



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103290084 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310247182. 8

C07K 1/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 12. 21

C07K 1/18 (2006. 01)

C07K 1/107 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/638, 616 2004. 12. 22 US

60/655, 744 2005. 02. 23 US

60/680, 977 2005. 05. 13 US

60/727, 968 2005. 10. 17 US

(62) 分案原申请数据

200580044463. 7 2005. 12. 21

(71) 申请人 AMBRX 公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 英·布彻勒 里奇·刘 迈克尔·昂

斯图亚特·布赛尔 尼克·努森

丘霍松

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理

有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨

(51) Int. Cl.

C12P 21/02 (2006. 01)

C07K 14/61 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书119页

序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

表达和纯化重组人类生长激素的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种表达和纯化重组人类生长激素的方法。一般来说,本发明涉及人类生长激素(hGH)的生产、纯化和分离。更确切地说,本发明涉及从包括(例如)酵母、昆虫、哺乳动物和细菌宿主细胞的重组宿主细胞或培养基生产、纯化和分离大体上纯化的hGH。本发明的方法也适用于纯化连接于聚合物或其他分子的hGH。

1. 一种方法,其包含:
 - a) 在含有非天然编码的氨基酸的液体营养培养基中,在有利于生长的条件下,培养能够生产包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的重组宿主细胞;
 - b) 通过所述细胞诱导包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的生产;和
 - c) 从所述细胞或培养基纯化所述包含非天然编码的氨基酸的 hGH。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中一种或一种以上所述非天然编码的氨基酸的添加发生在选自以下时间组成的群组的时间处:连续地在细胞生长期间,在诱导之前的时间,在诱导之时或在诱导之后的时间。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中一种或一种以上所述非天然编码的氨基酸的添加与诱导同时发生。
4. 根据权利要求 2 所述的方法,其中一种或一种以上所述非天然编码的氨基酸的添加发生在诱导之前大致 1 小时。
5. 一种方法,其包含以下步骤:
 - (a)使来自权利要求 1 的步骤 c)的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与阴离子交换色谱基质,在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触;
 - (b) 从所述基质洗提和收集所述 hGH;
 - (c) 使来自步骤 b) 的所述 hGH 与疏水性相互作用色谱(HIC)基质,在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触;和
 - (d) 从所述 HIC 基质洗提和收集所述 hGH 以提供包含非天然编码的氨基酸的大体上纯的 hGH。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述重组宿主细胞选自原核细胞和真核细胞组成的群组。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述大体上纯化的 hGH 选自成熟 hGH、成熟 hGH 变体、hGH 多肽和 hGH 多肽变体组成的群组。
8. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述方法包含,在步骤 a) 之后使从所述阴离子交换色谱法洗提的所述 hGH 与羟磷灰石色谱基质,在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触,接着从所述羟磷灰石色谱基质洗提和收集所述 hGH 的额外步骤。
9. 一种方法,其包含以下步骤:
 - (a) 使包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与衍生化的聚乙二醇(PEG),在足以形成 hGH-PEG 结合物的条件下反应;和
 - (b) 通过使所述 hGH-PEG 结合物与阴离子交换基质,在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触,接着从所述阴离子交换色谱基质洗提和收集所述 hGH,以提供大体上纯化的 hGH-PEG 结合物来分离和纯化所述 hGH-PEG 结合物。
10. 一种分离大体上纯化的 hGH-PEG 结合物的方法,其包含以下步骤:
 - a) 在含有非天然编码的氨基酸的液体营养培养基中,在有利于生长的条件下,培养能够生产包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的重组宿主细胞;
 - b) 通过所述细胞诱导包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的生产;和
 - c)使来自步骤 b)的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与阴离子交换色谱基质,在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触,接着从所述基质洗提和收集所述 hGH;

d) 使从步骤 c) 的所述阴离子交换色谱法洗提的所述 hGH 与羟磷灰石色谱基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述羟磷灰石色谱基质洗提和收集所述 hGH;

e) 使来自步骤 d) 的所述 hGH 与疏水性相互作用色谱 (HIC) 基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述 HIC 基质洗提和收集所述 hGH, 以提供包含非天然编码的氨基酸的 hGH;

f) 使来自步骤 e) 的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与衍生化的聚乙二醇 (PEG), 在足以形成 hGH-PEG 结合物的条件下反应; 和

g) 通过使所述 hGH-PEG 结合物与阴离子交换基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述阴离子交换色谱基质洗提和收集所述 hGH, 以提供大体上纯化的 hGH-PEG 结合物来分离和纯化所述 hGH-PEG 结合物。

11. 一种分离大体上纯化的 hGH-PEG 结合物的方法, 其包含以下步骤:

a) 在含有非天然编码的氨基酸的液体营养培养基中, 在有利于生长的条件下, 培养能够生产包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的重组宿主细胞;

b) 通过所述细胞诱导包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的生产; 和

c) 使来自步骤 b) 的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与阴离子交换色谱基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述基质洗提和收集所述 hGH;

d) 使来自步骤 d) 的所述 hGH 与疏水性相互作用色谱 (HIC) 基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述 HIC 基质洗提和收集所述 hGH, 以提供包含非天然编码的氨基酸的 hGH;

e) 使来自步骤 d) 的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与衍生化的聚乙二醇 (PEG), 在足以形成 hGH-PEG 结合物的条件下反应; 和

f) 通过使所述 hGH-PEG 结合物与阴离子交换基质, 在允许所述 hGH 与所述基质结合的条件下接触, 接着从所述阴离子交换色谱基质洗提和收集所述 hGH, 以提供大体上纯化的 hGH-PEG 结合物来分离和纯化所述 hGH-PEG 结合物。

12. 一种方法, 其包含:

a) 在含有非天然编码的氨基酸的液体营养培养基中, 在有利于生长的条件下, 培养能够生产包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的重组宿主细胞;

b) 通过所述细胞诱导包含所述非天然编码的氨基酸的 hGH 的生产; 和

c) 使来自步骤 b) 的包含非天然编码的氨基酸的 hGH 与衍生化的聚乙二醇 (PEG), 在足以形成 hGH-PEG 结合物的条件下反应; 和

d) 纯化所述 hGH-PEG 结合物。

表达和纯化重组人类生长激素的方法

[0001] 分案说明

[0002] 本申请案是申请日为 2005 年 12 月 21 日,申请号为 200580044463.7(国际申请号为 PCT/US2005/046486),发明名称为表达和纯化重组人类生长激素的方法的专利申请的方案申请。

[0003] 交叉引用的相关申请案

[0004] 本专利申请要求 2004 年 12 月 22 日提交的第 60/638,616 号美国临时专利申请案、2005 年 2 月 23 日提交的第 60/655,744 号的美国临时专利申请案、2005 年 5 月 13 日提交的第 60/680,977 号美国临时专利申请案和 2005 年 10 月 17 日提交的第 60/680,977 号美国临时专利申请案的优先权,其说明书全部并入本文中。

