	20K			да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ
RLX-A-BE5	17	20K			да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ
RLX-A-AR18	21	20K	12,5		да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ, LAL
RLX-BE5	22	20K			да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ
RLX-A-BA18	48	20K			да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ
RLX-A-BW28	48	20K	13,9		да		ДСН-ПААГ, конц., ОФ-ВЭЖХ, LAL

Пример 3.

Этот пример иллюстрирует экспрессию полипептидов прорелаксина бактериями *E. coli*.

E. coli экспрессировали прорелаксин в форме одноцепочечного белка, состоящего из 88 аминокислот. После расщепления трипсином и карбоксилептидазой связывающий пептид и лидерная последовательность удаляются. Полученный пептид представляет собой небольшой двухцепочечный пептид с молекулярной массой 6 кДа, относящийся к надсемейству инсулина и состоящий из А-цепи длиной 24 остатка и В-цепи длиной 29 остатков. Структурная укладка характеризуется двумя пептидными цепями, связанными друг с другом двумя межцепочечными (Cys11-Cys36 и Cys24-Cys48) и одной внутрицепочечной (Cys10-Cys15) дисульфидными связями. Третичная структура, основанная на кристаллической структуре релаксина-2 человека, выявила компактную укладку, содержащую три спиральных сегмента и короткую расправленную зону, которая включает гидрофобное ядро.

Релаксин с одной или более не кодируемых в природных условиях аминокислот обеспечивает уникальные химические свойства и позволяет получить специфический пегелированный рекомбинантный вариант, содержащий включенную в ходе биосинтеза химически активную карбонильную группу путем замены природных аминокислот параацетилфенилаланином (пАцФ), что обеспечивает уникальный участок ковалентного присоединения для поли(этилен)гликоля (ПЭГ).

Пример 4.

В этом примере подробно описана экспрессия полипептидов прорелаксина бактериями *E. coli*.

В этом примере описано масштабирование производства полипептида релаксина с использованием ферментера объемом 5 л. Указанные способы и масштабирование также могут использоваться для партий объемом 10, 30, 150 или 1000 л. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 2 г релаксина на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 4 г релаксина на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 6 г релаксина на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 8 г релаксина

на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 10 г релаксина на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 15 г релаксина на каждый литр клеточной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения продукция белка составляет по меньшей мере 20 г релаксина на каждый литр клеточной культуры.

2.1. Встряхиваемые колбы для посева.

Штамм *Escherichia coli* W3110B57 [F-IN (rrnD-rrnE) lambda-araB::g1 tetA flhA::dhfr ompT::cat], несущий плазмиду pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381), использовали для продукции RLX-BA1-AV13pAF. Одну ампулу с банком клеток для исследования (RCB) извлекли из температуры -80°C и оставили для оттаивания при комнатной температуре; затем 50 мкл использовали для инокуляции 50 мл посевной среды (среды химически определенного состава), дополненной 50 мкг/мл канамицина сульфата, в 250 мл колбе Эрленмейера с перегородками. Основную посевную культуру выращивали приблизительно 18 ч при температуре 37°C и 250 об/мин (ход лопасти 1 дюйм). Основную посевную культуру субкультивировали с получением вторичной посевной культуры для достижения оптической плотности, измеряемой при длине волны 600 нм (ОП₆₀₀) 0,05, в 500 мл колбу Эрленмейера с перегородками, содержащую 100 мл посевной среды, дополненной 50 мкг/мл канамицина сульфата. Вторичную посевную культуру выращивали при температуре 37°C и 250 об/мин (ход лопасти 1 дюйм) в течение приблизительно 8 ч или при достижении ОП₆₀₀ между 2 и 4.

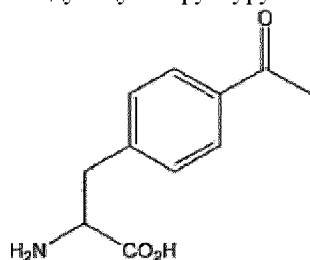
2.2. Ферментеры.

Сосуды Sartorius Biostat В емкостью 5 л наполнили 2,1 л производственной среды (среды химически определенного состава), дополненной 50 мкг/мл канамицина сульфата. Вторичные посевные культуры использовали для инокуляции ферментеров до начального ОП₆₀₀ на уровне 0,035. Культуры выращивали при температуре 37°C; растворенный кислород поддерживали на уровне 30% (насыщение воздуха) с помощью основного каскада встряхивания (480-1200 об/мин) и вторичного каскада 02. В процессе ферментации поддерживали скорость воздушного потока 5 л/мин при противодавлении 6 фунтов/кв.дюйм. pH культуры установлен на уровне 7,2±0,05 за счет добавления 15% аммония гидроксида и по мере необходимости добавляли антивспениватель Dow Chemical P2000 для контроля пенообразования. При достижении культурой уровня ОП₆₀₀ 35±5 (когда начальный глицерин практически расщепился в среде партии) произвели болюсную подкормку в объеме 200 мл с одновременной корректировкой уровня pH с 7,2 до 6,6. После первоначальной болюсной подкормки начали проводить постоянную подкормку со скоростью 0,25 мл/л/мин., которую проводили до момента сбора культуры. Сразу после начала подкормки в ферментер добавлено 2,5 мл/л (0,2 г/л конечного объема культуры) 100 г/л дипептидного раствора L-Ala-pAcF в воде. Через 15 мин после добавления дипептида культуру стимулировали путем добавления L-арабинозы (рецепт приготовления указан в PTR-FGF-002) с получением концентрации 2 г/л (конечного объема культуры). Культуру выращивали в течение 6 ч после добавления арабинозы, после чего собрали. На фиг. 5 показан гель ДСН-ПААГ прорелаксина, произведенного описанными способами с аминокислотой цепи В1 Ala и параацетилфенилаланином в 13 положении аминокислоты цепи А, заменяющей валин.

Пример 5.

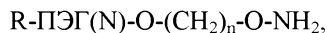
Этот пример иллюстрирует встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующую реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ.

Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 5000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11), и каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 2 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12), отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-ацетилфенилаланина в релаксин, последовательности SEQ ID NO: 1 и 2 (цепи А и В релаксина) и последовательности

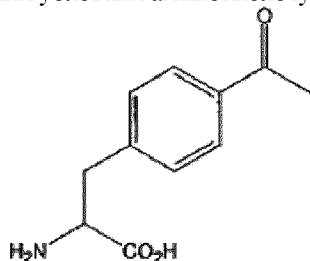
SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, M. jannaschii), а также 15, 29, 30 или 31 (TyrPC LW1, 5 или 6), как описано выше в примере 2. После модификации проводят реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминоксисодержащим производным ПЭГ следующей формы:



где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 5000. Осуществляют реакцию очищенного релаксина, содержащего р-ацетилфенилаланин, растворенного в концентрации 10 мг/мл в 25 мМ буфере MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, Миссури, США), pH 6,0, 25 мМ буфер Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, Миссури, США), pH 7,0 или в 10 мМ ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминоксисодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

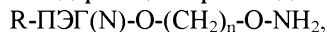
Пример 6.

В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующую реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ. Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 20000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3), отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, последовательности SEQ ID NO: 4 и 5 или 6 (цепи А и В релаксина) и последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, M. jannaschii), а также последовательности, описанные выше и используемые для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина.

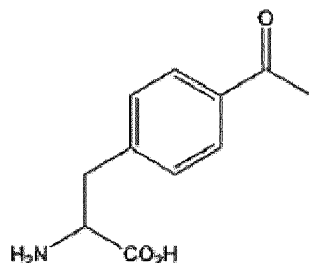
После модификации проводят реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминоксисодержащим производным ПЭГ следующей формы:



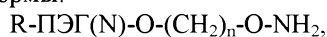
где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 20000. Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 мМ MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 мМ Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 мМ ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминоксисодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 7.

В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующая реакция с аминоксисодержащим ПЭГ. Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 20000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3), отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



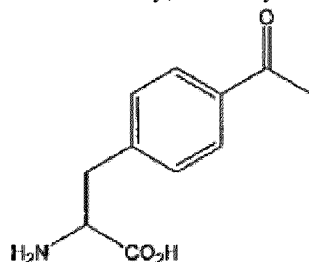
Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, являются SEQ ID NO: 13, а также последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, M. jannaschii), а также последовательности, описанные выше и включенные для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина. После модификации осуществляют реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминокислосодержащим производным ПЭГ следующей формы:



где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 20000. Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 mM MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 mM Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 mM ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминокислосодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

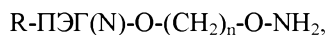
Пример 8.

В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующая реакция с аминокислосодержащим ПЭГ. Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминокислосодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 20000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3) отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, являются SEQ ID NO: 1, а также последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, M. jannaschii), а также последовательности, описанные выше и включенные для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина.

После модификации осуществляют реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, реакцию с аминокислосодержащим производным ПЭГ следующей формулы:

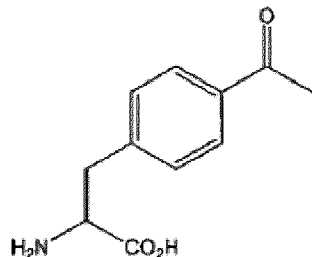


где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 20000. Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 mM MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 mM Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 mM ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминокислосодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 9.

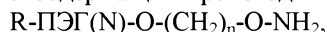
В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующая реакция с аминокислосодержащим ПЭГ. Этот пример демонстрирует способ получения полипептида

релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминокислосодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 30000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO:2 и 3), отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, являются SEQ ID NO: 1 (или последовательности SEQ ID NO: 2 или 3) и последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, *M. jannaschii*), а также последовательности, описанные выше и включенные для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина.

После модификации проводят реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминокислосодержащим производным ПЭГ следующей формы:



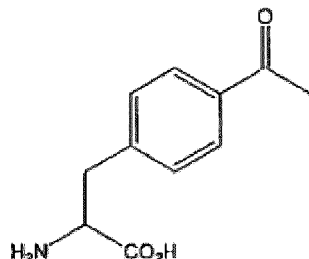
где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 30000.

Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 mM MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 mM Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 mM ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминокислосодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 10.

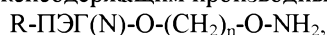
В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующую реакцию с аминокислосодержащим ПЭГ.

Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминокислосодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 40000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO:2 и 3) отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, являются SEQ ID NO: 13 (или последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 14) и последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, *M. jannaschii*), а также последовательности, описанные выше и включенные для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина.

После модификации вариант полипептида релаксина, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, вступает в реакцию с аминокислосодержащим производным ПЭГ следующей формы:

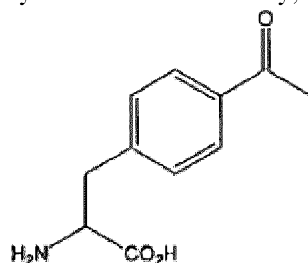


где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 40000. Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 mM MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 mM Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 mM ацетата натрия (компания

"Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминоксисодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

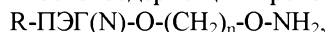
Пример 11.

В этом примере подробно описано встраивание карбонилсодержащей аминокислоты и последующую реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ. Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего кетонсодержащую не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая впоследствии вступает в реакцию с аминоксисодержащим ПЭГ с молекулярной массой приблизительно 10000. Каждый из остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3) отдельно заменяют на не кодируемую в природных условиях аминокислоту, имеющую следующую структуру:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина в релаксин, являются SEQ ID NO: 13 (или последовательности SEQ ID NO: 1, 2 или 14) и последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (muttPHK, M. jannaschii), а также последовательности, описанные выше и включенные для сайт-специфического встраивания р-аминофенилаланина.

После модификации осуществляют реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминоксисодержащим производным ПЭГ следующей формы:



где R - метил, n - 3, а N соответствует молекулярной массе приблизительно 10000. Проводят реакцию очищенного релаксина, содержащего р-аминофенилаланин, растворенного при 10 мг/мл в 25 mM MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 mM HEPES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 mM ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 10-100-кратным избытком аминоксисодержащего ПЭГ, после чего препарат взбалтывают в течение 10-16 ч при комнатной температуре (Jencks, W.J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp. 475). ПЭГ-релаксин затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 12. Конъюгация с ПЭГ, состоящим из гидроксиламиновой группы, связанной с ПЭГ амидной связью.

Реагент ПЭГ, имеющий приведенную ниже структуру, связывается с кетонсодержащей не кодируемой в природных условиях аминокислотой в соответствии с процедурой, описанной в примерах 3-9



где R - метил, n = 4 и N соответствует молекулярной массе приблизительно 5000-40000. Реакция, очистка и условия анализа соответствуют приведенному описанию и известны специалистам в данной области техники.

Пример 13.

В этом примере подробно описано встраивание двух различных не кодируемых в природных условиях аминокислот в полипептиды релаксина и аналоги полипептида релаксина.

Этот пример демонстрирует способ получения полипептида релаксина, включающего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, содержащую функциональную кетонную группу в двух положениях из следующих остатков: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3). Полипептид релаксина готовят в соответствии с вышеприведенным описанием с тем исключением, что кодон селектора вводят в двух разных сайтах в нуклеиновой кислоте.

Пример 14.

В этом примере подробно описана конъюгация полипептида релаксина или аналога полипептида релаксина с гидразидсодержащим ПЭГ, а также последующее восстановление in situ.

Полипептид релаксина, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, готовят в соответствии с вышеописанной процедурой. После модификации гидразидсодержащий ПЭГ, имеющий нижеуказан-

ную структуру, конъюгируют с полипептидом релаксина. Осуществляют реакцию $R\text{-ПЭГ(N)-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(O)(CH}_2\text{)}_n\text{-X-NH-NH}_2$, где R = метил, n = 2, а N = молекулярная масса 5000, 10000, 20000, 30000 или 40000, а X является карбонильной (C=O) группой. Очищенный релаксинсодержащий p-ацетилфенилаланин растворяется при 0,1-10 мг/мл в 25 мМ MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 мМ Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 мМ ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 1-100-кратным избытком гидразидсодержащего ПЭГ, и соответствующий гидразон восстанавливают *in situ* путем добавления исходного 1М NaCNBH₃ (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), растворенного в H₂O, до конечной концентрации 10-50 мМ. Реакции проводят в темноте при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение 18-24 ч. Реакции прекращают путем добавления 1 М Tris (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США) при уровне pH приблизительно 7,6 с получением конечной концентрации Tris 50 мМ или растворения в соответствующем буфере для немедленной очистки.

Пример 15.

В этом примере показана конъюгация полипептида релаксина или аналога полипептида релаксина с гидразидсодержащим ПЭГ, а также последующее восстановление *in situ*.

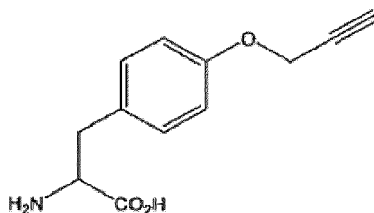
Полипептид релаксина, включающий карбонилсодержащую аминокислоту, готовят в соответствии с вышеописанной процедурой. После модификации гидразидсодержащий ПЭГ, имеющий нижеуказанную структуру, подвергается конъюгации в релаксина полипептид.

Осуществляют реакцию $R\text{-ПЭГ(N)-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(O)(CH}_2\text{)}_n\text{-X-NH-NH}_2$, где R = метил, n = 2, а N = молекулярная масса 20000, а X является карбонильной (C=O) группой. Очищенный релаксинсодержащий p-ацетилфенилаланин растворяется при 0,1-10 мг/мл в 25 мМ MES (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 6,0, 25 мМ Hepes (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 7,0 или в 10 мМ ацетата натрия (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США), pH 4,5, с 1-100-кратным избытком гидразидсодержащего ПЭГ, и соответствующий гидразон восстанавливают *in situ* путем добавления исходного 1М NaCNBH₃ (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США) растворенного в H₂O, до конечной концентрации 10-50 мМ. Реакции проводят в темноте при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение 18-24 ч. Реакции прекращают путем добавления 1 М Tris (компания "Sigma Chemical", г. Сент-Луис, шт. Миссури, США) при уровне pH приблизительно 7,6 с получением конечной концентрации Tris 50 мМ или растворения в соответствующем буфере для немедленной очистки.

Пример 16.

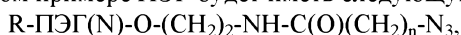
В этом примере подробно описано встраивание алкинсодержащей аминокислоты в полипептид релаксина или в аналоги полипептида релаксина и дериватизацию мПЭГ-азидом.

Каждый из указанных ниже остатков перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3) отдельно заменяют следующей не кодируемой в природных условиях аминокислотой:



Последовательностями, используемыми для сайт-специфического встраивания p-пропаргилатирозина в релаксин, являются SEQ ID NO: 1 (или соответствующие позиции в последовательностях SEQ ID NO: 2 или 3), последовательности SEQ ID NO: 16 или 17 (mutrPHK, M. jannaschii), а также 22, 23 или 24, как описано выше. Полипептид релаксина, содержащий пропаргилатирозин, экспрессируют в бактерии E.coli и очищают с использованием описанных выше условий.

Очищенный релаксин, содержащий пропаргил-тирозин, растворенный при 0,1-10 мг/мл в РВ буфере (100 мМ натрия фосфата, 0,15 М NaCl, pH 8), и 10-1000-кратный избыток азидсодержащего ПЭГ добавляют в реакционную смесь. Затем в реакционную смесь добавляют каталитическое количество CuSO₄ и медный провод. После инкубации смеси (включая, но не ограничиваясь этим, приблизительно 4 ч при комнатной температуре или при температуре 37°C, или после отстаивания в течение ночи при температуре 4°C) добавляют H₂O и смесь фильтруют через диализную мембрану. Этот образец может быть исследован на присоединение, методами, включающими, но не ограниченными процедурами, аналогичными описанным в примере 3. В этом примере ПЭГ будет иметь следующую структуру:

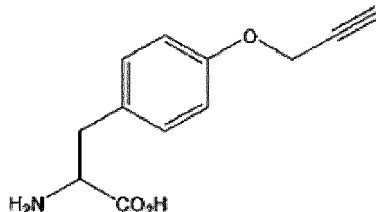


где R - метил, n - 4, а N - молекулярная масса 5000, 10000, 20000, 30000 или 40000.

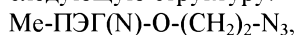
Пример 17.

Этот пример иллюстрирует замену крупной гидрофобной аминокислоты в полипептиде релаксина пропаргилтирозином.

Остаток Phe, Trp или Tyr, присутствующий в одном из следующих участков релаксина, перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3) отдельно заменяют следующей не кодируемой в природных условиях аминокислотой, как описано выше:



После модификации ПЭГ присоединяется к варианту полипептида релаксина, включающего алкин-содержащую аминокислоту. ПЭГ имеет следующую структуру:

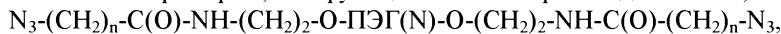


Процедуры соединения проводят в соответствии с описанными выше примерами. Это позволяет получить вариант полипептида релаксина, включающий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая, по существу, изостерична одной из крупных гидрофобных природных аминокислот и которая модифицирована производным ПЭГ, в определенном участке полипептида.

Пример 18.

Этот пример иллюстрирует получение гомодимера, гетеродимера, гомомультимера или гетеромультимера полипептида релаксина, разделенного одним или более ПЭГ-линкерами. Мультимеры полипептида релаксина могут образовываться между проинсулинами или между цепями А и В зрелого полипептида релаксина согласно настоящему изобретению.