技术领域

[0005] 本发明一般来说涉及人类生长激素(hGH)的生产、纯化和分离。更确切地说,本发明涉及从重组宿主生产、纯化和分离大体上纯化的 hGH。

背景技术

[0006] 生长激素(GH)超基因家族(Bazan, F. *Immunology Today*11:350-354(1990);Mott, H. R. 和 Campbell, I. D. *Current Opinion in Structural Biology*5:114-121(1995);Silvennoinen, O. 和 Ihle, J. N. (1996) SIGNALING BY THE HEMATOPOIETIC Cytokine Receptors)代表一组具有相似结构特征的蛋白质。所述蛋白质家族的各个成员包含 4 螺旋束。虽然仍有更多家族成员有待于识别,但是一些家族成员包括以下各成员:生长激素、催乳激素、胎盘催乳质、红血球生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、白细胞介素-2(IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35 子单元)、IL-13、IL-15、制瘤素 M、纤毛神经营养性因子、白血病抑制因子、 α 干扰素、 β 干扰素、 γ 干扰素、 ω 干扰素、 τ 干扰素、 ϵ 干扰素、粒性白细胞-群落刺激因子(G-CSF)、粒性白细胞-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF)和心脏营养素 1(CT-1) (“GH 超基因家族”)。GH 超基因家族的成员具有相似的二级和三级结构,尽管其通常具有有限的氨基酸或 DNA 序列同一性。共用的结构特征使基因家族的新成员容易被识别。

[0007] 人类生长激素参与正常人类生长和发育的大部分调节。所述天然存在的单链垂体激素由 191 个氨基酸残基组成且具有大致 22kDa 的分子量。hGH 显示大量的生物效应,尤其包括线性生长(体质形成)、泌乳、巨噬细胞的活化和胰岛素样效应和致糖尿病效应(Chawla R. 等人, *Ann. Rev. Med.* 34:519-547(1983); Isaksson, O. 等人, *Ann. Rev. Physiol.*, 47:483-499(1985); Hughes, J. 和 Friesen, H. *Ann. Rev. Physiol.*, 47:469-482(1985))。hGH 的结构为众所周知的(Goeddel, D. 等人, *Nature*281:544-548(1979)), 且 hGH 的三维结构已通过 X 射线结晶学解决(de Vos, A. 等人, *Science*255:306-312(1992))。蛋白质具有包含 4 个两亲性 α 螺旋束的致密球状结构,从 N 末端开始称为 A-D,所述螺旋束通过环

接合。hGH 也含有 4 个半胱氨酸残基,其参与两种分子内的二硫键:C53 与 C165 成对并且 C182 与 C189 成对。激素未糖基化且已在大肠杆菌(*E. coli*)中以分泌形式表达(Chang, C. 等人, *Gene*55:189-196(1987))。

[0008] 已经识别 hGH 的大量天然存在的突变体。所述突变体包括 hGH-V (Seeburg, *DNA*1:239(1982); 以引用的方式并入本文的第 4,446,235、4,670,393 和 4,665,180 号美国专利)和含有 hGH 的残基 32-46 的缺失的 20-kDa hGH (Kostyo 等人, *Biochem. Biophys. Acta*925:314(1987); Lewis, U. 等人, *J. Biol. Chem.*, 253:2679-2687(1978))。另外,已经报道由后转录、后转译、分泌、代谢过程和其他生理学过程而产生的许多 hGH 变体(Baumann, G., *Endocrine Reviews*12:424(1991))。hGH 的生物效应来源于其与特异细胞受体的相互作用。激素是包括胎盘催乳质和催乳激素的同源蛋白质的家族的成员。然而,在家族成员之中, hGH 为不寻常的,因为其显示广泛的种特异性且与经克隆的体因性(Leung, D. 等人, *Nature*330:537-543(1987) 受体或催乳激素(Boutin, J. 等人, *Cell*53:69-77(1988)) 受体结合。基于结构和生物化学研究,已经提出用于催乳结合域和体因性结合域的功能图(Cunningham, B. 和 Wells, J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3407(1991))。hGH 受体为造血/细胞激素/生长因子受体家族的成员,所述家族包括若干其他生长因子受体,诸如白细胞间介素(IL)-3、白细胞间介素-4 和白细胞间介素-6 受体,粒性白细胞巨噬细胞群落-刺激因子(GM-CSF)受体,红血球生成素(EPO)受体以及 G-CSF 受体。参见, Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*87:6934-6938(1990)。细胞激素受体家族的成员含有 4 个保守的半胱氨酸残基和刚好位于跨膜区域外部的色氨酸-丝氨酸-X-色氨酸-丝氨酸基元。认为保守的序列涉及蛋白质-蛋白质相互作用。参见(例如) Chiba 等人, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 184:485-490(1992)。hGH 与其受体(hGHbp)的细胞外域之间的相互作用是最为熟知的激素-受体相互作用之一。高分辨率 X 射线结晶数据(Cunningham, B. 等人, *Science*, 254:821-825(1991)) 已经展示, hGH 具有两个受体结合部位且使用分子上的相异部位来依序结合两种受体分子。两个受体结合部位称为部位 I 和部位 II。部位 I 包括螺旋 D 的羧基末端和螺旋 A 的部分和 A-B 环,而部位 II 涵盖螺旋 A 的氨基末端区域和螺旋 C 的一部分。GH 与其受体的结合以部位 I 首先结合而依序发生。然后,部位 II 啮合第二 GH 受体,造成受体二聚和导致对激素产生细胞反应的细胞内信号传递途径的活化。已将 G120R 取代引入部位 II 中的 hGH 突变蛋白质能结合单一的 hGH 受体,但不能使两种受体二聚。突变蛋白质估计可能通过占据受体部位但不使细胞内信号传递途径活化而在活体外担当 hGH 拮抗剂(Fuh, G. 等人, *Science*256:1677-1680(1992))。

[0009] 重组 hGH 用作治疗剂且已经被批准用于治疗大量适应症。hGH 不足会导致(例如)侏儒症,所述侏儒症已经通过激素的外部投药而被成功地治疗超过十年。hGH 不足(GHD)的形式包括儿科 GHD、儿童期发作成年 GHD 和成年发作成年 GHD。除 hGH 不足之外,也已经批准将 hGH 用于治疗肾衰竭(在儿童中)、特纳氏综合症(Turner's Syndrome)和 AIDS 患者的恶病质。近期,食品和药物管理局(FDA)已批准将 hGH 用于治疗非 GH 依赖性矮小身材。目前也正在对 hGH 用于治疗老年人的老龄化、虚弱,短肠综合症和充血性心力衰竭进行研究。hGH 治疗的目标人群包括具有特发性身材矮小(ISS)的儿童和具有 GHD 样症状的成年人。目前,重组 hGH 是作为日用可注射产品来出售,目前市场上有 5 种主要产品:Humatrope™(Eli Lilly & Co.), Nutropin™(Genentech), Norditropin™(Novo-Nordisk), Genotropin™