Осуществляют реакцию варианта алкинсодержащего полипептида релаксина, полученного в соответствии с приведенным выше примером, с бифункциональным производным ПЭГ, имеющим форму:



где $n = 4$, а ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу приблизительно 5000, 10000, 20000, 30000 или 40000, с образованием соответствующего гомодимера полипептида релаксина, в котором две молекулы релаксина физически разделены ПЭГ. Аналогичным образом полипептид релаксина можно соединить с одним или несколькими другими полипептидами с образованием гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров.

Присоединение, очистку и исследование осуществляют в соответствии с описанными выше примерами.

Пример 19.

Этот пример иллюстрирует получение гомодимера, гетеродимера, гомомультимера или гетеромультимера полипептида релаксина, разделенного одним или несколькими ПЭГ-линкерами. Мультимеры полипептида релаксина могут образовываться между цепочками А и другими цепочками А или цепочками В и другими цепочками В.

Осуществляют реакцию варианта алкинсодержащего полипептида релаксина, полученного в соответствии с приведенным выше примером, в реакцию с бифункциональным производным ПЭГ, имеющим форму



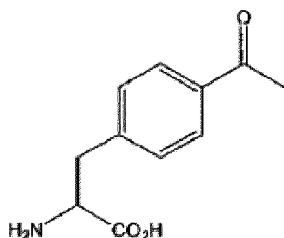
где $n = 4$, а ПЭГ имеет среднюю молекулярную массу приблизительно 5000, 10000, 20000, 30000 или 40000, с образованием соответствующего гомодимера полипептида релаксина, в котором две молекулы релаксина физически отделены посредством ПЭГ.

Аналогичным образом полипептид релаксина можно связывать с одним или несколькими другими полипептидами с образованием гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров. Присоединение, очистку и исследование осуществляют в соответствии с описанными выше примерами.

Пример 20.

Этот пример иллюстрирует присоединение фрагмента сахара к полипептиду релаксина.

Один из указанных ниже остатков заменяют не кодируемой в природных условиях нижеуказанной аминокислотой: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (т.е. на карбоксильном конце белка последовательности SEQ ID NO: 1 или в соответствующих положениях последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3), как описано выше.

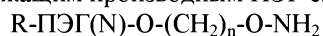


После модификации осуществляют реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с бета-связанным аминоксианалогом N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Вариант полипептида релаксина (10 мг/мл) и аминоксианалог (21 мМ) смешивают в водном буфере ацетата натрия 100 мМ (pH 5,5) и инкубируют при температуре 37°C в течение 7-26 ч. Второй сахар соединяют с первым ферментативно путем инкубации конъюгированного с сахаром полипептида релаксина (5 мг/мл) с UDP-галактозой (16 мМ) и бета-1,4-галактозилтрансферазой (0,4 ед./мл) в 150 мМ буфера HEPES (pH 7,4) в течение 48 ч при температуре окружающей среды (Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

Пример 22.

В этом примере подробно описано получение пегилированного антагониста полипептида релаксина.

Остаток, включая, но не ограничиваясь участвующими в связывании рецептора релаксина, заменяют указанной ниже не кодируемой в природных условиях аминокислотой, как описано выше. После модификации осуществляют реакцию варианта полипептида релаксина, включающего карбонилсодержащую аминокислоту, с аминоксисодержащим производным ПЭГ следующей формы:



где R - метил, n - 4, а N соответствует молекулярной массе 5000, 10000, 20000, 30000 или 40000, с образованием антагониста полипептида релаксина, включающего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, которая модифицирована производным ПЭГ на одном участке полипептида. Присоединение, очистку и исследование осуществляют в соответствии с описанными выше примерами.

Пример 21. Получение гомодимера, гетеродимера, гомомультимера или гетеромультимера полипептида релаксина, в котором молекулы релаксина соединены напрямую.

Вариант полипептида релаксина, включающего алкинсодержащую аминокислоту, может быть напрямую соединен с другим вариантом полипептида релаксина, включающим азидосодержащую аминокислоту. Аналогичным образом полипептид релаксина можно связывать с одним или несколькими другими полипептидами с образованием гетеродимеров, гомомультимеров или гетеромультимеров. Более подробное описание мультимеров, которые могут образовываться, представлено выше в примерах 16 и 17. Присоединение, очистку и исследование осуществляют, как описано выше.

Пример 22.



А

В

Осуществляют реакцию полиалкиленгликоля (Р-ОН) с галоидным алкилом (А) с образованием эфира (В). В этих соединениях n - это целое от единицы до девяти, R' может являться насыщенной или ненасыщенной алкильной или гетероалкильной группой C₁-C₂₀ с прямой или разветвленной цепью. R' также может являться насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом C₃-C₇, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенной или незамещенной алкарильной (алкил представляет собой насыщенный или ненасыщенный алкил C₁-C₂₀) или гетероалкарильной группой. Как правило, ПЭГ-ОН является полиэтиленгликолем (ПЭГ) или монометоксиполиэтиленгликолем (мПЭГ) с молекулярной массой 800-40000 Да.

Пример 23.



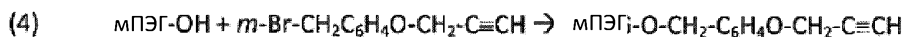
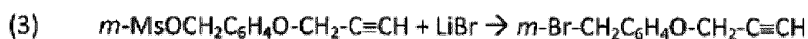
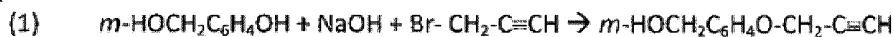
мПЭГ-ОН с молекулярной массой 20000 Да (мПЭГ-ОН 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) был обработан NaNH (12 мг, 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл). Раствор пропаргилбромид растворяли в количестве 80 мас.% раствора в ксилене (0,56 мл, 5 ммоль, 50 экв., Aldrich), после чего в раствор добавили каталитическое количество KI, полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Затем добавили воду (1 мл) и удалили растворитель под вакуумом. В остаток добавили CH₂Cl₂ (25 мл), отделили органический слой, высушили над безводным Na₂SO₄ и сократили полученный объем приблизительно до 2 мл. Этот раствор в CH₂Cl₂ по каплям добавили в диэтиловый эфир (150 мл). Полученный преципитат собрали, промыли несколькими порциями холодного диэтилового эфира и высушили с получением пропаргил-О-ПЭГ.

Пример 24.



мПЭГ-ОН с молекулярной массой 20000 Да (мПЭГ-ОН 20 кДа; 2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) обработали NaN (12 мг, 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл). Затем в смесь добавили 50 экв. 5-бromo-1-пентина (0,53 мл, 5 ммоль, Aldrich) и каталитическое количество KI. Полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 16 ч. Затем добавили воду (1 мл) и удалили растворитель под вакуумом. В остаток добавили CH₂Cl₂ (25 мл), отделили органический слой, высушили над безводным Na₂SO₄ и сократили полученный объем приблизительно до 2 мл. Этот раствор CH₂Cl₂ по каплям добавили в диэтиловый эфир (150 мл). Полученный преципитат собрали, промыли несколькими порциями холодного диэтилового эфира и высушили с получением соответствующего алкина. 5-Хлоро-1-пентин может использоваться в аналогичной реакции.

Пример 25.

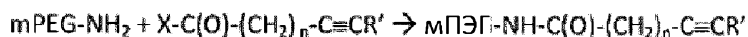


В раствор 3-гидроксизбензилалкоголя (2,4 г, 20 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воде (2,5 мл) сначала добавили порошок натрия гидроксида (1,5 г, 37,5 ммоль), а затем раствор пропаргилбромид, приготовленный как 80 мас.% раствор в ксилене (3,36 мл, 30 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 6 ч. В смесь добавили 10% лимонную кислоту (2,5 мл) и удалили растворитель под вакуумом. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл), а объединенные органические фракции промыли насыщенным раствором NaCl (10 мл), просушили над MgSO₄ и подвергли концентрации для получения 3-пропаргилоксибензилалкоголя.

Метансульфонилхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) и триэтиламин (2,8 мл, 20 ммоль) добавили в раствор соединения 3 (2,0 г, 11,0 ммоль) в CH₂Cl₂ при температуре 0°C и реакцию поместили в холодильник на 16 ч. В обычных условиях мезилат является бледно-желтым маслом. Это масло (2,4 г, 9,2 ммоль) растворили в ТГФ (20 мл) и добавили LiBr (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч, а затем охладили до комнатной температуры. В смесь добавили воду (2,5 мл) и удалили растворитель под вакуумом. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл), а объединенные органические фракции промыли насыщенным раствором NaCl (10 мл), просушили над безводным Na₂SO₄ и подвергли концентрации с получением желаемого бромида.

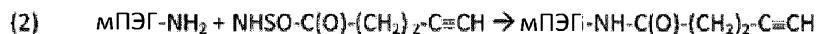
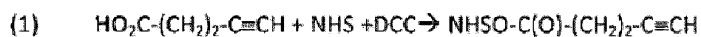
мПЭГ-ОН 20 кДа (1,0 г, 0,05 ммоль, Sunbio) растворили в ТГФ (20 мл), полученный раствор охладили на ледяной бане. NaN (6 мг, 0,25 ммоль) добавили при активном помешивании в течение нескольких минут, после чего добавили бромид, полученный описанным выше способом (2,55 г, 11,4 ммоль), и каталитическое количество KI. Охлаждающую ванну сняли и полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 12 ч. В смесь добавили воду (1,0 мл) и удалили растворитель под вакуумом. В остаток добавили CH₂Cl₂ (25 мл), отделили органический слой, высушили над безводным Na₂SO₄ и сократили полученный объем приблизительно до 2 мл. Введение по каплям в эфирный раствор (150 мл) привело к образованию преципитата, который собрали с получением производного ПЭГ.

Пример 26. мПЭГ.



Полимеры на основе полиэтиленгликоля, содержащие концевой алкин, также можно получать путем соединения полиэтиленгликоля, содержащего концевую функциональную группу, с реактивной молекулой, содержащей функциональную группу алкина, как показано выше, n находится в диапазоне от 1 до 10. R' может являться H или меньшей алкильной группой C₁-C₄.

Пример 27.



4-Пентиноевую кислоту (2,943 г, 3,0 ммоль) растворили в CH₂Cl₂ (25 мл). Добавили N-гидроксисукцинимид (3,80 г, 3,3 ммоль) и DCC (4,66 г, 3,0 ммоль); раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученный сырой эфир N-гидроксисукцинимид 7 использовали в описанной ниже реакции без дальнейшей очистки.

мПЭГ-NH₂ с молекулярной массой 5000 Да (мПЭГ-NH₂, 1 г, Sunbio) растворили в ТГФ (50 мл) и полученную смесь охладили до 4°C. Эфир N-гидроксисукцинимид 7 (400 мг, 0,4 ммоль) добавили порциями в условиях активного перемешивания. Смесь перемешивали в течение 3 ч с подогревом до ком-

натной температуры. В смесь добавили воду (2 мл) и удалили растворитель под вакуумом. В остаток добавили CH_2Cl_2 (50 мл), отделили органический слой, высушили над безводным Na_2SO_4 и сократили полученный объем приблизительно до 2 мл. Этот раствор CH_2Cl_2 по каплям добавили в эфир (150 мл). Полученный преципитат собрали и высушили вакуумом.

Пример 28.

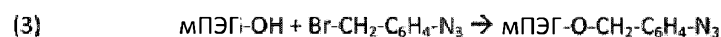
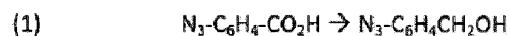
Этот пример иллюстрирует приготовление метансульфонилового эфира полиэтиленгликоля, который также можно называть метансульфонатом или мезилатом полиэтиленгликоля. Соответствующий тозилат и галиды можно приготовить в соответствии с аналогичными процедурами.



мПЭГ-ОН (молекулярная масса = 3400, 25 г, 10 ммоль) в 150 мл толуола дистиллировали азеотропным образом в течение 2 ч в присутствии азота; затем раствор охладили до комнатной температуры. В раствор добавили 40 мл сухого CH_2Cl_2 и 2,1 мл сухого триэтиламина (15 ммоль). Раствор охладили на ледяной бане и добавили по каплям 1,2 мл дистиллированного метансульфонилхлорида (15 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в присутствии азота в течение ночи; реакцию погасили добавлением 2 мл абсолютного этанола. Смесь выпаривали под вакуумом для извлечения растворителей, главным образом, растворителей, кроме толуола, фильтровали, снова подвергли концентрированию под вакуумом, а затем выделили преципитат в 100 мл диэтилового эфира. Фильтрат промыли несколькими порциями холодного диэтилового эфира и высушили в вакууме с получением мезилата.

Мезилат (20 г, 8 ммоль) растворили в 75 мл ТГФ; раствор охладили до 4°C . В охлажденный раствор добавили натрия азид (1,56 г, 24 ммоль). Реакцию нагревали с обратным холодильником в присутствии азота в течение 2 ч. Затем растворители выпарили, а остаток разбавили CH_2Cl_2 (50 мл). Органическую фракцию промыли раствором NaCl и просушили над безводным MgSO_4 . Объем сократили до 20 мл и из приготовленного препарата выделили преципитат путем добавления 150 мл холодного сухого эфира.

Пример 29.



4-Азидобензилалкоголь можно получить в соответствии со способом, описанным в патенте США № 5998595, который включен в настоящее описание путем ссылки. Метансульфонилхлорид (2,5 г, 15,7 ммоль) и триэтиламин (2,8 мл, 20 ммоль) добавили в раствор 4-азидобензилалкоголя (1,75 г, 11,0 ммоль) в CH_2Cl_2 при температуре 0°C ; реакцию поместили в холодильник на 16 ч. В обычных условиях мезилат является бледно-желтым маслом. Это масло (9,2 ммоль) растворили в ТГФ (20 мл) и добавили LiBr (2,0 г, 23,0 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч, затем охладили до комнатной температуры. В смесь добавили воду (2,5 мл) и удалили растворитель под вакуумом. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические фракции промыли насыщенным раствором NaCl (10 мл), просушили над безводным Na_2SO_4 и подвергли концентрации с получением желаемого бромида.

мПЭГ-ОН 20 кДа (2,0 г, 0,1 ммоль, Sunbio) обработали NaN (12 мг, 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл) и в смесь добавили бромид (3,32 г, 15 ммоль) и каталитическое количество KI . Полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 12 ч. В смесь добавили воду (1,0 мл) и удалили растворитель под вакуумом. В остаток добавили CH_2Cl_2 (25 мл), отделили органический слой, высушили над безводным Na_2SO_4 и сократили полученный объем приблизительно до 2 мл. Добавление по каплям в раствор эфира (150 мл) привело к образованию преципитата, который собрали с получением мПЭГ-О- $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}_3$.

Пример 30.



$\text{NH}_2\text{-ПЭГ-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (молекулярный вес 3400 Да, 2,0 г) растворили в насыщенном водном растворе NaHCO_3 (10 мл); раствор охладили до 0°C . 3-Азидо-1- N -гидроксисукцинимидопропионат (5 экв.) добавили в условиях активного перемешивания. Через 3 ч добавили 20 мл H_2O и смесь перемешивали еще 45 мин при комнатной температуре. Уровень pH скорректировали до 3 посредством 0,5н. H_2SO_4 и добавили NaCl до концентрации приблизительно 15 вес.%. Реакционную смесь извлекли посредством CH_2Cl_2 ($100 \text{ мл} \times 3$), просушили над Na_2SO_4 и подвергли концентрации. После преципитации холодным диэтиловым эфиром препарат собрали путем фильтрации и высушили в вакууме с получением омега-карбоксиязидного производного ПЭГ.

Пример 31.



В раствор лития ацетида (4 экв.), приготовленного известным в данной области техники способом и охлажденного до температуры -78°C в ТГФ, добавили по каплям раствор мПЭГ-ОМ, растворенный

в ТГФ в условиях активного перемешивания. После 3 ч реакцию нагрели до комнатной температуры и погасили добавлением 1 мл бутанола. Затем добавили 20 мл H₂O и смесь перемешивали еще 45 мин при комнатной температуре. Уровень pH скорректировали до 3 посредством 0,5н. H₂SO₄ и добавили NaCl до концентрации приблизительно 15 вес.%. Реакционную смесь извлекли посредством CH₂Cl₂ (100 мл × 3), просушили над Na₂SO₄ и подвергли концентрации. После преципитации холодным диэтиловым эфиром препарат собрали путем фильтрации и высушили в вакууме с получением 1-(бут-3-инилокси)метокси-полиэтиленгликоля (мПЭГ).

Пример 32.

Азид- и ацетиленсодержащие аминокислоты можно встраивать сайт-селективным образом в белки, используя способы, описанные L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin et al., Science 301:964-7 (2003)), J.W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J.W. Chin, & P.G. Shultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11): 1135-1137; J.W. Chin et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024; и L. Wang, & P.G. Shultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11. После встраивания аминокислот происходит реакция циклоприсоединения 0,01 мМ белка в фосфатном буфере (ФБ), pH 8, в присутствии 2 мМ производного ПЭГ, 1 мМ CuSO₄ и ~1 мг медного провода в течение 4 ч при температуре 37°C.

Пример 33.

В этом примере описан синтез р-ацетил-D,L-фенилаланина (рАФ) и мПЭГ-гидроксиламиновых производных.

Рацемический рАФ синтезируется в соответствии с процедурой, описанной ранее Zhang, Z., Smith, B.A.C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P.G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746.

Для синтеза мПЭГ-гидроксиламинового производного выполняют описанные ниже процедуры. В раствор (N-t-Вос-аминоокси)уксусной кислоты (0,382 г, 2,0 ммоль) и 1,3-диизопропилкарбодиимида (0,16 мл, 1,0 ммоль) в дихлорметане (ДХМ, 70 мл), который перемешивают при комнатной температуре (КТ) в течение 1 ч, добавляют метоксиполиэтиленгликольамин (мПЭГ-NH₂, 7,5 г, 0,25 ммоль, Mt 30 K, BioVectra) и диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,5 ммоль). Реакцию перемешивают при КТ в течение 48 ч, после чего концентрируют приблизительно до 100 мл. Смесь добавляют по каплям в холодный эфир (800 мл). t-Вос-защищенный препарат осаждают и собирают путем фильтрации, промывают эфиром 3×100 мл. Затем очищают повторным растворением в ДХМ (100 мл) и дважды осаждают в эфире (800 мл). Полученный препарат высушивают в вакууме с получением 7,2 г (96%), что подтверждается ЯМР и тестом на нигидрин. Реакцию защищенного группой deBoc продукта (7,0 г), полученного описанным выше способом, проводят в 50% ТФК/ДХМ (40 мл) при температуре 0°C в течение 1 ч, а затем при КТ в течение 1,5 ч. После удаления большей части ТФК в вакууме соль ТФК и гидроксиламинового производного превращают в соль HCl путем добавления к остатку 4н. HCl в диоксане (1 мл). Преципитат растворяют в ДХМ (50 мл) и повторно осаждают в эфире (800 мл). Конечный продукт (6,8 г, 97%) собирают путем фильтрации, промывают эфиром 3×100 мл, высушивают в вакууме, хранят в присутствии азота. Другие производные ПЭГ (5 K, 20 K) гидроксиламина синтезируют в соответствии с той же самой процедурой.

Пример 34.

Исследование пегилированного релаксина на живых организмах ПЭГ-релаксин, немодифицированный релаксин и буферный раствор вводят мышам или крысам. Результаты покажут более высокую активность и более длительное время полужизни пегилированного релаксина согласно настоящему изобретению по сравнению с немодифицированным релаксином, аналогично, модифицированный релаксин, немодифицированный релаксин и буферный раствор вводят мышам или крысам.

Фармакокинетический анализ.