(Pfizer)和 Saizen/Serostim™ (Serono)。然而,使用生长激素作为治疗剂的重大挑战是,蛋白质在活体内具有短的半衰期且因此其必须通过每日的皮下注射来投与以达到最大有效性(MacGillivray 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:1806-1809 (1996))。相当大的努力集中于通过降低生产成本、使投药更易用于患者、改善功效和安全性概况和产生将提供竞争优势的其他性质来改善 hGH 促效剂和拮抗剂的投药的方式上。举例而言, Genentech 和 Alkermes 以前销售 Nutropin Depot™, 一种 hGH 的储存配方,用于儿科生长激素不足。虽然储存容许更小频率的投药(每 2-3 周一次而不是每日一次),但是其也与诸如降低的生物可用性和注射部位处的疼痛的不良副作用有关,而且在 2004 年退出市场。近期,另一产品 Pegvisomant™ (Pfizer) 也已由 FDA 批准。Pegvisomant™ 是 hGH 的遗传工程化类似物,其起着被指示用于治疗肢端肥大症的高选择性生长激素受体拮抗剂的作用(van der Lely 等人, *The Lancet* 358:1754-1759 (2001))。尽管 Pegvisomant™ 中的若干氨基酸侧链残基用聚乙二醇(PEG)聚合物衍生,但是产品仍然每日投与一次,表明医药性质不为最佳的。除聚乙二醇化和储存配方之外,包括 hGH 的吸入剂型和口服剂型的其他投药路线正处于临床前和临床开发的早期阶段,且还未得到 FDA 的批准。因此,需要显示生长激素活性而又提供较长血清半衰期和因此 hGH 的更佳治疗水平和增加的治疗半衰期的多肽。

[0010] 近期,已经报道蛋白质科学中的全新技术,其有希望克服许多与诸如 hGH 的蛋白质的部位特异性修饰有关的限制。具体来说,已经将新颖组分添加到原核生物大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) (例如, L. Wang 等人, (2001), *Science* 292:498-500) 和真核生物酿酒酵母(*Sacchomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*) (例如, J. Chin 等人, *Science* 301:964-7 (2003)) 的蛋白质生物合成器,其已经使非遗传编码的氨基酸能并入活体内的蛋白质。提供给宿主细胞的构筑体含有编码 hGH 多肽的多核苷酸,所述 hGH 多肽包含选择密码子和正交 tRNA 合成酶和 / 或正交 tRNA 用于将非天然编码的氨基酸取代到 hGH 多肽中。使用所述方法,响应琥珀密码子 (TAG) 已经将具有新颖化学、物理或生物性质,包括光亲和标记和光敏异构化氨基酸、光致交联氨基酸(参见(例如) Chin, J. W. 等人 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11020-11024; 和 Chin, J. W. 等人 (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027)、酮氨基酸、含有重原子的氨基酸和糖基化氨基酸的大量新颖的氨基酸有效地且以高保真度并入大肠杆菌和酵母中的蛋白质中。参见(例如), J. W. Chin 等人, (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3 (11):1135-1137; J. W. Chin 等人, (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; 和 L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11。所有参考文献是以引用的方式全部并入。所述研究已经证明,有可能选择性地和照惯例地引入对于可见于 20 种普通、遗传编码的氨基酸中的所有官能团为化学惰性的而且可能用于有效地和选择性地反应来形成稳定的共价键的化学官能团。将非遗传编码的氨基酸并入蛋白质中的能力允许引入能提供天然存在的官能团,诸如赖氨酸的 ϵ -NH₂、半胱氨酸的巯基 -SH、组氨酸的亚氨基的有价值替代物的化学官能团。已知某些化学官能团对于可见于 20 种普通、遗传编码的氨基酸中的官能团为惰性的,但能干净利索地且有效地反应以形成稳定的键。

[0011] 缩写为 PEG 的亲水聚合物聚(乙二醇)的共价连接是增加包括蛋白质、肽的许多生物学活性分子,且确切地说疏水性分子的水溶性、生物可用性,增加其血清半衰期,增加其

治疗半衰期,调节其免疫原性,调节其生物活性或延长其循环时间的方法。PEG 已经广泛地用于药品中、人工植入物上和其中生物相容性、缺乏毒性和缺乏免疫原性为重要的其他应用中。为了使所要求的 PEG 的性质最大化,连接于生物学活性分子的 PEG 聚合物的总分子量和水合状态必须足够高,以给予通常与 PEG 聚合物连接有关的有利特征,诸如增加的水溶性和循环半衰期,同时不会不利地影响母体分子的生物活性。PEG 的任何分子量能够按实际要求来使用,其包括(但不限于)约 100 道尔顿(Dalton, Da)到 100,000Da 或按要求为更多的(包括(但不限于),有时为 0.1-50kDa 或 10-40kDa)。也能使用支链 PEG,其包括(但不限于)具有 MW 在 1-100kDa (包括(但不限于) 1-50kDa 或 5-20kDa)范围内的各链的 PEG 分子。

[0012] PEG 衍生物常常通过诸如赖氨酸、半胱氨酸和组氨酸残基的反应性化学官能基, N 末端和碳水化合物部分连接于生物学活性分子。蛋白质和其他分子常具有可用于聚合物连接的有限数量的反应性部位。通常,最适合于通过聚合物连接来修饰的部位在受体结合中起重要作用,并且是保持分子的生物活性所必需的。从而,聚合物链与生物学活性分子上的所述反应性部位的不加选择的连接常常会导致聚合物修饰分子的生物活性的显著降低或甚至全部损失。R. Clark 等人, (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:21969-21977。为形成具有给予目标分子所要求的优点的足够聚合物分子量的结合物,现有技术方法通常涉及许多聚合物臂与分子的随机连接,进而增加了母体分子的生物活性降低或甚至全部损失的风险。

[0013] 蛋白质的结构支配形成用于使 PEG 衍生物与蛋白质连接的基因座的反应性部位。包括酶的蛋白质由具有通用结构 $H_2N-CHR-COOH$ 的 α -氨基酸的各种序列组成。一个氨基酸的 α 氨基部分 (H_2N-) 连接于邻近氨基酸的羧基部分 ($-COOH$) 以形成酰胺键,其可表示为 $-(NH-CHR-CO)_n-$, 下标“n”能等于数百或数千。由 R 表示的片段可含有用于蛋白质生物活性和 PEG 衍生物的连接的反应性部位。

[0014] 举例而言,在氨基酸赖氨酸的情况下,在 ϵ 位置以及在 α 位置中存在 $-NH_2$ 部分。 ϵ $-NH_2$ 在碱性 pH 值的条件下自由反应。用 PEG 使蛋白质衍生化的领域中的大部分技术已经贯注于开发用于连接存在于蛋白质中的赖氨酸残基 ϵ $-NH_2$ 部分的 PEG 衍生物。“Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation”, Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, 第 1-17 页。然而,所述 PEG 衍生物都具有共同的局限性,即其不能被选择性地安装于常在蛋白质表面上存在的许多赖氨酸残基之中。在存在于酶活性部位中的赖氨酸残基对(例如)蛋白质活性为重要的情况下,或在赖氨酸残基在调节蛋白质与其他生物分子的相互作用中起作用的情况下,如在受体结合部位的情况下,所述局限性可为重大局限性。