Полипептид релаксина согласно настоящему изобретению вводят внутривенно или подкожно мышам. У животных берут кровь перед введением дозы и в указанные моменты времени после введения дозы. Плазму собирают для каждого образца и исследуют путем радиоиммунологического анализа. Может быть рассчитан период полувыведения и проведено его сравнение между полипептидами релаксина, содержащими не кодируемую в природных условиях аминокислоту и релаксин дикого типа или различными аналогами полипептидов релаксина согласно настоящему изобретению. Аналогично, полипептиды релаксина согласно настоящему изобретению можно вводить яванским макакам. У животных берут кровь перед введением дозы и в указанные моменты времени после введения дозы. Плазму собирают для каждого образца и исследуют путем радиоиммунологического анализа.

Полипептид можно вводить мышам в виде многократных доз, непрерывной инфузии или однократной дозы и т.п.

Пример 35.

Релаксин экспрессируют с использованием системы экспрессии Novagen (индуцибельный промотор Т7; подробно описанный в Руководстве к системе pET System Manual, версия 9, включенном в настоящую заявку путем ссылки), вектор экспрессии pET30a и штамм экспрессии BL21 (DE3).

2 мл культуры LB/Капатусин (10 мкг/мл) инокулируют на загрузочный планшет BL21 (DE3) после трансформации требуемым аналогом. Это снижает эффекты, вызванные изменением уровней экспрессии

от колонии к колонии. Эту культуру выращивают в течение ночи при температуре 37°C при интенсивном встряхивании, и на следующий день 10 мл культуры LB/Kanamycin инокулируют 1 мл ночной культуры (ОП₆₀₀ ~0,4-0,5). Оставшееся количество ночной культуры может быть заморожено в глицерине для использования в качестве исходного материала.

10 мл выращенной культуры выдерживают при 37°C и 250 об/мин в течение 30-45 мин, пока ОП₆₀₀ не достигнет 0,8-0,9. Затем культуру стимулируют добавлением 1 мМ изопропилтиогалактозида (ИПТГ) (с 1 мл, который может быть отложен в качестве контрольного образца нестимулированной культуры) и обычно собирают в течение 3-4 ч после стимуляции и исследуют методом электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ).

Также возможно получить зависимость экспрессии от времени (например, точки 1, 2, 4, 6 ч после индукции и в течение ночи) для определения скорости накопления, стабильности белка и т.п.

Анализ в геле в необходимый момент времени после индукции: собирают 1 мл культуры, клетки, осажденные центрифугированием, ресуспендируют в 100 мкл 2X ДСН-ПААГ и подвергают воздействию ультразвука для снижения вязкости, 10 мкл исследуют методом электрофореза в полиакриламидном геле. Если требуется, результат можно сравнить с контрольным неиндуцированным образцом или образцами и/или известным положительным контрольным образцом или стандартом, можно оценить уровень экспрессии (например, хорошая экспрессия может наблюдаться при значении >100 мкг/мл). Также может быть использован вестерн-блоттинг. Также возможно отобрать 4 мл культуры, подготовить тельца включения (при экспрессии нерастворимых аналогов) и выполнить их масс-спектрографический анализ для подтверждения идентичности сверхэкспрессированного белка.

Для более масштабной экспрессии белка >250 мл LB/Kanamycin (10 мкг/мл) инокулируют 250 мкл замороженного запаса глицерина и выращиваются в течение ночи. На следующий день 10x1 л культуру LB/Kanamycin инокулируют 25 мл ночной культуры (ОП₆₀₀ ~0,1).

Культуры в количестве 1 л выращивают при 37°C и 250 об/мин ~2 ч, пока ОП₆₀₀ не достигнет значения 0,8-0,9. Затем культуру стимулируют добавлением 1 мМ ИПТГ, собирают в течение 4 ч после стимуляции или на следующее утро (для сбора можно использовать центрифугирование в течение 15 мин при 4000 об/мин). Осадок промывают 50 мМ трис-HCl, pH 8,0 (50 мл на осадок + 50 мл для промывки склянки), если требуется уменьшить количество эндотоксина и облегчить очистку. Осадки собирают вместе и снова центрифугируют.

Пример 36. Исследование экспрессии *Pichia* - приготовление ДНК, электропорация, протоколы экспрессии.

В этом примере представлен протокол для приготовления полипептидов релаксина согласно настоящему изобретению в *Pichia*. Используют SER ID NO: 34, 35, 36 и 37, плазмида может быть использована для клонирования в *Pichia*, эта или другие модифицированные плазмиды могут быть использованы с получением белковой экспрессии полипептидов релаксина в *Pichia*, модификаций плазмиды с использованием способов, известных в этой области.

В день 1 протокола происходит ночное расщепление, обычно с использованием 2 ед. фермента на 1 мкг ДНК, предназначенной для расщепления, и 10 мл культуры YPhyD инокулируют в течение ночи в 50 мл колбу, встряхиваемую при 260 об/мин при 30°C, из запаса глицерина.

Приготовление ДНК.

ДНК осаждают, добавляя сначала 1/10 объема стерильной 3M NaOAc, а затем 0,7 объема стерильного изопропилового спирта (ИПС), после чего образец интенсивно перемешивают и осаждение продолжают на протяжении ночи при -20°C или при -70°C до замерзания. Затем ДНК осаждают центрифугированием (настольная центрифуга, 14000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость удаляют и осадок промывают с использованием 500 мкл стерильного 70% этанола. Затем осуществляют центрифугирование (настольная центрифуга, 14000 об/мин, 10 мин), удаление надосадочной жидкости и воздушную сушку осадка в течение 15-20 мин. Осадок ДНК ресуспендируют в стерильной воде до 1 мкг/мкл и трансформируют *Pichia* 10 микрограммами ДНК.

Электропорация.

Используют ночную культуру с ОП₆₀₀, разбавленную в YPhyD до ОП₆₀₀ = 0,2. Культуру встряхивают при 260 об/мин при 30°C, пока ОП₆₀₀ не достигнет значения 0,8-1,0. Клетки собирают центрифугированием (4000 об/мин, 5 мин). Декантируют среду, промывают клетки в 20 мл ледяной стерильной воды, снова декантируют и повторяют. После промывки осадок промывают в 20 мл 1 М ледяного стерильного сорбита, декантируют и ресуспендируют промытые клетки в 600 мл 1 М ледяном сорбите, затем полученный препарат может храниться на льду.

50 мкл содержимого промытых ячеек осторожно смешивают с 10 мкг линейризованной ДНК в стерильной 1, 5 мл пробирке Эппендорфа и выдерживают на льду в течение 25 мин. Переносят смесь клетки/ДНК в предварительно охлажденную 0,2 см кювету, используя длинные микродозаторы. Клетки подвергают электропорации, используя блок BioRad GenePulsar II со следующими настройками: 2000 В, 200 Ом, 25 мкФ (используйте одиночный импульс) и незамедлительно добавляют 0,5 мл среды YPhyD в кювету и смешивают, используя пипетку. Переносят все содержимое в стерильную пробирку с круглым дном и аккуратно встряхивают (200 об/мин) в течение 30 мин при 30°C. Клетки распределяют равномерно

но в чашки и выдерживают перевернутые чашки в течение 3 дней при 30°C.

После трехдневной инкубации собирают колонии петлей и инокулируют 10 мл среды YPhyD в 50 мл колбу и выдерживают 3 дня при 30°C. Подсчитывают колонии в 20 мкл чашках и записывают среднее количество, затем собирают клетки, предварительно приготовив 2 комплекта криопробирок с этикетками с названием штамма и номером клона, релаксином (т.е. экспрессированным белком) и датой. Переносят культуру в 15 мл коническую трубку, считают ОП₆₀₀ каждой культуры, разбавляют культуру 1:50 или 1:20 в среде YPhyD. Сохраняют аликвоту культуры в качестве исходного материала в глицерине. Затем осаждают дрожжи при 4000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре, переносят надосадочную жидкость в новую 15 мл коническую трубку с этикеткой и хранят при -20 или -80°C до того, как они потребуются для анализа.

Анализ экспрессии белка.

Помещают образцы на гель 4-12% NuPAGE TB (Novex). Проводят анализ с использованием реагентов для ДСН-ПААГ производства Invitrogen посредством вестерн-блоттинга или анализа в геле.

Формулы среды.

Буферная дрожжевая декстроза фитона (YPhyD).

Дрожжевой экстракт 10 г/л

Пептон Phytone™ 20 г/л

1 М буферный фосфат калия (pH 6) 100 мл/л

10X YNB 100 мл/л

20% декстроза 100 мл/л

Дрожжевая декстроза фитона (YPhyD).

Дрожжевой экстракт 10 г/л

Пептон Phytone™ 20 г/л

20% декстроза 100 мл/л

10X YNB (13,4% азотная основа для выращивания дрожжей с сульфатом аммония без аминокислот).

Азотная основа для выращивания дрожжей 134 г/л.

Пример 37. Приготовление релаксина A21G.

В этом примере 4,0 л культуры были ферментированы с получением 13,4 г клеточной суспензии, и приготовление тельца включения было выполнено с и без Triton-X100. Таким образом было получено 2,07 г неочищенных телец включения с последующей солубилизацией и рефолдингом. Тельца включения ресуспендировали в 200 мл H₂O на 1 г (влажная масса) телец включения до конечной концентрации 3 мМ, в продукт ресуспендирования добавляли цистеин. Затем тельца солубилизовали повышением pH до 11,5 в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем осуществляли рефолдинг путем снижения pH солубилизованного материала до 10,6±0,1 и выдерживания при 2-8°C в течение ~72 ч; результаты показаны на фиг. 10. Реакция рефолдинга была остановлена добавлением HCl до окончательного pH 3,0.

0,45 мкМ фильтровали и хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки.

Повторно скрученный белок очищали путем повышения pH нейтрализованной реакционной смеси для рефолдинга до 8,0 трис-основанием и прямой загрузкой в Q-колонку высокого давления. Проводимость загрузки в показанном примере была >3,5 мСм/см. Соблюдали следующие условия: (А) 20 мМ Трис, 8,0; (Б) 20 мМ Трис, 8,0; 200 мМ NaCl, а также 0-100% В выше 30 CV. Добавляли правильно свернутый проинсулин, и 79 мг проинсулина было восстановлено.

Осуществляли ультрафильтрацию/диализацию (УФ/ДФ) и осаждение с использованием 25 мМ цинка, осажденный белок ресуспендировали до концентрации 2 мг/мл с использованием 20 мМ NaOAc, 4,0, 30% ACN, 5 мМ этанола и добавляли 20 К ПЭГ до конечного молярного соотношения 10:1 ПЭГ к белку, после чего смесь выдерживали в течение 48-72 ч при 28°C.

ПЭГ разбавляли 1:10 в буфере А 0,5X ПЭГ А, 0,22 мкМ фильтровали и помещали в колонку 650S СВД. Соблюдали следующие условия: (А) 10 мМ NaOAc, 4,0, 1 мМ этанола; (Б) 10 мМ NaOAc, 4,0, 1 мМ этанола, 0,4 М NaCl; 0-50% В выше 20 CV, образцы ПЭГ в виде 10 мМ натриевого цитрата, 6,5; 150 мМ NaCl, что показано на фиг. 12.

Эти способы использовали для получения различных полипептидов релаксина с не природными аминокислотами и диапазоном конечных количеств белка 0,1-22 мг для очищенных и пегилированных вариантов. Было обнаружено, что аценафтилен способствует солубилизации смеси ПЭГ/белок в реакции с ПЭГ и осаждении цинком при изoeлектрическом концентрировании в присутствии ЦНА.

Пример 38. Клиническое исследование на человеке безопасности и/или эффективности пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту.

Цель: исследование безопасности и фармакокинетики вводимого подкожно пегилированного рекомбинантного релаксина человека, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту.

В исследовании участвовало восемнадцать здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 40 лет и с массой 60-90 кг. Субъекты не имеют клинически значимых аномальных гематологического и биохимического анализа сыворотки, имеют отрицательные результаты скринингового токсикологического анали-

за мочи, исследования на ВИЧ и поверхностный антиген гепатита В. Они не имеют никаких признаков/свидетельств следующего: повышенного кровяного давления; истории какого-либо первичного заболевания крови; истории значительной болезни печени, почечной недостаточности, сердечно-сосудистых, кишечно-желудочных заболеваний, заболеваний мочеполовой системы, метаболических, неврологических заболеваний; истории анемии или эпилепсии; известной чувствительности к бактериальным продуктам или продуктам, полученным от млекопитающих, ПЭГ или сывороточному альбумину человека; обычной и сильной зависимости от напитков, содержащих кофеин; участия в других клинических испытаниях или переливании или сдачи крови в течение 30 дней до начала исследования; введения релаксина в течение трех месяцев до начала исследования; болезни в течение 7 дней до начала исследования и выявления значительных отклонений от нормы при предварительном физическом обследовании или клинической лабораторной оценке в течение 14 дней до начала исследования. Всех субъектов тестируют на безопасность, и все пробы крови для фармакокинетического анализа берутся в соответствии с графиком. Все исследования проводят после разрешения ведомственного этического комитета и при согласии пациента.

Дизайн исследования: описан этап 1 централизованного, открытого, рандомизированного, двухпериодного перекрестного исследования здоровых добровольцев мужского пола. Восемнадцать субъектов назначают случайным образом в одну из двух групп лечения (девять субъектов на группу). Релаксин вводят в течение двух отдельных периодов в виде болюсных подкожных инъекций в верхнюю часть бедра с использованием эквивалентных доз пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, и выбранного серийно выпускаемого продукта. Используют дозу и частоту введения коммерчески доступного продукта, указанные на упаковке продукта. Дополнительное введение, частоту введения или другой желаемый параметр с использованием коммерчески доступного продукта могут быть добавлены к исследованию путем включения дополнительных групп субъектов. Каждый период введения дозы отделяется от других периодов 14-дневным периодом очистки.

Субъекты находятся в исследовательском центре в течение по меньшей мере 12 ч до введения дозы и 72 ч после введения во время каждого из двух периодов введения доз, но не между периодами введения доз. Дополнительные группы субъектов могут быть добавлены, если для пегилированного релаксина также необходимо дополнительно проверить дополнительное дозирование, частоту или другой параметр. Экспериментальным препаратом релаксина является пегилированный релаксин, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту.

Взятие проб крови: кровь берут путем непосредственной венепункции перед и после введения релаксина. Пробы венозной крови (5 мл) для определения концентраций релаксина в сыворотке берут за примерно 30, 20 и 10 мин перед введением дозы (3 эталонных пробы) и приблизительно через следующие периоды времени после введения пробы: 30 мин и 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 и 72 ч. Каждую пробу сыворотки делят на две части. Все пробы сыворотки хранят при температуре -20°C. Пробы сыворотки транспортируют в сухом льду. Клинические лабораторные исследования натошак (гематологические и биохимические анализы и анализы мочи) выполняют непосредственно перед первой дозой в день 1, утром в день 4, непосредственно перед введением дозы в день 16, утром в день 19.

Методы биоанализа: набор для твердофазного ИФА используют для определения концентраций релаксина в сыворотке.

Определение безопасности: основные показатели состояния организма регистрируют непосредственно перед каждым введением дозы (дни 1 и 16) и через 6, 24, 48 и 72 ч после каждого введения дозы. Определение безопасности основано на степени и виде побочных явлений и изменениях в результатах лабораторных анализов по сравнению с эталонными пробами. Дополнительно оценивают отклонения от основных показателей состояния организма, полученных при предварительных исследованиях, включая кровяное давление и результаты физического обследования.

Анализ данных.

Значения концентрации в сыворотке после введения дозы корректируют относительно эталонных концентраций релаксина, полученных перед введением дозы, вычитанием из каждого значения после введения дозы средней эталонной концентрации релаксина, полученной путем усреднения уровней релаксина в трех пробах, взятых за 30, 20 и 10 мин перед введением дозы. Концентрации релаксина в сыворотке перед введением дозы не включают в вычисление среднего значения, если они ниже уровня количественного анализа. Фармакокинетические параметры определяют по данным концентрации в сыворотке, откорректированным по эталонным концентрациям релаксина. Фармакокинетические параметры вычисляют с использованием компьютерной системы Digital Equipment Corporation VAX 8600 независимо от модели, используя последнюю версию программного обеспечения BIOAVL. Определяют следующие фармакокинетические параметры: пиковая сывороточная концентрация (C_{max}); время достижения пиковой сывороточной концентрации (t_{max}); площадь под кривой концентрация-время (AUC) от нулевого момента времени до момента времени взятия последней пробы крови (AUC₀₋₇₂), рассчитанного по правилу линейной трапеции; и конечное время полувыведения ($t_{1/2}$), рассчитанного с использованием постоянной скорости элиминации. Постоянную скорость элиминации определяют линейной регрессией последовательных точек данных в конечной линейной зоне полупологарифмического графика концентра-

ция-время. Среднее значение, стандартное отклонение (CD) и коэффициент вариации (CV) фармакокинетических параметров вычисляют для каждого лечения. Также вычисляют отношение средних значений параметра (сохраняемый состав/несохраняемый состав).

Результаты определения безопасности: степень побочных эффектов распределяется равномерно в группах лечения. Клинически значимые отклонения от эталонных показателей или результатов лабораторных анализов перед исследованием, а также заметные отклонения от результатов физического обследования и измерений основных показателей состояния организма перед исследованиями отсутствуют. Профили безопасности для двух групп лечения оказались близкими.

Фармакокинетические результаты: были определены профили средней концентрации релаксина в сыворотке в зависимости от времени (без коррекции относительно эталонных уровней релаксина) для всех 18 субъектов после получения пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, для каждого момента времени, используемого для измерения. Все субъекты должны иметь эталонные концентрации релаксина перед исследованием в пределах нормального физиологического диапазона. Фармакокинетические параметры определяют на основании данных для сыворотки, скорректированных по средним эталонным концентрациям релаксина перед исследованием, также определяют значения C_{max} и t_{max} . Среднее значение t_{max} для любой выбранной клинической группы (групп) сравнения значительно меньше значения t_{max} для пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту. Значения конечной полужизни значительно меньше доклинической группы(групп) сравнения, чем для пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту.

Хотя настоящее исследование проводят с участием здоровых субъектов мужского пола, следует ожидать, что для других пациентов; таких как пациенты мужского или женского пола с диабетом, пациенты мужского или женского пола с раком или хроническим поражением почек, пациенты детского возраста с почечной недостаточностью, пациенты-участники программ предварительного депонирования аутологических образцов или пациенты, которым назначено плановое оперативное вмешательство, характеристики будут близкими.

В заключение, подкожно вводимые разовые дозы пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, безопасны и хорошо переносятся здоровыми субъектами мужского пола. Исходя из сравнительной степени побочных эффектов, результатов клинических лабораторных исследований, основных показателей состояния организма, и результатов физического обследования, профили безопасности коммерчески доступных видов релаксина и пегилированного релаксина, содержащего не кодируемую в природных условиях аминокислоту, эквивалентны.

Пегилированный релаксин, содержащий не кодируемую в природных условиях аминокислоту, может оказаться в значительной степени полезен пациентам и специалистам в области здравоохранения.

Пример 39. Разработка функционального анализа свойств релаксина.

В этом примере подробно описано функциональное исследование релаксина.

Для демонстрации измеримого повышения цАМФ использовали моноциты периферической крови человека, клетки THP-1, а также положительные контроли с изопротеренолом и форсколином. Клетки THP-1 предварительно инкубировали в 500 мкМ IBMX в течение 30 мин, с сопутствующей стимуляцией релаксином и 2 мкМ форсколина в течение 20 мин. Изопротеренол, форсколин и полипептиды релаксина, включая дикий тип A (с аланином в первом положении аминокислоты В-цепи) и вариант RLX-BA1-AV13pAF (вариант релаксина с каркасной аминокислотной последовательностью с аланином в первом положении аминокислоты В-цепи с заменой на pAF в положении 13 (валин) В-цепи A) с четырьмя ПЭГ различных размеров: 5K, 10K, 20K и 30K.

Таблица 5

Исходные значения EC_{50} функционального анализа [нг/мл]

Проба	11/4/2010	11/5/2010	11/5/2010
RLX-D-WT	1,5	1,5	1,0
RLX-A-WT-001	3,6	3,3	2,6
RLX-A-AQ1-20КПЭГ-001		38	
RLX-A-AA5-20КПЭГ-001		41	
RLX-A-AV13-20КПЭГ-001		56	
RLX-A-AR18-20КПЭГ-001		68	
RLX-A-BV7-20КПЭГ-001	54		
RLX-A-BA18-20КПЭГ-001	172		
RLX-A-BW28-20КПЭГ-001	172		
RLX-A-BE5-20КПЭГ-001			45
RLX-D-BE5-20КПЭГ-001			58
RLX-D-AL2-20КПЭГ-001			43

Пример 40.

В этом примере описана оценка фармакокинетических свойств пегилированных полипептидов релаксина с ПЭГ массой 20 кДа после однократной подкожной инъекции крысам СД.

Крысы Спрага-Дули (СД) были получены из лабораторий Charles River (CRL) в возрасте приблизительно 7-8 недель (приблизительно 280 г в начале испытаний).

Животные были получены с яремной веной, катетеризированной в лаборатории. Затем животных акклиматизировали в течение трех дней перед использованием для исследований.

Животные получали однократную подкожную инъекцию в день 1, и пробы для фармакокинетического анализа собирали в течение последующих 80 ч. У животных, которым вводили ПЭГ-релаксин, брали пробы крови для анализа концентрации в сыворотке в соответствии со следующим графиком взятия проб (время взятия пробы приблизительное).

День 1: перед введением дозы, 1, 2, 4, 8, 12, 25, 34, 50, 58, 73 и 80 ч после введения дозы.

Концентрации соединения с использованием электрохемиллюминесцентного анализа на основе анализа, разработанного в Ambrx. Концентрации рассчитывали с использованием стандартной кривой, полученной путем введения соответствующих доз соединений, и представляли в формате электронной таблицы excel (см. приложение). Фармакокинетические параметры определяли с использованием программы моделирования WinNonlin (Pharsight, версия 5.1). Использовали некомпартментный анализ данных для данных отдельного животного с интегрированием трапециями с линейным верхом/логарифмическим низом, концентрации имели равные веса. Компартментный анализ выполняли с использованием двух-компартментной модели элиминации 1-го порядка и эмпирического уравнения Гаусса-Ньютона (Левенберга-Харлея) для модели. В табл. 6 показаны групповые средние значения сывороточной концентрации ПЭГ-релаксина в зависимости от времени. На фиг. 8 показано сравнение групповой средней сывороточной концентрации в зависимости от времени для всех композиций с дозами ПЭГ-релаксина. Все группы доз имели измеримые уровни ПЭГ-релаксина в сыворотке.

График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени на фиг. 9 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-AQ1-RLX. График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени на фиг. 10 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-AA5-RLX. График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени был построен на фиг. 11 для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-AR18-RLX. График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени на фиг. 12 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-BV7-RLX. График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени был фиг. 13 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-BW28-RLX. График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени на фиг. 14 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг ПЭГ20К-AV13.

Данные некомпартментного анализа зависимости сывороточной концентрации от времени для животных с подкожным введением приведены табл. 6.

Таблица 6

Средняя концентрация в сыворотке для крыс СД после введения однократной дозы ПЭГ-релаксина

Группа	Предмет исследования	Доза (мг/кг)	Введение	Пол	Время (час)	Средняя концентр. (нг/мл)	СО (нг/мл)	N
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	1	30,8	19,4	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	2	87,4	25,2	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	4	184,8	50,2	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	8	237,6	61,9	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	12	371,2	106,1	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	25	394,0	50,1	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	34	278,7	59,1	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	50	63,4	11,9	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	58	45,6	6,8	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	73	20,3	5,6	5
1	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	80	11,6	1,3	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	1	19,9	6,4	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	2	100,1	51,8	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	4	185,0	104,8	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	8	264,7	128,0	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	12	434,3	135,0	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	25	438,0	55,2	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	34	353,5	44,2	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	50	86,9	19,1	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	58	62,4	10,6	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	73	32,8	8,1	5
2	20КПЭГ-AA5	0,5	Подкожно	Самец	80	22,1	5,4	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	1	33,9	17,3	5

3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	2	109,7	32,9	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	4	172,7	48,2	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	8	270,5	55,3	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	12	332,5	57,7	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	25	398,6	37,6	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	34	264,3	33,8	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	50	76,7	6,9	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	58	61,8	9,0	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	73	25,0	4,8	5
3	20КПЭГ-AR18	0,5	Подкожно	Самец	80	14,9	3,7	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	1	25,7	4,6	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	2	98,9	20,1	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	4	248,5	75,5	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	8	343,5	81,8	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	12	457,3	91,0	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	25	518,5	57,7	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	34	270,4	64,5	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	50	104,0	14,8	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	58	63,5	8,1	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	73	26,0	3,1	5
4	20КПЭГ-BV7	0,5	Подкожно	Самец	80	22,6	2,6	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	1	36,4	15,4	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	2	107,9	61,5	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	4	228,5	86,0	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	8	380,9	144,0	5

5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	12	486,6	135,4	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	25	511,0	60,3	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	34	404,8	51,2	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	50	184,2	31,3	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	58	122,3	37,2	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	73	48,8	6,1	5
5	20КПЭГ-BW28	0,5	Подкожно	Самец	80	37,1	5,1	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	1	44,9	16,8	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	2	138,9	60,1	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	4	345,7	117,1	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	8	533,6	157,4	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	12	630,1	201,2	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	25	742,5	117,4	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	34	540,7	31,0	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	50	320,9	21,3	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	58	209,4	22,5	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	73	75,0	4,8	5
6	20КПЭГ-AV13	0,5	Подкожно	Самец	80	58,7	7,7	5

НО - не определено; НУКО - ниже уровня количественного определения;
ПВД - перед введением дозы.

Таблица 7

	AQ1- RLX	AA5- RLX	AR18- RLX	BV7- RLX	BW28- RLX	AV13- RLX
Конечное время полужизни (ч)	10,7	12,2	12,5	13,1	13,9	14,6
C _{max} (нг/мл)	394,0	438,0	345,9	471,6	511,0	742,5
T _{max} (ч)	25,0	25,0	25,0	12,0	25,0	25,0
AUC _{inf} (нг*ч/мл)	14237,9	16095,9	12985,5	17260,9	22191,2	32230,5
V _z (мл/кг)	540,7	547,4	694,7	546,9	452,6	325,4
CL (мл/ч)	35,1	31,1	38,4	28,9	22,5	15,5
MRT (ч)	26,7	29,4	27,7	27,9	31,1	32,7

Кривые зависимости концентрации от времени оценивали с использованием некомпартментного анализа (Pharsight, версия 4.1). N=5 крыс на группу, конечное время полужизни (HL); C_{max}, максимальная сывороточная концентрация измерены; T_{max}, время наблюдения C_{max}; AUC_{inf}, площадь под кривой концентрация-время для всех проб сыворотки/моменты времени, экстраполированные на бесконечность; CL, кажущийся полный сывороточный клиренс; V_z, кажущийся объем распределения во время конечной фазы.

Растворы доз измеряли с использованием методов электрохемиллюминесцентного анализа, используемых для измерения концентрации в сыворотке. Растворы доз разбавляли таким образом, чтобы концентрации находились в пределах аналитического диапазона. Все растворы доз 20КПЭГ-RLX были в пределах указанного 30% отклонения от теоретического значения (PDT). В табл. 8 ниже приведены резуль-

таты анализа растворов доз для данного исследования.

Таблица 8

Перед введением дозы в буфере (DSA1)	Номин. концен. (нг/мл)	Коэф. разбавл.	Концен. (нг/мл)	% PDT
RLX A-AQ1-20K ПЭГ	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K ПЭГ	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K ПЭГ	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K ПЭГ	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K ПЭГ	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K ПЭГ	500000	20000	571645	14

Пример 41.

В этом примере описана оценка фармакокинетических свойств композиции релаксина дикого типа (WT, ДТ) после однократной подкожной инъекции крысам СД. Крысы СД были получены из лабораторий Charles River (CRL) в возрасте приблизительно 5 недель (приблизительно 280 г в начале испытаний). Животные были получены с яремной веной, катетеризированной в лаборатории. Затем животных акклиматизировали в течение трех дней перед использованием для исследования. Животные получали однократную подкожную инъекцию в день 1, и пробы для ФК анализа собирали в течение последующих 12 ч. Пробы крови брали у животных, которым вводили ДТ релаксин для анализа концентрации в сыворотке в соответствии со следующим графиком взятия проб (время взятия пробы приблизительное): день 1: перед введением дозы; 0,33; 0,66; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 9 и 12 ч после введения дозы. Концентрации соединения измеряли с использованием электрохемиллюминесцентного анализа на основании анализа, разработанного в Ambrx. Концентрации рассчитывали с использованием стандартной кривой, полученной путем введения соответствующих доз соединений, и представляли в формате электронной таблицы excel (см. приложение). Фармакокинетические параметры определяли с использованием программы моделирования WinNonlin (Pharsight, версия 5.1). Использовали некомпартментный анализ данных для данных отдельного животного с интегрированием трапециями с линейным верхом/логарифмическим низом, концентрации имели равные веса.

В табл. 9 показаны групповые средние значения сывороточной концентрации рекомбинантного человеческого релаксина ДТ в зависимости от времени. На фиг. 1 приведено сравнение групповых средних значений сывороточной концентрации рекомбинантного человеческого релаксина ДТ в зависимости от времени. Все животные имели измеримые уровни релаксина в сыворотке.

График зависимости значений индивидуальных сывороточных концентраций от времени на фиг. 2 построен для животных, которым вводили подкожно 0,5 мг/кг релаксин ДТ. Данные некомпартментного анализа зависимости сывороточной концентрации от времени для животных с введенной подкожно дозой приведены в табл. 2. В табл. 9 приведены данные анализа растворов доз. Растворы доз отвечают критериям приемлемости, т.е. ниже или равны 30% PDT.

Таблица 9

Группа	Предмет исследования	Доза (мг/кг)	Введение	Пол	Время (час)	Средняя концентрация (нг/мл)	СО (нг/мл)	Кол.
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	0,33	244,0	18,7	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	0,66	227,9	45,6	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	1	211,7	45,9	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	1,5	166,7	38,7	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	2	119,9	24,5	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	3	52,5	23,0	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	4	24,1	11,4	5
1	Рекомбинантный человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожно	Самец	5	7,7	2,6	5

	человеческий релаксин ДТ							
1	Рекомбинантн ый человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожн о	Самец	6	BQL	NE	5
1	Рекомбинантн ый человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожн о	Самец	9	BQL	NE	5
1	Рекомбинантн ый человеческий релаксин ДТ	0,5	Подкожн о	Самец	12	SQL	NE	5

НО - не определено; НУКО - ниже уровня количественного определения;
ПВД - перед введением дозы.

Таблица 10

Значения фармакокинетических параметров для рекомбинантного человеческого релаксина ДТ,
вводимого крысам СД

	Рекомбинантный человеческий
Конечное время ПЖ(ч)	0,8 (0,1)
$C_{\max}$ (нг/мл)	258,1(26,1)
$T_{\max}$ (ч)	0,5 (0,2)
$AUC_{\inf}$ (нг*ч/мл)	508,9 (81,8)
V_z (мл/кг)	1159 (284)
CL (мл/ч)	1006(185)
MRT (ч)	1,56 (0,16)

Кривые зависимости концентрации от времени оценивали с использованием некомпартментного анализа (Pharsight, версия 4.1). N=5 крыс на группу, конечное время полужизни (HL); $C_{\max}$, максимальная сывороточная концентрация измерены; $T_{\max}$, время наблюдения $C_{\max}$; $AUC_{\inf}$, площадь под кривой концентрация-время для всех проб сывотки/моменты времени, экстраполированные на бесконечность; CL, кажущийся полный сывоточный клиренс; V_z , кажущийся объем распределения во время конечной фазы. Числа показывают средние значения со стандартным отклонением (CO) в скобках (табл. 11). Растворы доз были измерены с использованием электрохемилюминисцентных методов, используемых для измерения концентрации в сывотке. Растворы разбавляли таким образом, чтобы концентрации находились в пределах аналитического диапазона. Все растворы рекомбинантного человеческого релаксина ДТ находятся в пределах указанного 30% отличия от теоретического значения (PDT). В табл. 3 сведены результаты анализов растворов дозы для настоящего исследования.

Таблица 11

Анализы растворов дозы экспериментального препарата					
Анализ раствора дозы	Номин. концен. (нг/мл)	Коэф. разбавл.	Концен. (нг/мл)	% PDT	
0,5 мг/мл перед введением дозы в буфере (DSA1)	250000	10000	208830	-16	
0,5 мг/мл Перед введением дозы в сыворотке (DSA2)	250000	10000	225898	-10	

Пример 42.

В этом примере описана оценка фармакокинетических свойств соединения пегилированного релаксина с ПЭГ массой 20 кДа после однократной подкожной инъекции крысам СД.

Крысы СД были получены из лабораторий Charles River (CRL) в возрасте приблизительно 7-8 недель (приблизительно 280 г в начале испытаний). Животные были получены с яремной веной, катетеризированной в лаборатории. Затем животных акклиматизировали в течение трех дней перед использованием для исследования.

Животные получали однократную подкожную инъекцию в день 1, и ФК пробы были собраны в течение последующих 82 ч. Пробы крови брали у животных, которым вводился ПЭГ-релаксин для анализа концентрации в сыворотке в соответствии со следующим графиком взятия проб (время взятия пробы приблизительное): день 1: перед введением дозы, 1, 3, 5, 10, 25, 34, 48, 58, 72 и 82 ч после введения дозы,

Концентрации композиции были измерены с использованием электрохемилуминесцентного анализа на основании анализа, разработанного в Ambrx.

Концентрации рассчитывали с использованием стандартной кривой, полученной путем введения соответствующих доз соединений, и представляли в формате электронной таблицы excel (см. приложение). Фармакокинетические параметры определяли с использованием программы моделирования WinNonlin (Pharsight, версия 5.1). Использовали некомпартментный анализ данных для данных отдельного животного с интегрированием трапециями с линейным верхом/логарифмическим низом, концентрации имели равные веса. Компартментный анализ выполняли с использованием двухкомпартментной модели элиминации 1-го порядка и эмпирического уравнения Гаусса-Ньютона (Левенберга-Харлея) для модели.

В табл. 12 показаны групповые средние значения сывороточной концентрации ПЭГ-релаксина в зависимости от времени.

Таблица 12

Группа	Предмет исследования	Доза (мг/кг)	Введение	Пол	Время (час)	Средняя концентрация (нг/мл)	СО (нг/мл)	N
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	ПВД	НУКО	НО	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	1	2912,8	203,7	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	3	1310,8	115,2	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	5	700,7	68,3	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	10	241,6	27,2	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	25	61,2	5,4	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	34	27,0	2,6	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	48	13,7	2,2	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	58	8,0	2,2	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	72	4,3	1,4	4
1	20КПЭГ-AQ1	0,25	Внутривенно	Самец	82	2,2	0,6	4
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	1	16,3	4,4	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	3	75,8	20,2	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	5	96,3	26,7	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	10	135,1	30,1	5

2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	25	257,4	48,5	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	34	184,9	26,8	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	48	159,9	31,7	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	58	86,5	24,6	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	72	20,3	1,4	5
2	20КПЭГ-AQ1	0,5	Подкожно	Самец	82	11,8	1,1	5
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	1	12,8	1,3	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	3	45,3	6,9	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	5	62,2	8,6	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	10	90,1	10,9	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	25	127,4	20,2	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	34	83,2	13,8	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	48	32,6	2,6	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	58	16,3	0,3	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	72	4,9	0,9	3
3	20КПЭГ-AQ1	0,25	Подкожно	Самец	82	2,7	0,4	3
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	ПВД	НУКО	НО	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	1	5,7	1,5	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	3	26,4	6,2	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	5	37,2	8,6	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	10	50,1	6,1	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	25	75,9	8,8	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	34	46,9	6,7	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	48	20,8	8,2	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	58	8,4	2,4	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	72	2,3	0,8	5
4	20КПЭГ-AQ1	0,125	Подкожно	Самец	82	1,3	0,4	5

НО - не определено; НУКО - ниже уровня количественного определения;
ПВД - перед введением дозы.

Пример 43.

В данном примере описано определение фармакологически активной дозы и системного действия релаксина дикого типа и варианта ПЭГ-релаксина у самок крыс линии Лонг Эванс.

Целью данных исследований по генерации сигнала было установление активности *in vivo* и определение фармакологически активной дозы варианта ПЭГ-релаксина. Для достижения данных целей осуществляли оценку физиологически значимых конечных точек, зависящих от релаксина, у самок крыс линии Лонг Эванс, в том числе потребления воды, диуреза и некоторых параметров клинического анализа мочи и крови. Для идентификации конечных точек кандидатов релаксин дикого типа тестировали в начале (фаза 1) в дозах, рассчитанных на достижение концентраций в плазме 0,3X, 1X и 10X при целевом ингибировании *in vitro*. Целевые дозы вводили путем боюстной внутривенной инъекции (BV), после чего следовала 6-часовая непрерывная инфузия. Дозы релаксина дикого типа 0,3X, 1X и 10X вызывали увеличение потребления воды на 95, 68 и 32%, соответственно, по сравнению с контрольной группой. Изменение средних концентраций натрия в плазме по сравнению с исходным уровнем на 2-м и 6-м часу составляли - 9,5 и 1,2 мэкв./л для контрольной группы (0X); -5,8 и -9,0 мэкв./л для дозы 0,3X; 1,0 и -1,5 мэкв./л для

дозы 1X; -4,7 и -1,4 мэкв./л для дозы 10X. Изменения осмолярности плазмы относительно исходного уровня на 2-м и 6-м часах составляли -20,7 и 1,0 мосмоль/кг воды для контрольной группы (0X); -11,0 и -19,1 мосмоль/кг воды для дозы 0,3X; 0,3 и -4,4 мосмоль/кг воды для дозы 1X; -10,3 и -3,8 мосмоль/кг воды для дозы 10X. ПЭГ-релаксин (фаза 2) вводили болюсным объемом 1 мл на 1 г массы тела, забор крови осуществляли через 2 и 6 ч после введения, а мочу собирали через 6 ч после введения. Лечение ПЭГ-релаксином в дозах 0,1X, 0,3X и 1X приводило к возрастанию потребления воды на 93, 128 и 105% по сравнению с контрольной группой. Изменения средней концентрации натрия в плазме по сравнению с исходным уровнем на 2-м и 6-м часах составляли 2,5 и 1,5 мэкв./л для контрольной группы (0X); -1,5 и -4,8 мэкв./л для дозы 0,1X; -4,0 и -2,9 мэкв./л для дозы 0,3X; -2,3 и -4,0 мэкв./л для дозы 1X. Изменения осмолярности плазмы относительно исходного уровня на 2-м и 6-м часах составляли 4,5 и 2,1 мосмоль/кг воды для контрольной группы (0X); -5,1 и -11,0 мосмоль/кг воды для дозы 0,1X; -8,2 и -5,0 мосмоль/кг воды для дозы 0,3X; -5,6 и -9,5 мосмоль/кг воды для дозы 1X. Явные изменения в показателях клинического анализа мочи после лечения релаксином дикого типа или ПЭГ-релаксином отмечены не были. Эти данные подтверждают действие *in vivo* и определяют рациональную дозу для последующих исследований модели заболевания *in vivo* с использованием ПЭГ-релаксина.