[0015] 用于蛋白质聚乙二醇化的现存方法的第二且同等重要的复杂性是, PEG 衍生物可经历与不同于所要求的所述残基的残基的非所要求副反应。组氨酸含有结构上表示为 $-N(H)-$ 的反应性亚氨基部分,而与 ϵ $-NH_2$ 反应的许多化学反应性物质也能与 $-N(H)-$ 反应。同样地,氨基酸半胱氨酸的侧链带有结构上表示为 $-SH$ 的游离巯基。在一些情况下,定向于赖氨酸的 ϵ $-NH_2$ 基团处的 PEG 衍生物也会与半胱氨酸、组氨酸或其他残基反应。所述反应可产生 PEG 衍生生物活性分子的复杂的、非均匀混合物并且冒有破坏被作为目标的生物活性分子的活性的风险。希望开发 PEG 衍生物,其容许将化学官能团引入蛋白质中的单一部位处,然后使一种或者多种 PEG 聚合物能够与蛋白质表面上的定义

明确和可预测的特异部位处的生物活性分子选择性偶合。

[0016] 除赖氨酸残基之外,已经针对将包括半胱氨酸、组氨酸和 N-末端的其他氨基酸侧链作为目标的活化 PEG 试剂的开发而进行相当大的努力。参见(例如),以引用的方式并入本文中的第 6,610,281 号美国专利和“Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation”,Nektar Molecular Engineering Catalog,2003,第 1-17 页。能使用定位诱变和所属领域中已知的其他技术,部位选择性地半胱氨酸残基引入蛋白质的结构中,并且得到的游离硫氢基部分可与带有硫醇-反应性官能团的 PEG 衍生物反应。然而,所述方法是复杂的,因为游离硫氢基的引入使所得蛋白质的表达、折叠和稳定性复杂化。因此,希望拥有一种将化学官能团引入生物活性分子中的方式,其使一种或一种以上 PEG 聚合物能够与蛋白质选择性地偶合,同时能够与硫氢基和通常见于蛋白质中的其他化学官能团相容(也就是,不在非所要求的副反应中与硫氢基和通常见于蛋白质中的其他化学官能团啮合)。

[0017] 如从所属领域的抽样可见,已被开发用于连接蛋白质的侧链,尤其是连接赖氨酸氨基酸侧链上的 $-NH_2$ 部分和半胱氨酸侧链上的 $-SH$ 部分的许多所述衍生物,已经证明在其合成和使用中是有问题的。一些衍生物与蛋白质形成不稳定的键,所述键遭受水解且因此分解、降解或否则在水相环境中,诸如在血流中为不稳定的。一些衍生物形成更稳定的键,但在键形成之前遭受水解,意思是 PEG 衍生物上的反应性基团可能在能连接蛋白质之前失活。一些衍生物是稍微有毒的且因此较少适用于活体内。一些衍生物反应太慢以至于实际上不为有效的。一些衍生物通过连接于产生蛋白质的活性的部位而造成蛋白质活性的损失。一些衍生物对其将连接的部位不为特异性的,其也会造成所需活性的损失和缺乏结果的重现性。为克服与用聚(乙二醇)部分修饰蛋白质有关的挑战,已经开发更稳定的(例如,美国专利第 6,602,498 号,其是以引用的方式并入本文中)或与分子和表面上的硫醇部分选择性反应(例如,美国专利第 6,610,281 号,其是以引用的方式并入本文中)的 PEG 衍生物。在所属领域中无疑地需要,在生理环境中为化学惰性的直到要求选择性地反应以形成稳定化学键为止的 PEG 衍生物。

[0018] 因此,目前存在对提供呈适用于人类治疗应用的大体上纯形式的 hGH 多肽的未满足的需要。另外,需要生产医药级别 hGH 多肽的按照高效和有生产成本价值的大规模生产的方法。

发明内容

[0019] 本发明一般来说涉及从重组宿主细胞或培养基生产和纯化 hGH 多肽。更确切地说,本发明涉及从包括(但不限于)原核宿主、细菌宿主或大肠杆菌宿主的重组宿主生产和纯化大体上纯化的 hGH 多肽。

[0020] 在一个实施例中,本发明提供用于分离大体上纯化的 hGH 多肽的方法,所述方法包含的步骤是:(a)阴离子交换色谱法;和(b)疏水相互作用色谱法(HIC)。聚乙二醇化 hGH 多肽的纯化包括以下另外的步骤:(c)使 hGH 多肽与 PEG 反应以形成 hGH-PEG 结合物;和(d)通过阴离子交换色谱法分离所述 hGH-PEG 结合物。

[0021] 在另一个实施例中,本发明提供用于分离大体上纯化的 hGH 多肽的方法,所述方法包含的步骤是:(a)阴离子交换色谱法;和(b)羟磷灰石色谱法;和(c)疏水相互作用色

谱法(HIC)。聚乙二醇化 hGH 多肽的纯化包括以下另外的步骤:(d)使 hGH 多肽与 PEG 反应以形成 hGH-PEG 结合物;和(e)通过阴离子交换色谱法分离所述 hGH-PEG 结合物。

[0022] 在一个实施例中,重组宿主是选自由原核细胞和真核细胞组成的群组。在一个实施例中,重组宿主可能包含生产包含 hGH 多肽的诸如内含体的不溶性亚细胞组分的任何宿主细胞,其包括(例如),酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞和包括(例如)大肠杆菌的细菌细胞。

[0023] 适用于本发明的方法的疏水相互作用色谱物质可能包括(但不限于)经烷基或芳基取代的基质,诸如经丁基、己基、辛基或苯基取代的基质,其包括琼脂糖、交联琼脂糖、琼脂糖凝胶、纤维素、硅石、葡聚糖、聚苯乙烯、聚(甲基丙烯酸酯)基质和包括(但不限于)聚乙烯胺树脂或经丁基或苯基取代的聚(甲基丙烯酸酯)基质的混合型树脂。在一个具体的实施例中,疏水相互作用色谱物质可能包含苯基琼脂糖凝胶树脂。

[0024] 在一个实施例中,通过本文中描述的方法分离的大体上纯化的 hGH 多肽可能包括(但不限于),成熟 hGH、成熟 hGH 变体、hGH 多肽、hGH 多肽变体和与聚(乙二醇)结合的 hGH。

[0025] 在另一个实施例中,通过本发明的方法分离的大体上纯化的 hGH 多肽可能显示成熟 hGH 的至少一种生物活性。

[0026] 在另一个实施例中,通过本发明的方法分离的大体上纯化的 hGH 多肽可能是哺乳动物的。在一个具体的实施例中,通过本发明的方法分离的大体上纯化的 hGH 多肽可能是人类的。

[0027] 在本发明的另一个实施例中,从 HIC 步骤获得的 hGH 多肽是共价地与水溶性聚合物连接。在一些实施例中,水溶性聚合物是聚(乙二醇)。在另一个实施例中,hGH 多肽包含一个或一个以上非天然编码的氨基酸。

[0028] 包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的表达和其聚乙二醇化形式的纯化提供以部位特异性方式改变的 hGH 分子用于治疗用途。hGH 多肽在天然编码的氨基酸处的聚乙二醇化可能会造成 hGH 多肽在非所要求的部位的聚乙二醇化和/或可能为污染物的非所要求的多肽的聚乙二醇化。利用非天然编码的氨基酸用于 hGH 多肽的部位特异性聚乙二醇化的方法使所述纯化步骤为不必要的。