Таблица 13

Распределение животных по группам

Группа	Исследуемый препарат	Идентификационный код животного	Концентрация в плазме (множитель целевого значения)	Концентрация дозы для болюсного внутривенного введения (мг/мл)	Концентрация дозы для внутривенной инфузии (мг/мл) ^c	Количество животных в группе
Фаза 1 Дозы релаксина дикого типа^a						
1	Релаксин дикого типа	1F001-1F004	1X	0,003	0,08	4
2	Релаксин дикого типа	2F001-2F004	10X	0,03	0,8	4
3 ^b	Релаксин дикого типа	3F001-3F004	Инертное вещество	Инертное вещество	Инертное вещество	4
4 ^b	Релаксин дикого типа	4F001-4F004	0,3X	0,001	0,026	4

^a Группы 1 и 2 (1X и 10X) оценивали первыми, поэтому действие исследуемого препарата на потребление питьевой воды, гематокрит и диурез было несомненным, дозы для второго набора крыс были скорректированы для инертного вещества и концентрации 0,3X в группах 3 и 4 соответственно. Между группами 1 и 2 имелся период вымывания не менее 36 ч. Период вымывания не менее 36 ч выдерживали также между группами 3 и 4.

^b Крысы в группе 1 прошли вторую рандомизацию и были распределены в группу 2 после периода вымывания. Крысы в группе 3 прошли вторую рандомизацию и были распределены в группу 4. Номера животных 001-004 в группе 2 и 4 остались такими же, какими были в группе 1 и 3; однако обозначения номеров групп, группа 2 и групп 4, использовались на этикетках пробирок и для обеспечения четкой идентификации образцов.

^c Релаксин дикого типа вводили внутривенно, в болюсном объеме 100 мкл, после чего осуществляли инфузию со скоростью 50 мкл/ч.

Таблица 14

Группа	Исследуемый препарат	Идентификационный код животного	Концентрация в плазме (множитель значения)	Концентрация дозы для болюсного внутривенного введения (мг/мл) ^a	Количество животных в группе
Фаза 2 Введение ПЭГ-релаксина					
5	ПЭГ-релаксин	5F001-5F004	Инертное вещество	Нет	4
6	ПЭГ-релаксин	6F001-6F004	0,3X	0,03	4
7	ПЭГ-релаксин	7F001-7F004	0,1X	0,01	4
8	ПЭГ-релаксин	8F001-8F004	1,0X	0,1	4

^a Болюсная доза была введена из расчета 1 мкл/г массы тела.

Фаза 1. Релаксин дикого типа.

Самки крыс линии Лонг Эванс возрастом 12-14 недель с хирургически имплантированными поставщиком двухпросветными катетерами в яремной вене были приобретены в Charles River Laboratories. Использовали два набора по четыре крысы. Каждый комплект использовали для оценки двух доз релаксина дикого типа. Между группами 1 и 2 и группами 3 и 4 выдерживали период вымывания не менее 36 ч, поскольку крысы из групп 1 и 3 повторно использовали в группах 2 и 4 соответственно. Крысы имели неограниченный доступ к еде и воде, их содержали в системе метаболических клеток Culex ABS (автоматический прибор для взятия образцов крови Culex, Bioanalytical System Inc) в ночь перед началом введения препарата и через 6 ч после внутривенного болюсного введения и начала инфузии.

Фаза 1. Введение релаксина дикого типа.

В фазе 1 каждой крысе вводили разовый внутривенный болюс и в течение 6 ч осуществляли внутривенную инфузию. Внутривенное болюсное ведение осуществляли через хирургически имплантированный катетер в яремной вене, последующую внутривенную инфузию осуществляли также через хирургически имплантированный катетер в яремной вене. Между группами 1 и 2 в первом наборе крыс и группами 3 и 4 во втором наборе крыс выдерживали не менее чем период вымывания не менее 36 ч.

Фаза 2. ПЭГ-релаксин.

Самки крыс линии Лонг Эванс возрастом 12-14 недель с хирургически имплантированными поставщиком двухпросветными катетерами в яремной вене были приобретены у Charles River Laboratories. Использовали четыре набора по четыре крысы, каждый набор использовали для оценки одной дозы ПЭГ-релаксина. Крыс, получающих ПЭГ-релаксин, не использовали повторно с применением периода вымывания вследствие длительного воздействия на плазму пегилированных соединений. Крысы имели неограниченный доступ к еде и воде, их содержали в системе метаболических клеток Culex ABS.

Фаза 2. Введение дозы ПЭГ-релаксина.

В фазе 2 крысам вводили разовый внутривенный болюс через хирургически имплантированные катетеры в яремной вене.

Все растворы для болюсного и внутривенного введения были изготовлены в соответствии с инструкциями по размораживанию и смешиванию для растворов всех доз.

Замороженный флакон с образцом каждой дозы размораживали при 4°C в течение 3- 4 ч, контроль процесса размораживания осуществляли каждый час. После завершения размораживания препарат осторожно перемешивали, следя за тем, чтобы не образовались пузыри. Каждый препарат тщательно и аккуратно перемешивали непосредственно перед внутривенным введением. Каждую дозу хранили при температуре 4°C до ее использования.

Дозы готовили перед самым введением, и каждой группе вводили следующие концентрации:

Фаза 1 (Группы 1-4)	Группа 1: (1X) Внутривенный болюс 0,003 мг/мл, Внутривенная инфузия 0,08 мг/мл Группа 2: (10X) Внутривенный болюс 0,03 мг/мл, Внутривенная инфузия 0,8 мг/мл Группа 3: (инертное вещество) Болюс и инфузия Группа 4: (0,3X) Внутривенный болюс 0,001 мг/мл, Внутривенная инфузия 0,026 мг/мл
Фаза 2 (Группы 5-8)	Группа 5: Инертное вещество Внутривенный болюс Нет Группа 6: (0,3X) Внутривенный болюс 0,03 мг/мл Группа 7: (0,1X) Внутривенный болюс 0,01 мг/мл Группа 8: (1,0X) Внутривенный болюс 0,1 мг/мл

Животных, используемых в данном исследовании, отбирали на основании параметров массы тела, доступности катетера яремной вены и функциональности, соответствующих требованиям. Животные с катетерами, непригодными для введения или отбора образцов крови, выявленные до начала исследования или во время введения, следующего за периодом взятия образца крови, заменялись крысами с нормальными катетерами. Замену крыс с катетерами и введение препарата осуществляли как можно раньше, в зависимости от режима введения, занятости персонала и получения крыс от поставщика.

Фаза 1: животные были рандомизированы в соответствии с массой тела до начала исследования и распределены в группу 1. После завершения введения крысы в группе 1 прошли вторую рандомизацию после периода вымывания и были повторно распределены в группу 2. После завершения введения крысы в группе 3 подверглись второй рандомизации после периода вымывания и были распределены в группу 4.

Фаза 2: животные были рандомизированы в соответствии с массой тела до начала исследования и назначены в группы 5-8.

Ежедневно через приблизительно 30 мин и 1, 2, 4 и 6 ч после начала введения осуществляли визуальный контроль физических и поведенческих изменений и животных проверяют на наличие изменений в положении тела, шерстяном покрове, активности, экскрементах и т.д. До начала введения осуществляют стандартное измерение и регистрацию массы тела.

Взятие, сбор, обработка и анализ крови и мочи.

Фаза 1. Протокол исследования.

Сбор мочи на исходном уровне начинали в ночь перед введениями доз, продолжался на протяжении 15-18 ч и осуществлялся в охлажденную (водным льдом) пробирку. Образцы крови на исходном уровне (~400 мкл цельной крови) собирались в конце сбора мочи исходного уровня. В день эксперимента крысам делали внутривенную болюсную инъекцию исследуемого препарата, после чего проводилась постоянная инфузия релаксина дикого типа с постоянной скоростью введения, с помощью шприцевого насоса (Harvard 11 plus) в течение 6 ч через катетер левой яремной вены со скоростью 50 мкл/ч. Два дополнительных образца крови (по 400 мкл цельной крови каждый) брались на 2-м и 6-м часах последующей инфузии релаксина. Взятие всех образцов крови осуществлялось через катетер правой яремной вены в пробирки для отбора образцов, содержащие антикоагулянт K₃EDTA, с использованием программируемого способа взятия проб Culex ABS, образцы хранились в охлажденной среде до обработки. Моча постоянно собиралась в охлажденную пробирку в течение всего периода инфузии релаксина. Общий объем мочи от каждого забора записывался, и 2-5 мл каждого образца хранились в морозильной камере Seventh Wave Labs при температуре приблизительно -80°. Потребление воды в течение 6-часовой инфузии определялось путем сравнения веса бутылки с водой до и после инфузии. Инфузионный насос останавливался через 6 ч постоянной инфузии, и крысы переходили в 36-часовой период вымывания перед тем, как пройти оценку второй дозы. Для поддержания целевой стабильной концентрации препарата в плазме требовалась постоянная внутривенная инфузия.

Фаза 2. Протокол исследования.

Сбор мочи на исходном уровне начинался в ночь перед введением дозы в течение 15-18 ч, образцы собирались в охлажденную пробирку. Образцы крови на исходном уровне (~400 мкл цельной крови) собирались в конце сбора мочи исходного уровня. В день эксперимента крысам вводилась однократная доза ПЭГ-релаксина внутривенно, ее объем не превышал 10 мл/кг в день (разовая доза). Два дополнительных образца крови (~400 мкл цельной крови) брались на 2-м и 6-м часах последующей инфузии релаксина. Взятие всех образцов крови осуществлялось через катетер правой яремной вены в пробирки для отбора образцов, содержащие антикоагулянт K₃EDTA, с использованием программируемого способа взятия проб Culex ABS, образцы хранились в охлажденной среде до обработки. Образцы мочи постоянно собирались в течение периода 0-6 ч после введения ПЭГ-релаксина в охлажденную пробирку. Общий объем мочи от каждого забора записывался, и 2-5 мл каждого образца хранилось в морозильной камере Seventh Wave Labs при температуре приблизительно -80°. Крысы умерщвлялись через 6 ч после введения. Потребление воды в течение 6-часовой инфузии определялось путем сравнения веса бутылки с водой в начале и после инфузии.

Патология.

Сбор образцов мочи осуществляли в соответствии с описанием в данном примере. 2-5 мл охлажденных образцов мочи замораживали в сухом льде и хранили в морозильнике при температуре приблизительно -80°C до помещения на сухом льде в анализатор AVL для анализа креатинина и АМК мочи с целью определения клиренса креатинина. Образец крови брали с помощью Culex ABS с использованием K₃EDTA в качестве антикоагулянта. Пятнадцать микролитров образцов цельной крови помещали в необработанные капиллярные трубки, запечатывали глиной с одного конца и центрифугировали 5 мин в гематокритной центрифуге (центрифуга IEC MB производства International Equipment Company). Результаты гематокрита получали с помощью устройства определения гематокрита, предоставленного производителем. Образцы крови собирали для возможного определения системного действия релаксина дикого типа и ПЭГ-релаксина в соответствии с графиком отбора образцов и процедурами, описанными ниже. Применяли три интервала сбора образцов. Образцы собирали через 0, 2 и 6 ч после введения для крыс фазы 1 и фазы 2.

Фаза 1: 8 животных на каждый момент сбора.

Фаза 2: 16 животных на каждый момент сбора.

Объем забора составлял приблизительно 400 мкл цельной крови. Отбор крови у всех животных групп 1-8 осуществляли в трех временных точках: на исходном уровне (до введения, $t=0$), через 2 и через 6 ч после начала инфузии в группе внутривенного введения релаксина дикого типа и после внутривенного введения в группе ПЭГ-релаксина соответственно. Время начала внутривенной инфузии и фактическое время каждого забора крови регистрировали в данных на каждое животное. По решению спонсора кровь во время исследования не отправляли в Ambrix для определения системного действия. Образцы хранили замороженными в морозильной камере Seventh Wave Labs при температуре приблизительно -80°C и возвращали спонсору.

Фаза 1 результаты по релаксину дикого типа.

Среднее потребление воды во время 6-часовой инфузии у крыс, лечившихся инертным веществом (0X), составляло 1,8 мл на 100 г массы тела и возрастало до 3,6, 3,1 и 2,4 мл на 100 г массы тела у крыс, лечившихся дозами релаксина дикого типа 0,3X, 1X и 10X соответственно. Увеличение составляло 95, 68, 32% в группах доз 0,3X, 1X и 10X, соответственно, по сравнению с инертным веществом. Средний гематокрит на исходном уровне через 2 и 6 ч после начала введения составлял 35,1, 35,0 и 34,3% у крыс, лечившихся инертным веществом соответственно; 33,1, 33,7 и 32,3% в группе 0,3X; 31,4, 32,0 и 33,7% в группе 1X; 29,7, 31,9 и 30,4% в группе 10X.

Средний диурез во время 6-часовой инфузии составлял 1,8, 1,5, 1,2 и 1,2 мл на 100 г массы тела для контрольной группы (0X), групп 0,3X, 1X и 10X соответственно. Средняя концентрация натрия в плазме на исходном уровне через 2 и 6 ч после начала введения составляла 139,3, 129,8, 140,5 мэкв./л в контрольной группе (0X); 141,8, 136,0 и 132,8 мэкв./л в группе 0,3X; 138,8, 139,8 и 137,3 мэкв./л в группе 1X; 137,0, 132,3 и 135,6 мэкв./л в группе 10X. Изменение относительно исходного уровня через 2 и 6 ч составляли -9,5 и 1,2 мэкв./л для контрольной группы (0X); -5,8 и -9,5 мэкв./л в группе 0,3X; 1,0 и -1,5 мэкв./л в группе 1X; -4,7 и -1,4 мэкв./л в группе 10X.

Осмолярность плазмы рассчитывалась по следующему уравнению: осмолярность (OSM) = $(2 * \text{Na}) + (\text{глюкоза}/18) + (\text{AMK}/2,8)$. Средняя осмолярность плазмы на исходном уровне через 2 и 6 ч после начала составляла 277,3 мосмоль/кг воды в группе 0,3X; 291,0, 291,3 и 286,6 мосмоль/кг воды в группе 1X; 286,4, 276,1 и 282,6 мосмоль/кг воды в группе 10X. Изменение относительно исходного уровня через 2 и 6 ч составляло -10,7 и 1,0 мосмоль/кг воды для контрольной группы (0X); =11,0 и =19,1 мосмоль/кг воды для дозы 0,3X; 0,3 и -4,4 мосмоль/кг воды для дозы 1X; -10,3 и -3,8 мосмоль/кг воды для дозы 10X. Данные клинического анализа мочи - АМК/Кр, выделение Na - представлены в таблице ниже.

Таблица 3

Обзор данных клинического анализа мочи по релаксину дикого типа (первая фаза исследования)

Группы	АМК/Кр	Стандартная ошибка среднего	Выделение Na (мэкв/час)	Стандартная ошибка среднего	Выделение АМК (мг/час)	Стандартная ошибка среднего	Клиренс креатинина на (мл/мин/100 г)	Стандартная ошибка среднего
Контрольная (исходный уровень)	36	12	0,083	0,010	13,5	4,4	0,65	0,04
Контрольная (6 часов исследования)	26	3	0,079	0,018	9,4	2,3	0,60	0,15
0,3X (исходный уровень)	66	9	0,055	0,005	17,3	3,9	0,38	0,06
0,3X (6 часов исследования)	43	6	0,071	0,015	12,1	1,3	0,45	0,07
1X (исходный уровень)	18	2	0,046	0,010	7,6	1,5	0,62	0,09
1X (6 часов исследования)	19	4	0,030	0,003	4,6	1,5	0,36	0,05
10X (исходный уровень)	21	2	0,063	0,001	8,5	1,1	0,69	0,04
10X (6 часов исследования)	17	4	0,055	0,005	4,9	0,7	0,81	0,11

Таблица 4

Необработанные данные клинического анализа мочи по релаксину дикого типа (фаза 1 исследования)

ДОЗА	Группа	ID	K	Na	Креатинин	АМК	Клиренс креатина (мл/мин/100 г)
Инертное вещество	3F001 TO2	68231	136	119	84	1080	0,702
Инертное вещество	3F001 T63	68231	74	67	33	850	0,257
Инертное вещество	3F002 TO4	68232	122	130	59	980	0,692
Инертное вещество	3F002 T65	68232	99	66	39	920	0,979
Инертное вещество	3F003 TO6	68233	276	130	54	2950	0,694
Инертное вещество	3F003 T67	68233	110	154	58	1980	0,552
Инертное вещество	3F004 TO8	68234	355	126	52	3000	0,522
Инертное вещество	3F004 T69	68234	176	152	71	1320	0,614
0,3X	4F001 TO1	68791	272	47	22	1950	0,413
0,3X	4F001 T62	68791	174	112	25	1500	0,356
0,3X	4F002 TO3	68792	274	68	42	1860	0,522
0,3X	4F002 T64	68792	180	88	42	1500	0,657
0,3X	4F003 TO5	68793	230	54	25	1800	0,329
0,3X	4F003 T66	68793	180	82	60	1880	0,449
0,3X	4F004 TO7	68794	225	68	23	1440	0,260
0,3X	4F004 T68	68794	365	152	68	3100	0,352
1X	1F001-TQ8	67481	194	<40	64	1480	0,526
1X	1F001-T69	67481	138	62	57	960	0,394
1X	1F002-T07	67482	203	74	93	1540	0,579
1X	1F002-T66	67482	296	161	88	1300	0,337
1X	1FQ03-T0	67490	110	85	64	820	0,495
1X	1F003-T65	67491	176	167	104	1440	0,236
1X	1F004-T03	67482	224	74	67	1420	0,882
1X	1F004-T62	67494	94	<40	24	740	0,476
ДОЗА	Группа	ID	K	Na	Креатинин	АМК	КК (мл/мин/100 г)
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0,670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0,729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0,598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0,618
10X	2FOOS-T0	67491	254	<40	103	1650	0,696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1,129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0,809
10X	2F0D4-T6	67493	212	125	85	1400	0,756

Единицы измерения: Na (мэкв./л); креатинин мг/дл); АМК (мг/дл), глюкоза (мг/дл), К (ммоль/л).

КК: мл/мин/100 г массы тела

Клиренс креатинина (КК) = (М креат. · Моб.)/(П креат · М время).

Таблица 5

Обзор физиологических данных по релаксину дикого типа (фаза 1 исследования)

Доза	Потребление воды (0-6 часов) мл/100 г массы тела		Моча на исходном уровне (-16-0 час) мл/100 г массы тела		Моча (0-6 час) мл/100 г массы тела	
	Среднее	Ст.Ош.	Среднее	Ст.Ош.	Среднее	Ст.Ош.
	е	Ср.	Ср.	Ср.	Ср.	Ср.
Инертное вещество	1,8	0,4	4,1	0,4	1,8	0,3
0,3X	3,6	0,2	5,7	1,1	1,5	0,4
1X	3,1	0,6	3,8	0,6	1,2	0,6
10X	2,4	0,7	4,3	0,8	1,2	0,1
Доза	Гематокрит (%)					
	0 час		2 часа		6 час	
	Среднее	Ст.Ош.	Среднее	Ст.Ош.	Среднее	Ст.Ош.
Инертное вещество	35,1	1,0	35,0	0,9	34,3	0,5
0,3X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4
1X	31,4	2,7	32,0	2,9	33,7	2,1
10X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4

Ст.Ош.Ср. - стандартная ошибка среднего.

Фаза 2. Результаты для варианта ПЭГ-релаксина.

Среднее потребление воды в течение 6 ч после введения у крыс, получавших инертное вещество (0X) составляло 1,5 мл на 100 г массы тела и возрастало до 2,9, 3,4 и 3,1 мл на 100 г массы тела у крыс, получавших дозы варианта ПЭГ-релаксина 0,1X, 0,3X и 1X соответственно. Возрастание составляло 93, 128 и 105% относительно среднего значения в группах инертного вещества для групп доз 0,1X, 0,3X и 1X соответственно. Средний диурез в течение 6 ч после введения дозы составлял 0,9, 0,2, 0,5 и 0,4 мл на 100 г массы тела для инертного вещества (0X, 0,3X и 1X групп соответственно). Средние концентрации натрия в плазме на исходном уровне через 2 и 6 ч после введения составляли 136,3, 138,8 и 137,8 мэкв./л в группе инертного вещества (0X) соответственно; 138,5, 137,0 и 133,7 мэкв./л в группе дозы 0,1X соответственно; 137,5, 133,5 и 134,6 мэкв./л в группе дозы 0,3X соответственно; 137,3, 135,0 и 133,3 мэкв./л в группе дозы 1X соответственно. Изменение относительно исходного уровня на 2-м и 6-м часах составляли 2,5 и 1,5 мэкв./л для инертного вещества (0X); -1,5 и -4,8 мэкв./л для дозы 0,1X; -4,0 и -2,9 мэкв./л для дозы 0,3X; -2,3 и -4,0 мэкв./л для дозы 1X.

Средняя осмолярность плазмы на исходном уровне через 2 и 6 ч после введения составляла 285,4, 289,9 и 287,5 мосмоль/кг воды в группе инертного вещества (0X) соответственно; 292,7, 287,6 и 281,7 мосмоль/кг воды в группе дозы 0,1X соответственно; 287,6, 279,4 и 282,6 мосмоль/кг воды в группе 0,3X соответственно; 289,3, 283,7 и 279,4 мосмоль/кг воды в группе 1X соответственно. Изменение относительно исходного уровня на 2-м и 6-м часах составляло 4,5 и 2,1 мосмоль/кг воды для инертного вещества (0X); -5,1 и -11,0 мосмоль/кг воды для дозы 0,1X; -8,2 и -5,0 мосмоль/кг воды для дозы 0,3X; -5,6 и -9,9 мосмоль/кг воды для дозы 1X.

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные здесь, приведены только

для иллюстрации, и что специалистами в данной области могут предложены различные модификации или изменения, идея и содержание которых охвачены данной заявкой и прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы, указанные в данной заявке в виде ссылок, включены во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент и/или другой документ были по отдельности включены в данную заявку путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Крайнов, Вадим
Кнудсен, Ник
Хьит, Амха
де Диос, Кристин
Пинкстафф, Джейсон
Салливан, Лоррейн

<120> МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ РЕЛАКСИНА, СОДЕРЖАЩИЕ НЕКОДИРУЕМУЮ В ПРИРОДЕ АМИНОКИСЛОТУ, СВЯЗАННУЮ С ПОЛИМЕРОМ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> AMBX-0174.00PCT

<150> 61/374,582

<151> 2010-08-17

<160> 34

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 53

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys	Thr
1				5					10					15	

Lys	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Cys	Asp	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile
			20					25					30		

Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly
		35					40					45			

Met	Ser	Thr	Trp	Ser
				50

<210> 2

<211> 53

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys	Thr
1				5					10					15	

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
 20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
 35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser
 50

<210> 3
 <211> 88
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu
 20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
 35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 85

<210> 4
 <211> 24
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
 1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 20

<210> 5
 <211> 29
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
 20 25

<210> 6

<211> 29

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
 20 25

<210> 7

<211> 35

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu
 20 25 30

Gln Lys Arg
 35

<210> 8

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg
 1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg

1

5

<210> 10
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60
 gctagatttt gc 72

 <210> 11
 <211> 87
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgccggcgcg aattagttcg cgcgcagatt 60
 gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87

 <210> 12
 <211> 159
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60
 gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120
 cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159

 <210> 13
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 atgaaaaaga atatcgcat tcttcttaaa cgg 33

 <210> 14
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 atgattgaag gtggtcgt 18

 <210> 15
 <211> 94
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 15

Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30

Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 16

<211> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Мутантная синтетаза, происходящая из *Methanococcus jannaschii*
синтетаза

<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 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 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> 77

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Мутантная тРНК, происходящая из *Methanococcus jannaschii* тРНК

<400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa

60

tccagcccgс cggacca 77

<210> 18
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 18
 ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60
 tccggcccgс cggacca 77

<210> 19
 <211> 88
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Оптимизированная янтарная супрессорная тРНК

<400> 19
 cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60
 gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 20
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Оптимизированная супрессорная тРНК сдвига рамки считывания AGGA

<400> 20
 gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttctt aatccgttct cgtaggagtt 60
 cgagggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 21
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-азидо-L-фенилаланина

<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> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
п-бензоил-L-фенилаланина

<400> 22

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> 23
 <211> 305
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 пропаргил-фенилаланина
 <400> 23
 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> 24
 <211> 305
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 пропаргил-фенилаланина

<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 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> 25
 <211> 305
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 пропаргил-фенилаланина

<400> 25

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> 26
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения

п-азидо-фенилаланина

<400> 26

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

030886

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>	27
<211>	306
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная

<220>
<223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
п-азидо-фенилаланина

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-азидо-фенилаланина

<400> 28

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> 29
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-азидо-фенилаланина

<400> 29

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> 30
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-ацетил-фенилаланина

<400> 30

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> 31

<211> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения п-ацетил
-фенилаланина

<400> 31

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> 32
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-ацетил-фенилаланина
 <400> 32
 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

030886

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> 33
 <211> 306
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-азидо-фенилаланина

<400> 33

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> 34

<211> 306

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Аминоацил тРНК синтетаза для включения
 п-азидо-фенилаланина

<400> 34

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий неприродную аминокислоту, отличающийся тем, что:

(а) полипептид релаксина включает А-цепь с последовательностью, по меньшей мере на 90% иден-

тичной SEQ ID NO: 4, и В-цепь с последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

(b) указанная неприродная аминокислота находится в одном из следующих положений: в положении 1, 5, 13, 18 А-цепи или в положении 7 В-цепи;

(c) указанная неприродная аминокислота содержит функциональную группу, выбранную из карбонильной группы, аминооксигруппы, гидразидной группы, гидразиновой группы, семикарбазидной группы, азидной группы и алкиновой группы; и

(d) указанная неприродная аминокислота связана с полимером,

причем модифицированный полипептид релаксина является агонистом рецептора релаксина и проявляет увеличенный по меньшей мере в 2 раза период полувыведения *in vivo* по сравнению с человеческим релаксином, состоящим из А-цепи с SEQ ID NO: 4, связанной с В-цепью с SEQ ID NO: 5.

2. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий неприродную аминокислоту, отличающийся тем, что:

(a) полипептид релаксина включает А-цепь с последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 4, и В-цепь с последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

(b) указанная неприродная аминокислота находится в одном из следующих положений: в положении 1, 5, 13, 18 А-цепи или в положении 7 В-цепи;

(c) указанная неприродная аминокислота представляет собой паразамещенный, ортозамещенный или метазамещенный фенилаланин;

(d) указанная неприродная аминокислота связана с полимером,

причем модифицированный полипептид релаксина является агонистом рецептора релаксина и проявляет увеличенный по меньшей мере в 2 раза период полувыведения *in vivo* по сравнению с человеческим релаксином, состоящим из А-цепи с SEQ ID NO: 4, связанной с В-цепью с SEQ ID NO: 5.

3. Модифицированный полипептид релаксина по п.2, отличающийся тем, что указанный паразамещенный, ортозамещенный или метазамещенный фенилаланин содержит функциональную группу, выбранную из карбонильной группы, аминооксигруппы, гидразидной группы, гидразиновой группы, семикарбазидной группы, азидной группы и алкиновой группы.

4. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная А-цепь включает SEQ ID NO: 4, содержащую указанную неприродную аминокислоту и не более одной дополнительной аминокислотной замены.

5. Модифицированный полипептид релаксина по п.4, отличающийся тем, что В-цепь включает SEQ ID NO: 5, содержащую не более одной аминокислотной замены, или SEQ ID NO: 6, содержащую не более одной аминокислотной замены.

6. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная А-цепь включает SEQ ID NO: 4, содержащую указанную неприродную аминокислоту в положении 1.

7. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная В-цепь имеет SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, содержащую указанную неприродную аминокислоту в положении 7 и содержащую не более одной дополнительной аминокислотной замены.

8. Модифицированный полипептид релаксина по п.7, отличающийся тем, что А-цепь имеет SEQ ID NO: 4, содержащую не более одной аминокислотной замены.

9. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная неприродная аминокислота представляет собой параацетил-L-фенилаланин.

10. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная неприродная аминокислота представляет собой параазидо-L-фенилаланин.

11. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

12. Модифицированный полипептид релаксина, содержащий неприродную аминокислоту, отличающийся тем, что:

(a) полипептид релаксина включает А-цепь с SEQ ID NO: 4, содержащей указанную неприродную аминокислоту в положении 1, и В-цепь с SEQ ID NO: 6; и

(b) указанная неприродная аминокислота представляет собой параацетил-L-фенилаланин;

причем модифицированный полипептид релаксина является агонистом рецептора релаксина.

13. Модифицированный полипептид релаксина по п.12, отличающийся тем, что указанная неприродная аминокислота связана с полимером, который представляет собой полиэтиленгликоль, причем модифицированный полипептид релаксина проявляет увеличенный по меньшей мере в 2 раза период полувыведения *in vivo* по сравнению с человеческим релаксином, состоящим из А-цепи с SEQ ID NO: 4, связанной с В-цепью с SEQ ID NO: 5.

14. Модифицированный полипептид релаксина по п.13, отличающийся тем, что указанный полиэтиленгликоль имеет среднюю молекулярную массу от около 0,1 до около 100 кДа, от около 0,1 до около 50 кДа, от около 1 до около 50 кДа, от около 1 до около 40 кДа, от около 10 до около 40 кДа или около 20 кДа.

15. Модифицированный полипептид релаксина по п.11 или 13, отличающийся тем, что полиэтиленгликоль имеет среднюю молекулярную массу около 20 кДа.

16. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-11 или 13, отличающийся тем, что указанный полимер является водорастворимым полимером.

17. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-11 или 13-16, отличающийся тем, что указанная неприродная аминокислота связана с указанным полимером посредством оксимоной связи или триазольной связи.

18. Модифицированный полипептид релаксина по п.17, отличающийся тем, что указанная оксимо-вая связь образована в результате реакции карбонильной группы и аминоксигруппы, а триазольная связь образована в результате реакции азидной группы и алкиновой группы.

19. Модифицированный полипептид релаксина по п.15, отличающийся тем, что указанная неприродная аминокислота связана с полиэтиленгликолем посредством оксимоной связи, образованной в результате реакции карбонильной группы и аминоксигруппы.

20. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-11 или 13-19, отличающийся тем, что указанный период полувыведения увеличен по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз.

21. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что является рекомбинантным и получен в эукариотической или прокариотической клетке-хозяине.

22. Модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-20, полученный путем трансляции *in vitro*.

23. Композиция для увеличения артериальной эластичности, содержащая модифицированный полипептид релаксина по любому из пп.1-22 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид релаксина, включающий А-цепь с SEQ ID NO: 4 и В-цепь с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 и содержащий неприродную аминокислоту, находящуюся в одном из следующих положений: в положении 1, 5, 13, 18 А-цепи или в положении 7 В-цепи, причем нуклеиновая кислота содержит селекторный кодон, кодирующий указанную неприродную аминокислоту.

25. Выделенная нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что указанный селекторный кодон выбран из амбер-кодона, охра-кодона, опал-кодона и кодона из четырех оснований.

26. Выделенная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.24 или 25.

27. Способ получения модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22, включающий экспрессию одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих указанную А-цепь и указанную В-цепь и содержащих селекторный кодон, который кодирует указанную неприродную аминокислоту в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного модифицированного полипептида релаксина в присутствии ортогональной тРНК, содержащей указанную неприродную аминокислоту, и обеспечение связывания указанной неприродной аминокислоты с полимером.

28. Способ лечения заболевания, состояния или расстройства, модулируемого релаксином, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22 или композиции по п.23 пациенту, нуждающемуся в этом.

29. Способ лечения заболевания, состояния или расстройства, выбранного из атеросклероза, диабета 1 типа, диабета 2 типа, ишемической болезни сердца, склеродермии, инсульта, диастолической дисфункции, изолированной систолической гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, гипертрофии левого желудочка, артериальной жесткости, связанной с длительным курением, артериальной жесткости, связанной с ожирением, артериальной жесткости, связанной с возрастом, системной красной волчанки, преэклампсии и гиперхолестеринемии, ангиотензин-II (AngII)-опосредованной вазоконстрикции, эндотелии-1 (ET-1)-опосредованной вазоконстрикции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, потери или повреждения ткани миокарда, увеличения давления наполнения желудочков, напряжения стенок желудочка и нарушения интеграции расширения артериальных и венозных сосудов, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22 или композиции по п.23 пациенту, нуждающемуся в этом.

30. Способ повышения растяжимости артерий в перименопаузе, менопаузе и постменопаузе у женщин с риском атеросклероза, диабета 1 типа, диабета 2 типа, ишемической болезни сердца, склеродермии, инсульта, диастолической дисфункции, изолированной систолической гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, гипертрофии левого желудочка, артериальной жесткости, связанной с длительным курением, артериальной жесткости, связанной с ожирением, артериальной жесткости, связанной с возрастом, системной красной волчанки, преэклампсии и гиперхолестеринемии, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22 или композиции по п.23 пациенту, нуждающемуся в этом.

31. Способ модулирования вазоконстрикции, выработки NO или агрегации тромбоцитов, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22 или композиции по п.23 пациенту, нуждающемуся в этом.

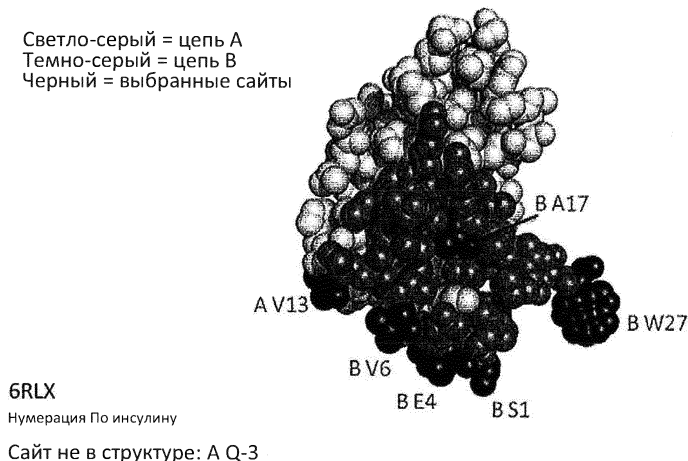
32. Способ лечения заболевания, состояния или расстройства, выбранного из атеросклероза; диабета 1 типа, диабета 2 типа, ишемической болезни сердца, склеродермии, инсульта, диастолической дисфункции, изолированной систолической гипертонии, первичной гипертонии, вторичной гипертонии, гипертрофии левого желудочка, артериальной жесткости, связанной с длительным курением, артериальной жесткости, связанной с ожирением, артериальной жесткости, связанной с возрастом, системной красной волчанки, преэклампсии и гиперхолестеринемии, ангиотензин-II (AngII)-опосредованной вазоконстрикции, эндотелин-1 (ET-1)-опосредованной вазоконстрикции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, потери или повреждения ткани миокарда, увеличения давления наполнения желудочков, напряжения стенок желудочка и нарушения интеграции расширения артериальных и венозных сосудов, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по п.19 пациенту, нуждающемуся в этом.

33. Способ повышения растяжимости артерий в перименопаузе, менопаузе и постменопаузе у женщин с риском атеросклероза, диабета 1 типа, диабета 2 типа, ишемической болезни сердца, склеродермии, инсульта, диастолической дисфункции, изолированной систолической гипертонии, первичной гипертонии, вторичной гипертонии, гипертрофии левого желудочка, артериальной жесткости, связанной с длительным курением, артериальной жесткости, связанной с ожирением, артериальной жесткости, связанной с возрастом, системной красной волчанки, преэклампсии и гиперхолестеринемии, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по п.19 пациенту, нуждающемуся в этом.

34. Способ модулирования вазоконстрикции, выработки NO или агрегации тромбоцитов, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по п.19 пациенту, нуждающемуся в этом.

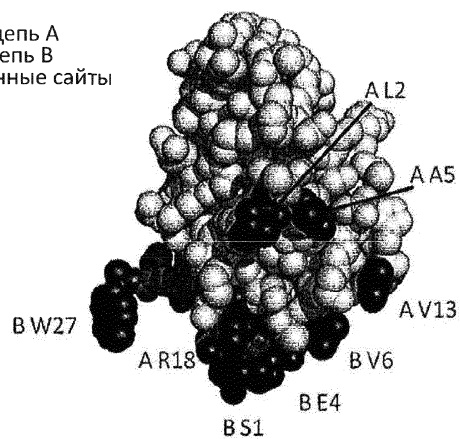
35. Способ лечения заболевания, состояния или расстройства, выбранного из ангиотензин-II (AngII)-опосредованной вазоконстрикции, эндотелин-1 (ET-1)-опосредованной вазоконстрикции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, потери или повреждения ткани миокарда, увеличения давления наполнения желудочков, напряжения стенок желудочка и нарушения интеграции расширения артериальных и венозных сосудов, ишемической болезни сердца, диастолической дисфункции и гипертрофии левого желудочка, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по любому из пп.1-22 или композиции по п.23 пациенту, нуждающемуся в этом.

36. Способ лечения заболевания, состояния или расстройства, выбранного из группы, состоящей из ангиотензин-II (AngII)-опосредованной вазоконстрикции, эндотелин-1 (ET-1)-опосредованной вазоконстрикции, сердечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, потери или повреждения ткани миокарда, увеличения давления наполнения желудочков, напряжения стенок желудочка, нарушения интеграции расширения артериальных и венозных сосудов, ишемической болезни сердца, диастолической дисфункции и гипертрофии левого желудочка, включающий введение терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида релаксина по п.19 пациенту, нуждающемуся в этом.