[0029] 在另一个实施例中,由于用于与非天然的氨基酸结合的独特的化学反应,包含一个或一个以上非天然存在的氨基酸的 hGH 多肽与包括(但不限于)PEG 的另一分子的结合,提供大体上纯化的 hGH 多肽。包含一个或一个以上非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽与诸如 PEG 的另一分子的结合,可能与在结合步骤之前或之后执行的其他纯化技术一起执行,以提供大体上纯的 hGH 多肽。

附图说明

[0030] 图 1 展示 8 升发酵的进料流动速率;

[0031] 图 2 展示 5 升规模的发酵过程;

[0032] 图 3 为板 A 和 B 展示通过周质释放和匀化作用制备的 hGH 多肽的 SDS-PAGE 分析;

[0033] 图 4 展示用于 5 升发酵的工艺流程;

[0034] 图 5 展示直链、30kDa PEG 的化学结构。

具体实施方式

[0035] 定义

[0036] 应了解,本发明不受限于本文中描述的具体方法、方案、细胞系、构筑体和试剂并且因而可能变化。也应了解,本文中使用的术语仅是为了描述具体实施例,并且不打算限制本发明的范畴,本发明的范畴将仅通过附加权利要求来限制。

[0037] 按本文和附加权利要求中所使用,除非上下文另外清楚地指示,否则单数形式“一”和“所述”包括复数个参考物。因此,(例如)参考一种“hGH”是参考一种或一种以上所述蛋白质并且包括所属领域的技术人员已知的其等价物,等等。

[0038] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域的技术人员通常所了解的相同的含义。尽管可将相似于或等价于本文中描述的方法、设备和物质的任何方法、设备和物质用于本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的方法、设备和物质。

[0039] 本文中提及的所有公开案和专利是以引用的方式并入本文中,以达到描述和揭示(例如)公开案中描述的,可能与当前描述的发明联系使用的构筑体和方法的目的。所提供的本文中讨论的公开案仅为在本专利申请案的申请日之前的其揭示案。本文将被解释为承认发明者由于先前发明或由于任何其他原因比所述揭示案提前授权。

[0040] 第 11/046,432 号美国专利申请案是以引用的方式全部并入本文。第 11/046,432 号美国专利申请案描述 hGH 的天然存在的氨基酸序列、并入非天然编码的氨基酸的部位选择和用于制造、纯化、表征和使用非天然编码的氨基酸、非天然编码的氨基酸 hGH 多肽和经修饰非天然编码的氨基酸 hGH 多肽的方法、组合物、技术和策略。

[0041] 按本文中所使用的术语“蛋白质”包括,氨基酸的聚合物或各种聚合物的复合物并且不意味着规定长度的氨基酸的聚合物。因此,无论使用重组技术、化学或酶催化合成来生产还是天然存在,(例如)术语肽、寡肽和多肽都包括于蛋白质的定义中。术语也包括已经通过糖基化作用、乙酰化作用、磷酸化作用,诸如此类而修饰或衍生的肽、寡肽和多肽。按本文中所定义,术语“蛋白质”特别包括变体。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可交替地使用以指氨基酸残基的聚合物。换句话说,针对多肽的描述同样地适用于肽的描述和蛋白质的描述,并且反之亦然。术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或一个以上氨基酸残基为非天然编码的氨基酸的氨基酸聚合物。按本文中所使用,术语涵盖包括全长蛋白质的具有任何长度的氨基酸链,其中氨基酸残基是通过共价肽键来连接。

[0042] 按本文中所使用,“生长激素”或“GH”应包括具有人类生长激素以及其 GH 类似物、GH 同功异构型、GH 模拟物、GH 片段、杂交 GH 蛋白质、融合蛋白质、寡聚体和多聚体、同源物、糖基化型变体、变体、剪接变体和突变型蛋白中的至少一种生物活性的所述多肽和蛋白质,与上述物质的生物活性无关并且另外与包括(但不限于)在活体外、活体内,通过核酸分子的微量注射而重组(无论由 cDNA、染色体组 DNA、合成 DNA 还是其他形式的核酸产生)的方法、合成方法、转基因方法和基因活化方法的其合成或制造的方法无关。术语“hGH 多肽”或“hGH”涵盖包含一个或一个以上氨基酸取代、添加或缺失的 hGH 多肽。在天然存在的 hGH 中的多个氨基酸位置上的示范性取代,包括增加促效剂活性,增加蛋白酶抵抗性,将多肽转化成拮抗剂,调节免疫原性,调节受体结合等等的取代,都由术语“hGH 多肽”来涵盖。

[0043] 对完整全长的天然存在的 GH 氨基酸序列以及成熟的天然存在的 GH 氨基酸序

列和天然存在的突变体来说,分别参见本文中的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3。在一些实施例中,本发明的 hGH 多肽大体上等同于 SEQ ID NO:1,或 SEQ ID NO:2,或 SEQ ID NO:3 或生长激素多肽的任何其他序列。已经识别 hGH 的大量天然存在的突变体。所述突变体包括 hGH-V (Seeburg, DNA1:239(1982);以引用的方式并入本文的第 4,446,235、4,670,393 和 4,665,180 号美国专利)和含有 hGH 的残基 32-46 的缺失的 20-kDa hGH (Kostyo 等人, Biochem. Biophys. Acta 925:314(1987); Lewis, U. 等人, J. Biol. Chem., 253:2679-2687(1978))。胎盘生长激素描述于 Igout, A. 等人, Nucleic Acids Res. 17(10):3998(1989) 中。另外,已经报道由后转录、后转译、分泌、代谢过程和其他生理学过程而产生的许多 hGH 变体,其包括经酶解裂解的变体或 2 链变体 (Baumann, G., Endocrine Reviews 12:424(1991))。编码 hGH 突变体和突变 hGH 多肽的核酸分子是众所周知的并且包括(但不限于)揭示于第 5,534,617;5,580,723;5,688,666;5,750,373;5,834,250;5,834,598;5,849,535;5,854,026;5,962,411;5,955,346;6,013,478;6,022,711;6,136,563;6,143,523;6,428,954;6,451,561;6,780,613 号美国专利和美国专利申请公开案 2003/0153003 中的所述核酸分子;所述专利以引用的方式并入本文。术语“ahGH”也可用以指具有非天然编码的氨基酸的定位取代的重组人类生长激素。

[0044] 除非另作说明(也就是说,当说明比较是基于 SEQ ID NO:1、3 或其他 hGH 序列时),否则对本文中描述的 hGH 中的氨基酸位置的所有参考是基于 SEQ ID NO:2 中的位置。所属领域的技术人员将了解,对应于 SEQ ID NO:1、2、3 或任何其他 GH 序列中的氨基酸位置的位置可在诸如 hGH 融合体、变体、片段等的任何其他 hGH 分子中被容易地识别。举例而言,诸如 BLAST 的序列比对程序能用以比对和识别在蛋白质中对应于 SEQ ID NO:1、2、3 或其他 GH 序列中的位置的具体位置。本文中描述的关于 SEQ ID NO:1、2、3 或其他 GH 序列的氨基酸的取代、缺失或添加也欲指本文中描述的或所属领域中已知的 hGH 融合体、变体、片段等等中的对应位置上的取代、缺失或添加,并且明确地通过本发明而涵盖。

[0045] hGH 的商业制剂以下列名称出售:Humatrope™ (Eli Lilly & Co.)、Nutropin™ (Genentech)、Norditropin™ (Novo-Nordisk)、Genotropin™ (Pfizer)和 Saizen/Serostim™ (Serono)。

[0046] 术语“hGH 多肽”也包括天然存在的 hGH 的医药学上可接受的盐和前药,和盐的前药,多晶型物、水合物、溶剂化物,生物活性片段,生物活性变体和立体异构体,以及天然存在的 hGH 的促效剂、模拟物,和拮抗剂变体,和其多肽融合体。包含位于氨基末端、羧基末端或两者处的其他氨基酸的融合体都由术语“hGH 多肽”涵盖。示范性融合体包括(但不限于),(例如)甲硫氨酸与由重组表达产生的 hGH 的 N 末端连接的甲硫氨酰基生长激素,用于纯化目的的融合体(包括(但不限于)聚组氨酸或亲和力抗原决定基),与血清白蛋白结合肽形成的融合体和与诸如血清白蛋白的血清蛋白形成的融合体。以引用的方式并入本文的第 5,750,373 号美国专利,描述用于选择对于其各自的受体分子具有改变的结合性质的新颖蛋白质(诸如生长激素)和抗体片段变体的方法。所述方法包含使编码所关注的蛋白质的基因与丝状噬菌体 M13 的基因 III 外壳蛋白的羧基末端域融合。

[0047] 各种参考文献揭示通过聚合物结合或糖基化作用修饰多肽。术语“hGH 多肽”包括与诸如 PEG 的聚合物结合的多肽并且可能包含半胱氨酸、赖氨酸或其他残基的一种或一种

以上其他衍生物。另外, hGH 多肽可能会包含连接子或聚合物, 其中与连接子或聚合物结合的氨基酸可能为根据本发明的非天然氨基酸, 或可能会利用诸如与赖氨酸或半胱氨酸偶合的所属领域中已知的技术与天然编码的氨基酸结合。

[0048] 本发明提供具有多种官能团、取代基或部分的 hGH 多肽与包括(但不限于)以下物质的其他物质的结合物: 标记; 染料; 聚合物; 水溶性聚合物; 聚乙二醇的衍生物; 光致交联剂; 放射性核素; 细胞毒素化合物; 药物; 亲和标记; 光亲和标记; 反应性化合物; 树脂; 第二蛋白质或多肽或多肽类似物; 抗体或抗体片段; 金属螯合剂; 辅助因子; 脂肪酸; 碳水化合物; 多核苷酸; DNA; RNA; 反义多核苷酸; 糖类; 水溶性树枝状聚合物; 环糊精; 抑制性核糖核酸; 生物材料; 纳米粒子; 自旋标记物; 荧光团、含金属部分; 放射性部分; 新颖官能团; 与其他分子共价地或非共价地相互作用的基团; 光致笼罩部分; 可光敏异构化部分; 生物素; 生物素的衍生物; 生物素类似物; 并入重原子的部分; 化学上可裂解的基团; 可光致裂解的基团; 伸长的侧链; 碳连接的糖; 氧化还原活性剂; 氨基硫代酸; 有毒的部分; 同位素标记的部分; 生物物理学探针; 发磷光的基团; 化学发光的基团; 电子密基团; 磁性基团; 插入基团; 发色团; 能量转移剂; 生物活性剂; 可检测标记; 小分子; 量子点、纳米传导物质、放射性核、放射性传导物质、中子俘获剂或上述物质的任何组合, 或任何其他所需的化合物或物质。

[0049] 已经报道 hGH 多肽的聚合物结合物。参见, (例如) 以引用的方式并入本文的第 5, 849, 535、6, 136, 563 和 6, 608, 183 号美国专利。第 4, 904, 584 号美国专利揭示聚乙二醇化赖氨酸缺失的多肽, 其中至少一个赖氨酸残基已经缺失或由任何其他氨基酸残基置换。WO 99/67291 揭示用于将蛋白质与 PEG 结合的方法, 其中蛋白质上的至少一个氨基酸残基缺失并且在足以达成与蛋白质结合的条件下, 使蛋白质与 PEG 接触。WO 99/03887 揭示属于生长激素超家族的多肽的聚乙二醇化变体, 其中半胱氨酸残基已经由位于多肽的规定区域中的非必需氨基酸残基取代。WO 00/26354 揭示生产具有降低变应原性的糖基化多肽变体的方法, 当与对应母体多肽相比时, 其包含至少一个其他的糖基化作用部位。第 5, 218, 092 号美国专利揭示粒性白细胞群落刺激因子(G-CSF) 和其他多肽的修饰, 以便当与天然多肽相比时, 引入至少一个其他的碳水化合物链。

[0050] 术语“hGH 多肽”涵盖包含一个或一个以上氨基酸取代、添加或缺失的 hGH 多肽。本发明的 hGH 多肽可以包含用一个或一个以上天然氨基酸的修饰连同一个或一个以上非天然氨基酸修饰。已经描述了在天然存在的 hGH 多肽中的多种氨基酸位置上的示范性取代, 其包括(但不限于), 调节 hGH 多肽的一个或一个以上生物活性的取代, 诸如(但不限于) 增加促效剂活性、增加多肽的可溶性, 将多肽转化成拮抗剂, 降低蛋白酶敏感性等等的取代并且由术语“hGH 多肽”涵盖。在一些实施例中, hGH 多肽另外包含调节 hGH 多肽的生物活性的添加、取代或缺失。举例而言, 添加、取代或缺失可以调节对 hGH 多肽受体的亲和力, 调节(包括(但不限于) 增加或降低) 受体二聚作用, 稳定受体二聚物, 调节循环半衰期, 调节治疗半衰期, 调节多肽的稳定性, 通过蛋白酶调节裂解, 调节剂量, 调节释放或生物可用性, 促进纯化, 或改善或改变具体的投药路线。

[0051] 同样地, hGH 多肽可以包含改善多肽的检测(包括(但不限于) GFP)、纯化或其他特性的蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体结合域(包括(但不限于), FLAG 或聚 His) 或其他基于亲和力的序列(包括(但不限于) FLAG、聚 His、GST 等) 或连接分子(包括(但不限于) 生物

素)。hGH 多肽可以包含分泌信号序列。分泌信号序列的实例包括(但不限于),原核分泌信号序列、真核分泌信号序列、5' 最佳化用于细菌表达的真核分泌信号序列、新颖分泌信号序列、果胶酸裂合酶分泌信号序列、Omp A 分泌信号序列和噬菌体分泌信号序列。分泌信号序列的实例包括(但不限于),STII (原核的)、Fd GIII 和 M13 (噬菌体)、Bg12 (酵母)和由转位子得到的信号序列 bla。