Фиг. 1

Светло-серый = цепь А
Темно-серый = цепь В
Черный = выбранные сайты



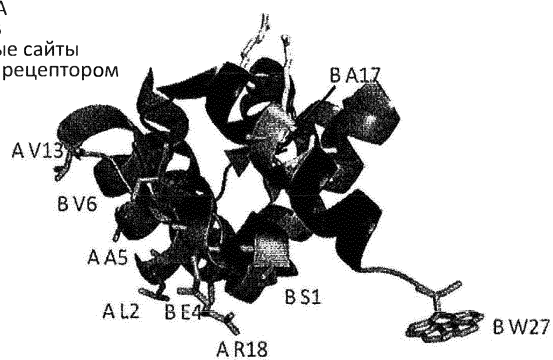
6RLX

Нумерация По инсулину

Сайт не в структуре: A Q-3

Фиг. 2

Светло-голубой = цепь А
Темно-голубой = цепь В
Оранжевый = выбранные сайты
Желтый = связывание с рецептором

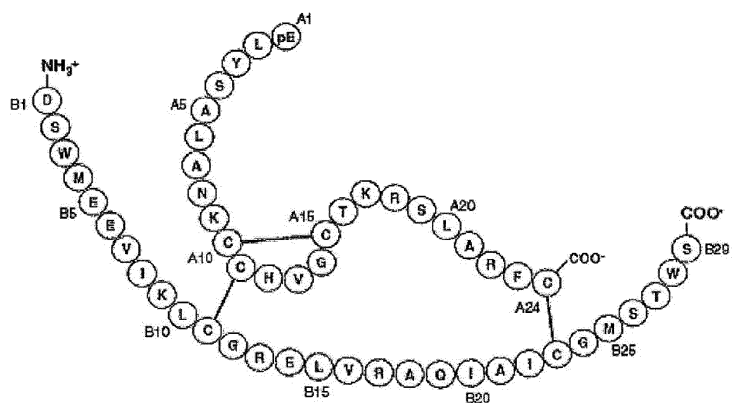


6RLX

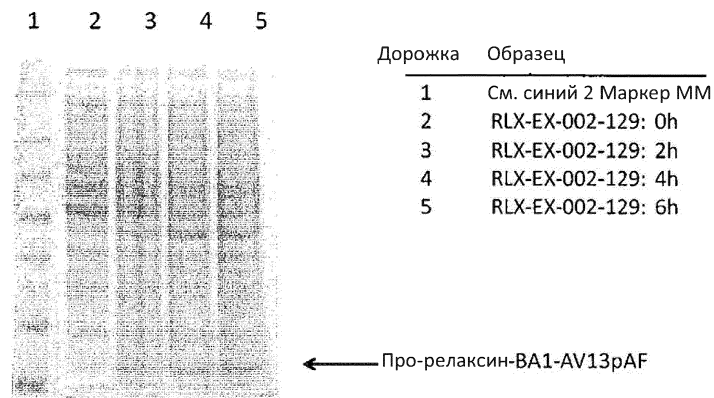
нумерация по инсулину

Сайт не в структуре: A Q-3

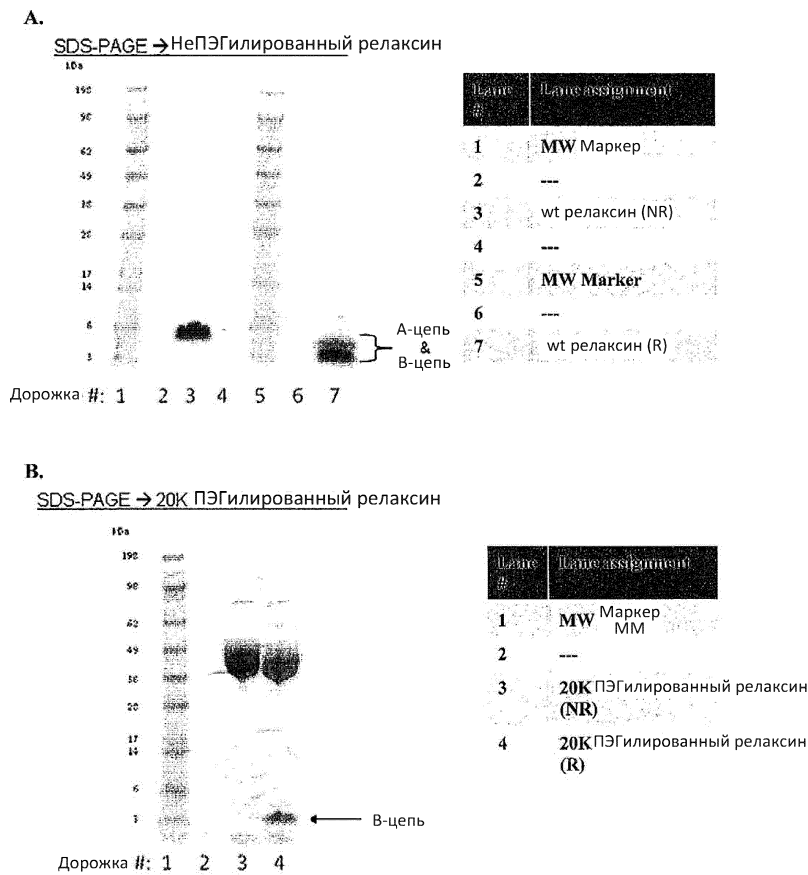
Фиг. 3



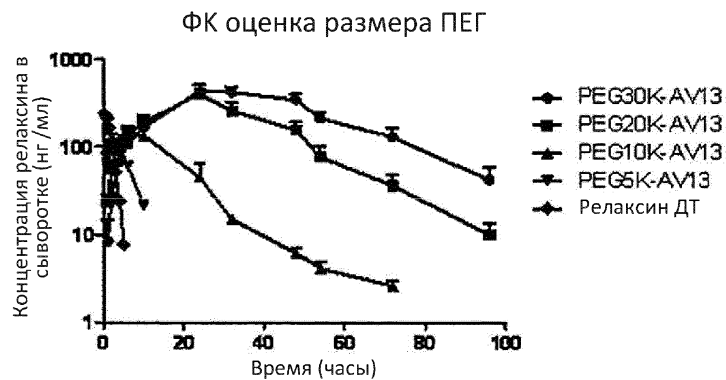
Фиг. 4



Фиг. 5

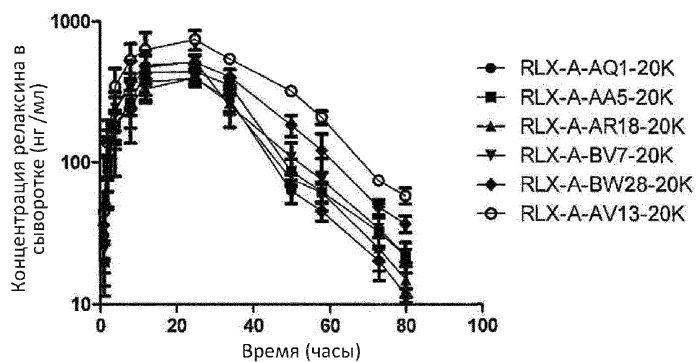


Фиг. 6



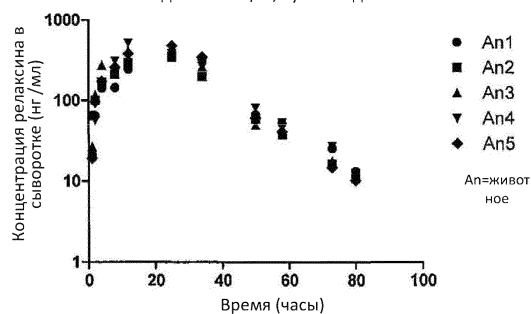
Фиг. 7

Средние концентрации RLX в сыворотке в зависимости от времени
 Ошибка=Стд.Откл, пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь=подкожно



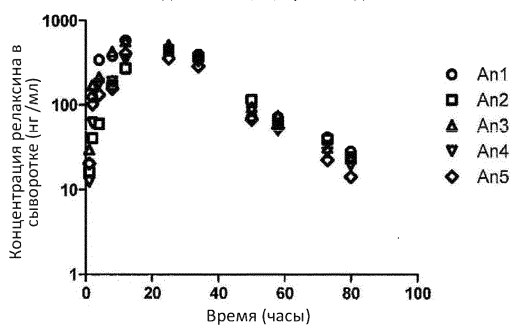
Фиг. 8А

концентрации PEG20-AQ1-RLX в сыворотке отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожный



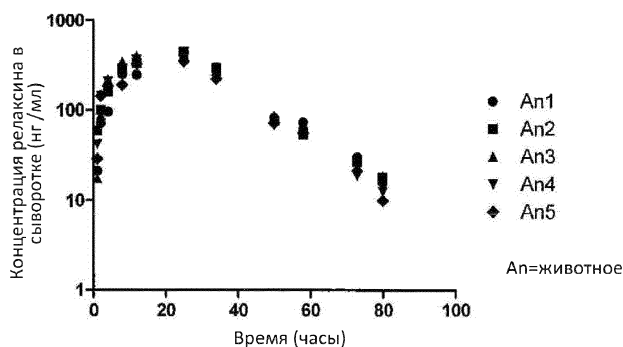
Фиг. 8В

Концентрации PEG20-AA5-RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожно



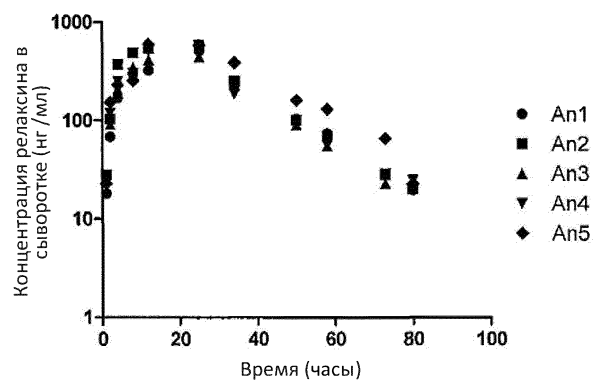
Фиг. 9А

концентрации PEG20-AR18-RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожно



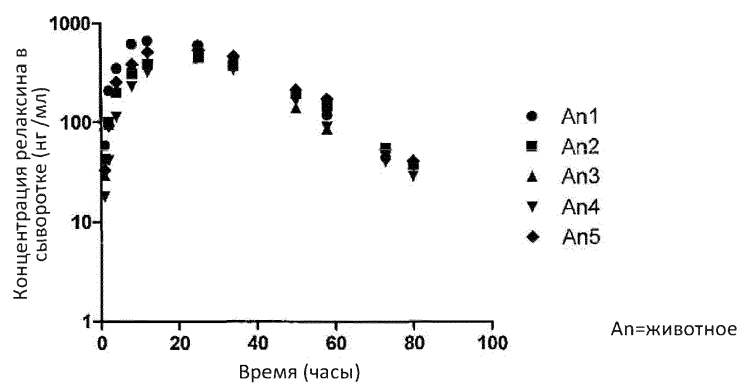
Фиг. 9В

концентрации PEG20-BV7-RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожно



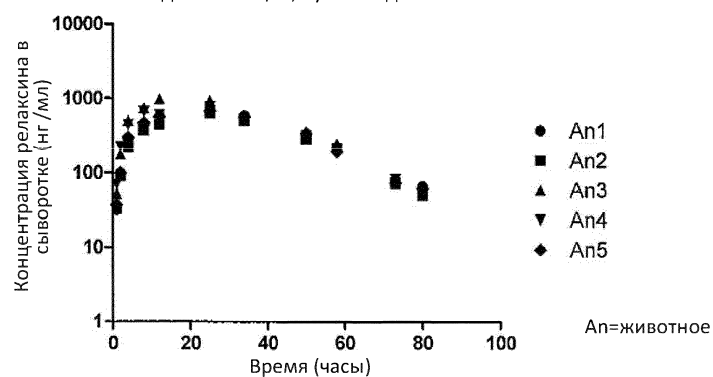
Фиг. 10А

Концентрации PEG20-BW28-RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг,путь = подкожно



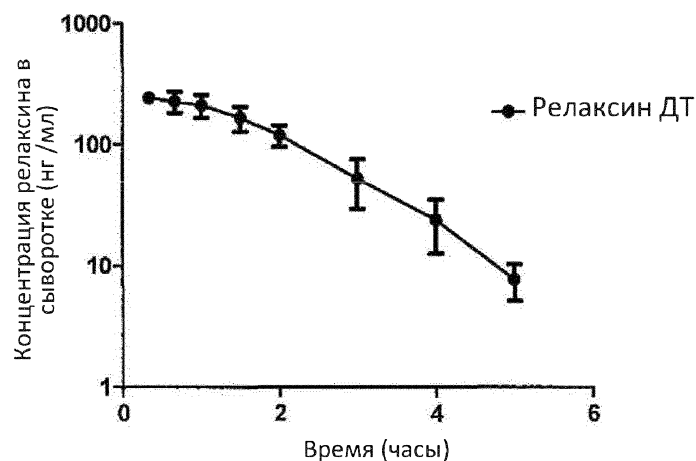
Фиг. 10В

Концентрации PEG20-AV13-RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожно



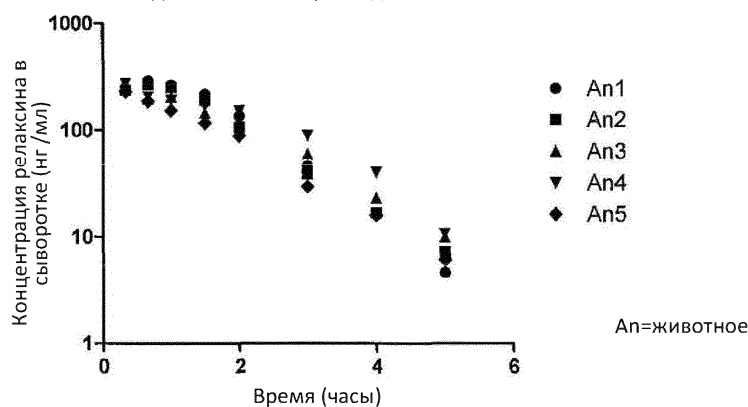
Фиг. 11

Средние концентрации RLX в сыворотке в зависимости от времени
 Ошибка баров=Std Dev, пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь = подкожно



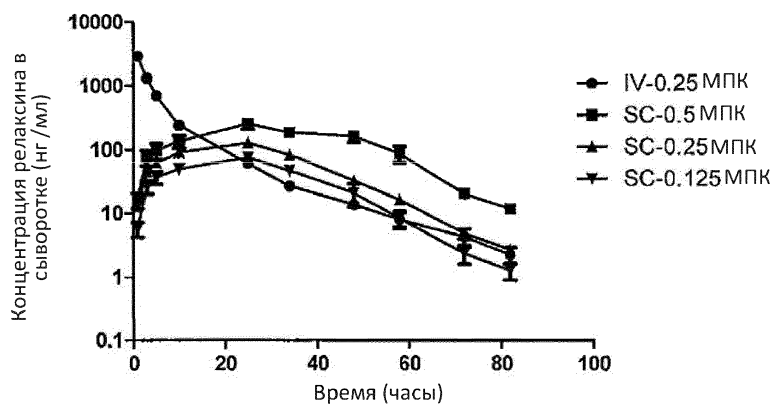
Фиг. 12А

концентрации рчРелаксина ДВ в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 доза=0.5мг/кг, путь подкожно



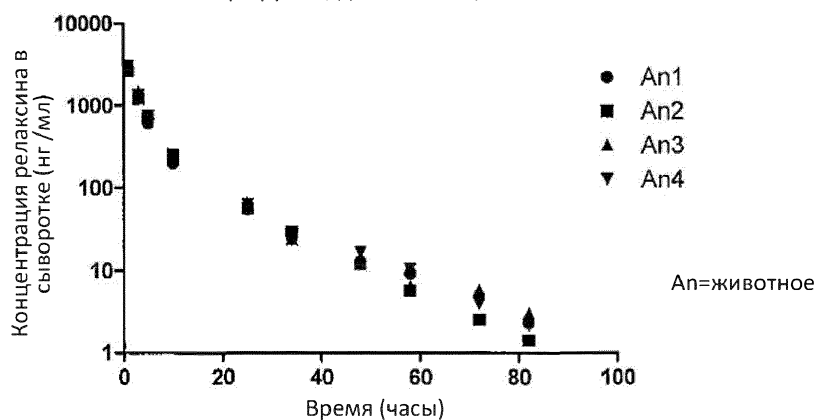
Фиг. 12В

Средние Концентрации RLX в сыворотке в зависимости от времени
 Ошибка =Стд.Откл, пол = мужской
 путь=внутривенно, подкожно



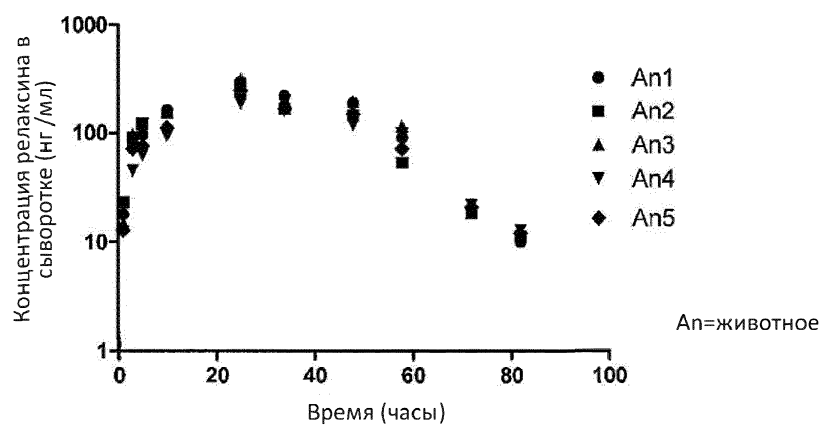
Фиг. 13А

концентрации RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
пол = мужской
маршрут=IV, доза=0.25 мг/кг



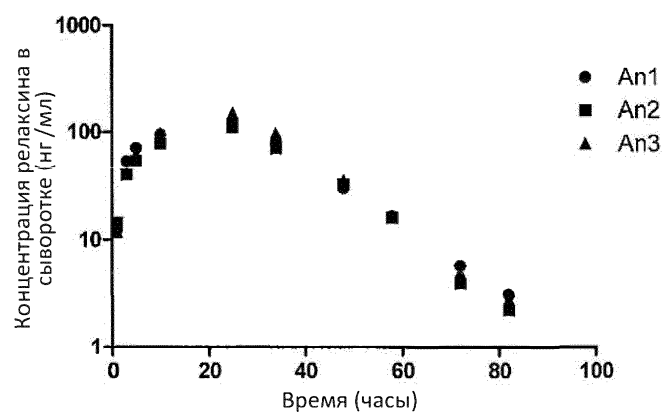
Фиг. 13В

Концентрации RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
пол = мужской
Путь=подкожно, доза=0.5 мг/кг



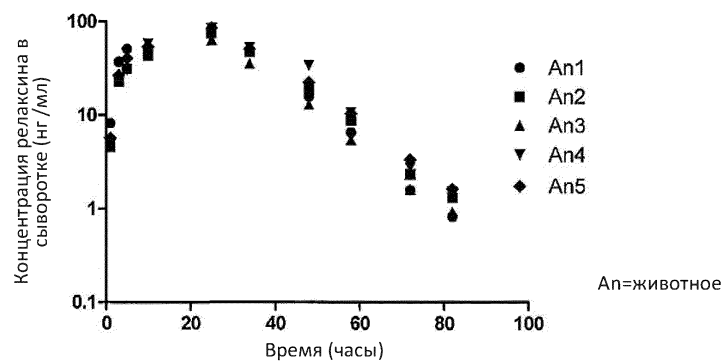
Фиг. 14А

Концентрации RLX в сыворотке в зависимости от времени
пол = мужской
Путь=подкожно, доза=0.25 мг/кг



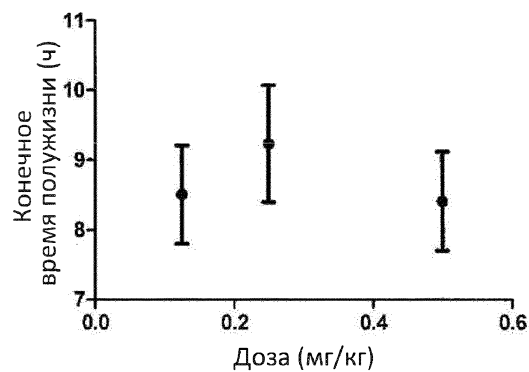
Фиг. 14В

Концентрации RLX в сыворотке Отдельных животных в зависимости от времени
 пол = мужской
 Путь=подкожно, доза=0.125 мг/кг



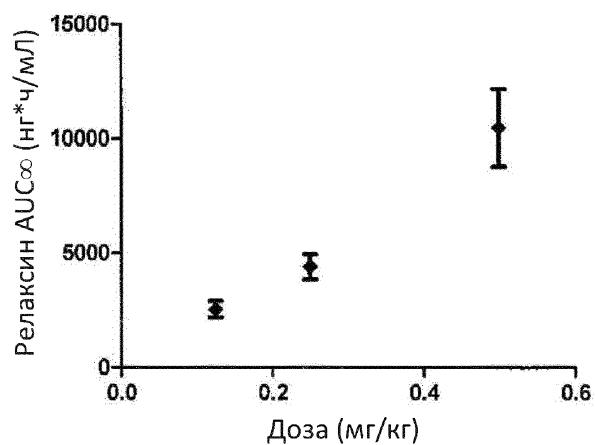
Фиг. 15

Средние значения конечного времени полужизни В зависимости от дозы
 Ошибка =Стд. откл
 Путь=С, пол = мужской



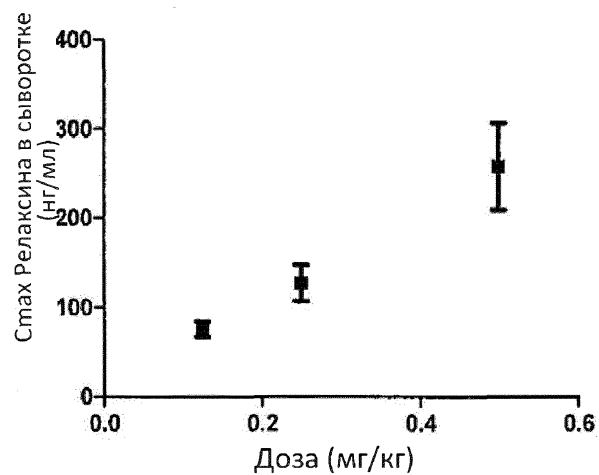
Фиг. 16А

Средние AUC_{∞} в зависимости от дозы
 Ошибка =Стд.откл, Путь=подкожно
 Вид = крысыSD, пол = мужской



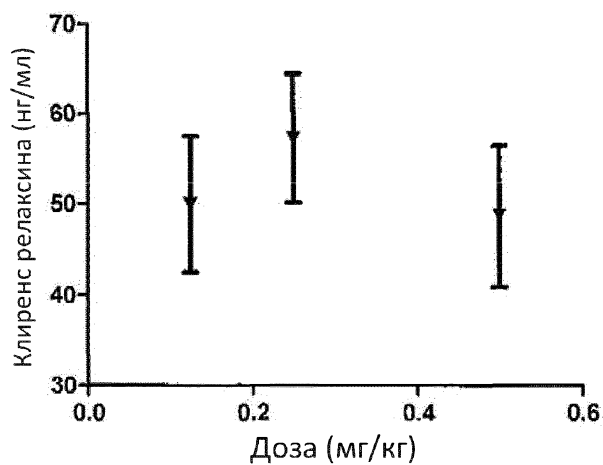
Фиг. 16В

Средняя C_{max} В зависимости от дозы
 Ошибка =Стд.откл, Путь=подкожно
 Вид=крысы SD , пол = мужской



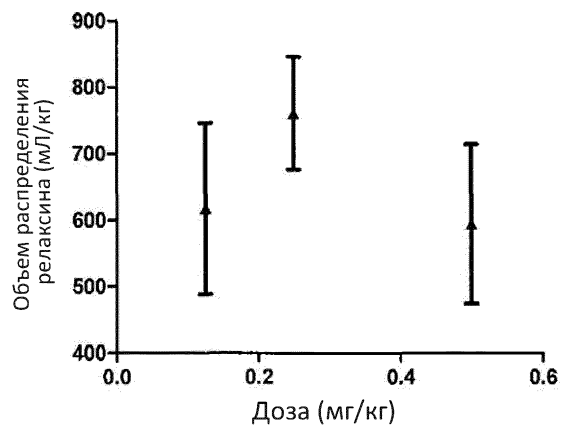
Фиг. 17А

Средний клиренс В зависимости от дозы
 Ошибка =Стд.откл, путь=подкожно
 Вид= Крысы SD, пол = мужской



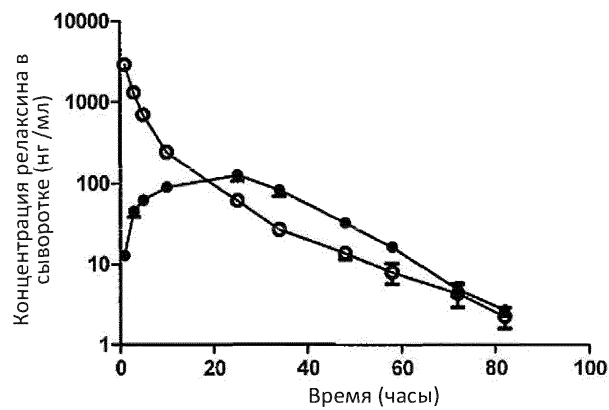
Фиг. 17В

Средние значения объема распределения в зависимости от дозы
 Ошибка =Стд. Откл.
 Путь-подкожно, пол = мужской

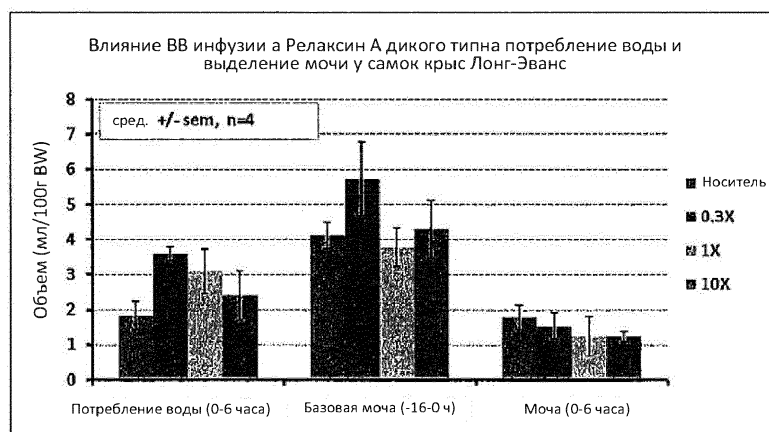


Фиг. 18А

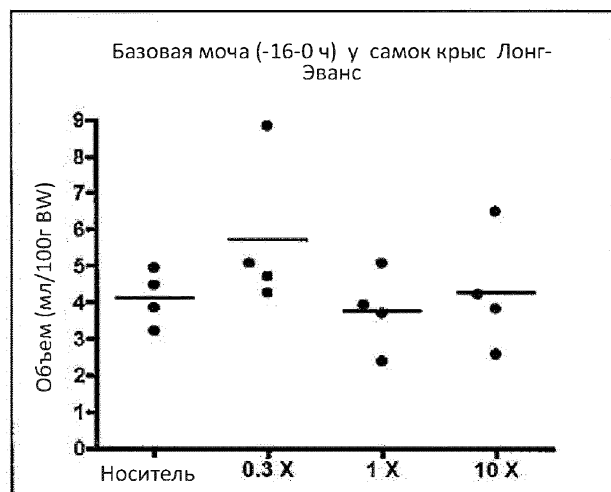
Средние концентрации RLX в сыворотке в зависимости от времени
 Ошибка =Стд. откл, пол = мужской
 Открытые символы = IV(внутривенно), закрытые символы=SC(подкожно)



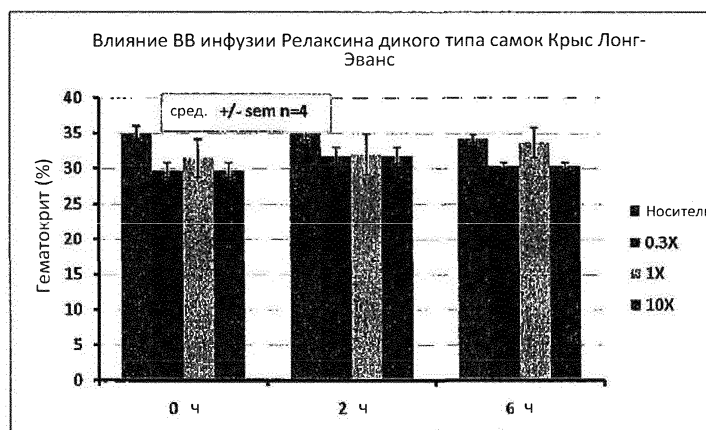
Фиг. 18В



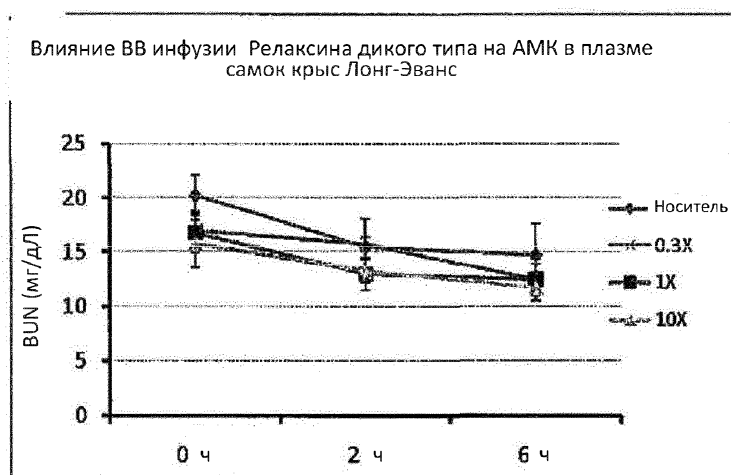
Фиг. 19, часть А



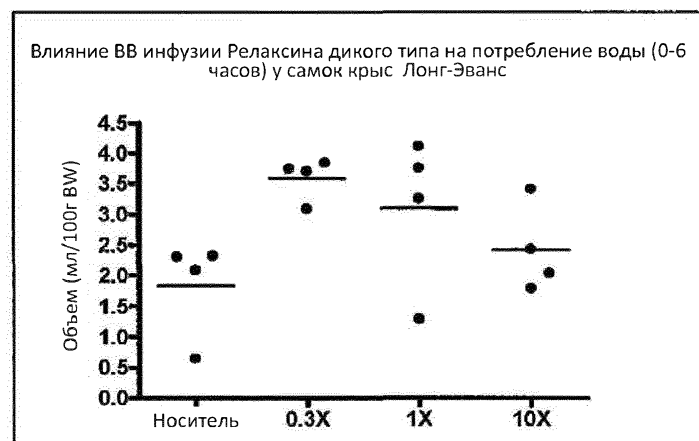
Фиг. 19, часть В



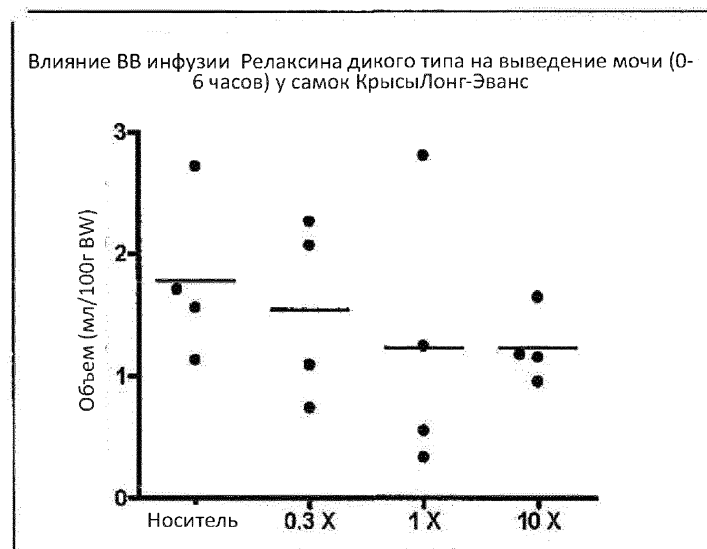
Фиг. 19, часть С



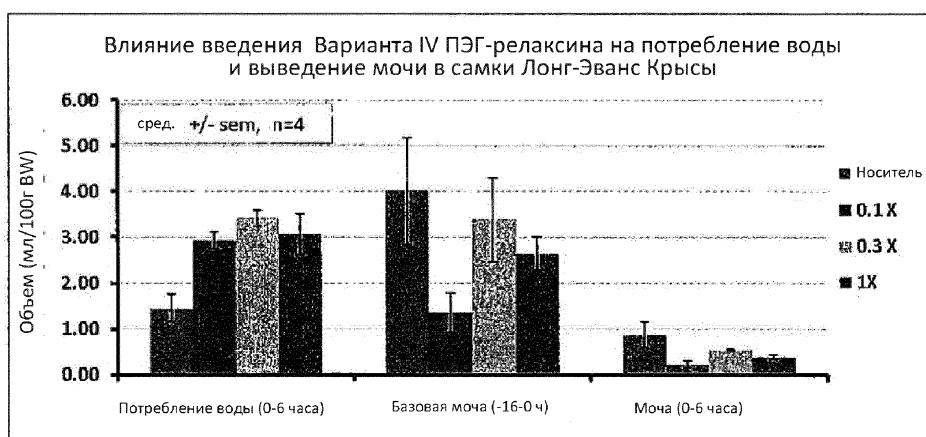
Фиг. 19, часть D



Фиг. 19, часть E



Фиг. 19, часть F



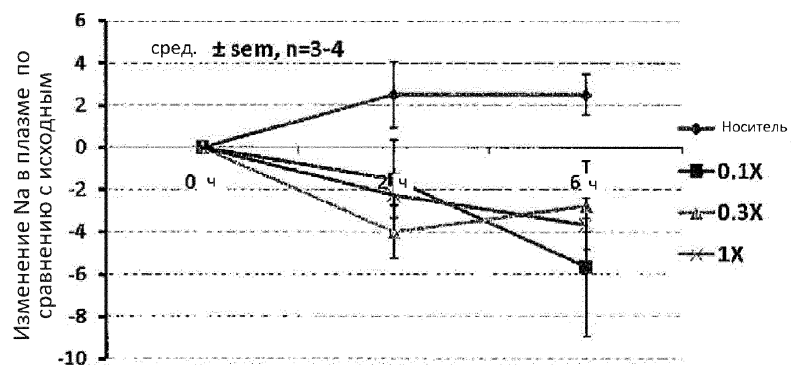
Фиг. 20, часть А



Sem=Ст.ош.сред.

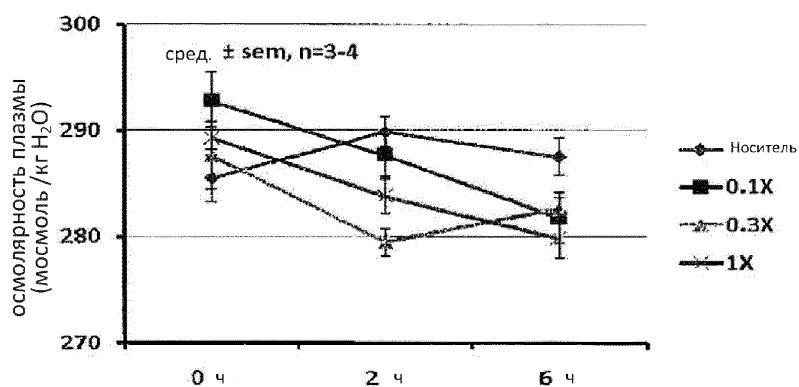
Фиг. 20, часть В

Влияние введения Варианта IV ПЭГ-релаксина изменение Na в плазме по сравнению с исходным уровнем у самок Крыс Лонг-Эванс



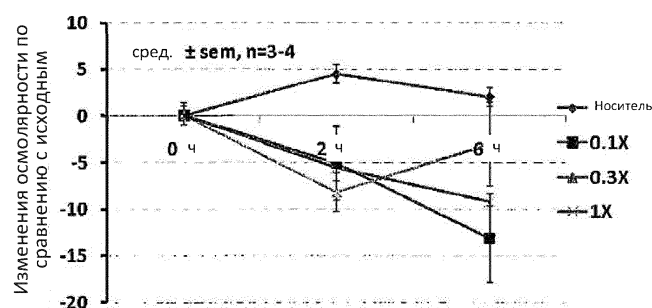
Фиг. 20, часть С

Влияние введения Варианта IV ПЭГ-релаксина на осмолярность плазмы у самок крыс Лонг-Эванс

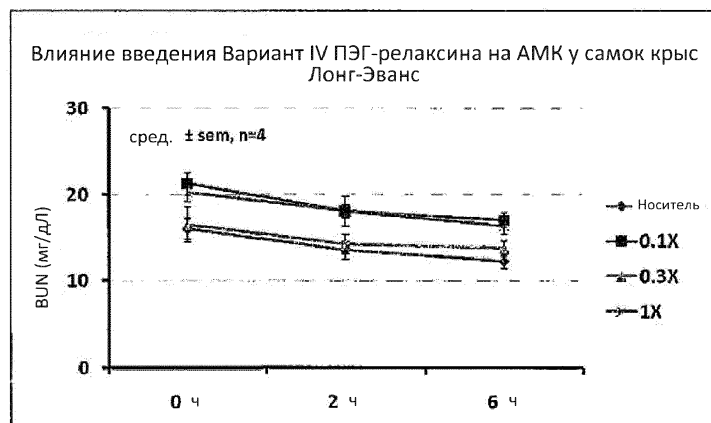


Фиг. 20, часть D

Влияние введения Варианта IV ПЭГ-релаксина на осмолярность плазмы у самок крыс Лонг-Эванс

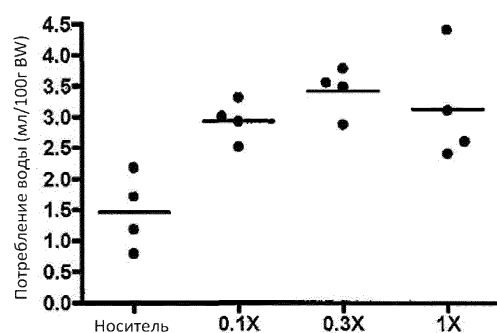


Фиг. 20, часть E



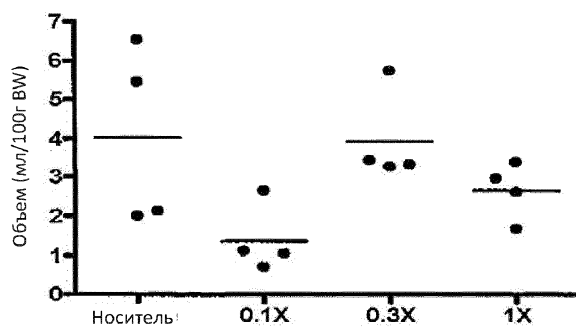
Фиг. 20, часть F

Влияние введения Варианта IV ПЭГ-релаксина на потребление воды (0-6 часа) у самок крыс Лонг-Эванс



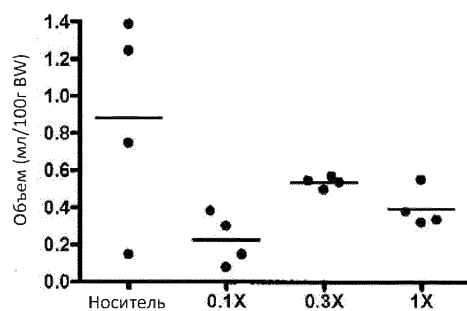
Фиг. 20, часть G

Базовое выведение мочи (-16-0 ч) у самок крыс Лонг-Эванс



Фиг. 20, часть H

Влияние введения Варианта IV ПЭГ-релаксина на выведение мочи (0-6 часа) у самок крыс Лонг-Эванс



Фиг. 20, часть I



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2