[0052] 术语“hGH 多肽”也涵盖所连接的同源二聚体、异源二聚体、同源多聚体和异源多聚体,其包括(但不限于)直接通过非天然编码的氨基酸侧链而连接于相同或不同非天然编码的氨基酸侧链,连接于天然编码的氨基酸侧链,或间接通过连接子来连接的所述聚合物。直接通过 Cys-Cys 二硫键连接的 hGH 二聚物描述于 Lewis, U. J. 等人, J. Biol. Chem. 252:3697-3702(1977); Brostedt, P. 和 Roos, P., Prep. Biochem. 19:217-229(1989) 中。示范性连接子包括(但不限于)诸如聚(乙二醇)或聚葡聚糖或具有各种长度的多肽的水溶性聚合物。

[0053] 术语“hGH 多肽”也包括糖基化的 hGH, 诸如(而不限)在任何氨基酸位置糖基化的多肽, 多肽的由 N 连接或由 O 连接的糖基化形式。含有单一核苷酸改变的变体也被认为是 hGH 多肽的生物活性变体。另外, 也包括剪接变体。术语“hGH 多肽”也包括以下物质的 hGH 多肽异源二聚体、同源二聚体、异源多聚体或同源多聚体: 通过化学方式连接或表达为融合蛋白质的任何一种或一种以上 hGH 多肽或任何其他多肽、蛋白质、碳水化合物、聚合物、小分子、连接子、配位体或任何其他类型的其他生物活性分子, 以及含有(例如)特异缺失或其他维持生物活性的修饰的多肽类似物。

[0054] 所属领域的技术人员将了解, 对应于具体 hGH 序列中的位置的氨基酸位置可在诸如 hGH 融合体、变体、片段等的任何其他 hGH 分子中被容易地识别。举例而言, 诸如 BLAST 的序列比对程序能用以比对和识别在蛋白质中对应于具体的 GH 序列中的位置的具体位置。

[0055] 按本文中所使用, “天然的 hGH” 是定义为包括天然存在的 hGH、其类似物和变体的 hGH, 其为适当折叠的并且仅含有合适的二硫键。hGH 也含有参与两个分子内的二硫键的 4 个半胱氨酸残基: C53 与 C165 成对并且 C182 与 C189 成对, 或 hGH 的类似物和变体中的所述氨基酸残基的同系物。天然 hGH 是生物活性的。

[0056] “不溶性 hGH” 指的是沉淀的或聚集的 hGH, 换句话说是由重组宿主细胞或另外相关的重组宿主细胞而生产的 hGH, 并且可以采取具有可能的不恰当的或未成形的二硫键的生物惰性构象。不溶性 hGH 可以包含在内含体或可折射体中, 也就是说, 在相衬显微镜下可能或可能不为可见的。不溶性 hGH 可以通过由所属领域的技术人员已知的任何方法, 使可溶性 hGH 成为不溶性而生产。

[0057] “不适当折叠的 hGH” 指的是处于具有不恰当的或未成形的二硫键的较低生物活性的构象的 hGH。不适当折叠的 hGH 可以(但无须)是不溶性。

[0058] 按本文中所使用, 术语“hGH 变体”包括成熟 hGH 和 hGH 多肽的变体。“hGH 变体”可以通过(例如)一个或一个以上氨基酸在成熟蛋白质中的一个或一个以上的部位处的缺失或添加, 使一个或一个以上氨基酸在成熟蛋白质的 N-末端和/或 C-末端的缺失或添加, 和/或一个或一个以上氨基酸在成熟蛋白质的一个或一个以上的部位处的取代来产生且包括一个或一个以上氨基酸在成熟蛋白质中的一个或一个以上的部位处的缺失或添加, 使一个或一个以上氨基酸在成熟蛋白质的 N-末端和/或 C-末端的缺失或添加, 和/或一个或一

个以上氨基酸在成熟蛋白质的一个或一个以上的部位处的取代。举例而言, hGH 变体可以通过添加或缺失至少 10 个氨基酸、至少 5 个氨基酸、至少 3 个氨基酸或至少 1 个氨基酸而产生。hGH 变体也可以包括后转译修饰, 包括(但不限于) 糖基化作用、乙酰化作用、磷酸化作用, 诸如此类。术语“hGH 变体”特别包括(但不限于) 成熟 hGH 序列的突变体、等位变体、同系物和融合体。hGH 变体也包括(但不限于) 肽模拟物或“类肽”。参见 WO 91/04282。

[0059] 术语“大体上纯化的”指的是如下 hGH 多肽, 在重组产生的 hGH 多肽的情况下其可能为大体上或基本上不含有如在其天然存在的环境中, 也就是在天然细胞或宿主细胞中所见的正常地伴随或与蛋白质相互作用的组分。可能为大体上不含细胞物质的 hGH 包括具有小于约 30%、小于约 25%、小于约 20%、小于约 15%、小于约 10%、小于约 5%、小于约 4%、小于约 3%、小于约 2% 或小于约 1% (以干重计) 的污染蛋白质的蛋白质制剂。当 hGH 多肽或其变体是由宿主细胞重组生产时, 蛋白质可能以细胞干重的约 30%、约 25%、约 20%、约 15%、约 10%、约 5%、约 4%、约 3%、约 2% 或约 1% 或更少的量而存在。当 hGH 多肽或其变体是由宿主细胞重组生产时, 蛋白质可能以细胞干重的约 5g/L、约 4g/L、约 3g/L、约 2g/L、约 1g/L、约 750mg/L、约 500mg/L、约 250mg/L、约 100mg/L、约 50mg/L、约 10mg/L 或约 1mg/L 或更少的量而存在于培养基中。因此, 如通过包括(但不限于) SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、SEC 和毛细管电泳法的适当方法所测定, 通过本发明的方法生产的“大体上纯化的”hGH 多肽可以具有至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70% 的纯度水平, 特别地, 至少约 75%、80%、85% 的纯度水平, 和更特别地, 至少约 90% 的纯度水平, 至少约 95% 的纯度水平、至少约 99% 或更大的纯度水平。

[0060] “重组宿主细胞”或“宿主细胞”指的是包括外生多核苷酸的细胞, 不管用于插入的方法如何, 例如直接吸收、转导、f- 配合或所属领域中已知的产生重组宿主细胞的其他方法。外生多核苷酸可以维持为例如质粒的非结合载体形式, 或者可以结合到宿主基因组中。

[0061] 按本文中所使用, 术语“培养基”包括可以支撑或含有包括细菌宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳动物宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、CHO 细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌或假单胞菌宿主细胞(Pseudomonas host cell)的任何宿主细胞和细胞内含物的任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性支撑物。因此, 术语可涵盖宿主细胞已经生长于其中的培养基, 例如已经将 hGH 多肽分泌到其中的培养基, 包括在增殖步骤之前或之后的培养基。术语也可以(诸如)在 hGH 多肽为细胞内生产的并且宿主细胞被溶解或分裂以释放 hGH 多肽的情况下, 涵盖含有宿主细胞溶胞产物的缓冲液或试剂。

[0062] 关于蛋白质再折叠, 如本文中所使用的“还原剂”是定义为将硫氢基维持在还原状态并且还原分子内或分子间的二硫键的任何化合物或物质。适合的还原剂包括(但不限于) 二硫苏糖醇(DTT)、2- 巯基乙醇、二硫赤藓糖醇、半胱氨酸、半胱胺(2- 氨基乙硫醇)和还原的谷胱甘肽。对所属领域的技术人员来说显而易见的是, 多种还原剂适用于本发明的方法。

[0063] 关于蛋白质再折叠, 如本文中所使用的“氧化剂”是定义为能够从被氧化的化合物除去电子的任何化合物或物质。适合的氧化剂包括(但不限于), 氧化型谷胱甘肽、胱氨酸、胱胺、氧化的二硫苏糖醇、氧化的赤藻糖醇(oxidized erythreitol)和氧。对所属领域的技术人员来说显而易见的是, 多种氧化剂适用于本发明的方法。

[0064] 如本文中所使用, “变性剂”是定义为将引起蛋白质的可逆的解折叠的任何化合物或物质。变性剂的强度将通过具体的变性剂的性质和浓度来确定。适合的变性剂可以是离

液剂、洗涤剂、有机溶剂、可水混溶性溶剂、磷脂或两种或两种以上的所述药剂的组合。适合的离液剂包括(但不限于)尿素、胍和硫氰酸钠。有效的洗涤剂可以包括(但不限于)诸如十二烷基硫酸钠或聚氧乙烯醚(例如, Tween 或 Triton 洗涤剂)的强洗涤剂、Sarkosyl、温和非离子型洗涤剂(例如, 毛地黄皂苷)、诸如 N-2, 3- (二油氧基(dioleyoxy))- 丙基 -N, N, N- 三甲基铝的温和阳离子洗涤剂、温和离子型洗涤剂(例如, 胆酸钠或去氧胆酸钠)或包括(但不限于)磺酸内铵盐(Zwittergent(两性洗涤剂))、3-(3- 胆酰胺基丙基) 二甲基氨基 -1- 丙烷硫酸盐(CHAPS)和 3-(3- 胆酰胺基丙基) 二甲基氨基 -2- 羟基 -1- 丙烷亚硫酸盐(CHAPSO)的两性离子洗涤剂。诸如乙腈、低碳烷醇(尤其是诸如乙醇或异丙醇的 C₂-C₄ 烷醇)或低碳烷二醇(尤其是诸如乙二醇的 C₂-C₄ 烷二醇)的有机的、可水混溶性的溶剂可以用作变性剂。适用于本发明的磷脂可以是诸如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇的天然存在的磷脂或诸如二己酰磷脂酰胆碱或二庚酰磷脂酰胆碱的合成磷脂衍生物或变体。

[0065] 按本文中所使用,“再折叠”描述就二硫键而言将含有二硫键的多肽从不适当折叠的或解折叠的状态转变到天然的或适当折叠的构象的任何过程、反应或方法。

[0066] 按本文中所使用,“共折叠”特别指的是使用至少两条彼此相互作用的多肽并且使解折叠的或不适当折叠的多肽转变成天然的、适当折叠的多肽的再折叠过程、反应或方法。

[0067] “非天然编码的氨基酸”指的是不为 20 种常见氨基酸之一或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸的氨基酸。可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义地使用的其他术语是“非天然的氨基酸”、“人造氨基酸(unnatural amino acid)”、“非天然存在的氨基酸”和其各种用连字号连接的和非用连字号连接的版本。术语“非天然编码的氨基酸”也包括(但不限于),通过天然编码的氨基酸(包括(但不限于)20 种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)的修饰(例如,后转译修饰)产生的氨基酸,但不为通过转译复合物而天然并入生长中的多肽链的氨基酸。所述非天然存在的氨基酸的实例包括(但不限于)N- 乙酰氨基葡萄糖基(acetylglucosaminy) -L- 丝氨酸、N- 乙酰氨基葡萄糖基 -L- 苏氨酸和 O- 磷酸化酪氨酸。

[0068] 按本文中所使用,术语“水溶性聚合物”指的是可溶于水性溶剂中的任何聚合物。水溶性聚合物与 hGH 多肽的键合可产生如下改变:包括(但不限于)相对于非修饰形式来说,增加或调节血清半衰期或增加或调节治疗半衰期,调节免疫原性,调节诸如聚集和多聚体形成的物理的缔合特征,改变受体结合和改变受体二聚作用或多聚作用。水溶性聚合物可以具有或不具有其自己的生物活性,并且可以用作连接子将 hGH 连接到包括(但不限于)一种或一种以上 hGH 多肽或一种或一种以上生物活性分子的其他物质。适合的聚合物包括(但不限于),聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其单 C₁-C₁₀ 烷氧基或芳氧基衍生物(描述于以引用的方式并入本文的第 5, 252, 714 号美国专利中)、单甲氧基 - 聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯基醚顺丁烯二酸酐、N-(2- 羟丙基) - 甲基丙烯酰胺、葡聚糖、包括葡聚糖硫酸酯的葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧化丙烯 / 氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、包括(但不限于)甲基纤维素和羧甲基纤维素的纤维素和纤维素衍生物、淀粉和淀粉衍生物、多肽、聚亚烷基二醇和其衍生物、聚亚烷基二醇和其衍生物的共聚物、聚乙烯基醚和 α - β - 聚 [(2- 羟乙基) - DL- 天冬酰胺, 诸如此类或其混合物。所述水溶性聚合物的实例包括(但不限于)聚乙二醇和血清白蛋白。

[0069] “氨基末端修饰基团”指的是可连接于多肽的氨基末端的任何分子。同样地,“羧

基末端修饰基团”指的是可连接于多肽的羧基末端的任何分子。末端修饰基团包括(但不限于)各种水溶性聚合物、肽或诸如血清白蛋白的蛋白质,或增加肽的血清半衰期的其他部分。

[0070] 按本文中所使用,术语“聚亚烷基二醇”或“聚(烯烃二醇)”指的是聚乙二醇(聚(乙二醇))、聚丙二醇、聚丁二醇和其衍生物。术语“聚亚烷基二醇”涵盖直链和支链聚合物和在 0.1kDa 与 100kDa 之间的平均分子量。其他示范性实施例列在(例如)商业供应商的商品目录中,诸如列在 Shearwater Corporation 的目录“Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications”(2001)中。

[0071] 术语“官能团”、“活性部分”、“活化基团”、“离去基团”、“反应性部位”、“化学反应性基团”和“化学反应性部分”用于所属领域并且在本文中指分子的独特的、可定义的部分或单元。所述术语在化学领域中是稍微同义的并且用于本文中指示执行某些功能或活性并且可与其他分子反应的分子的部分。

[0072] 术语“键”或“连接子”在本文中通常指通常由于化学反应而形成的基团或键并且通常是共价键。水解稳定的键意思是在水中大体上为稳定的并且在有效 pH 值下,包括(但不限于)在生理条件下,不与水反应历时一段延长期限的时间(或甚至无限期地)的键。水解不稳定的或可降解的键意思是在水中或在包括(例如)血液的水溶液中可降解的键。酶促不稳定的或可降解的键意思是通过一种或一种以上酶降解的键。按所属领域中的理解,PEG 和相关的聚合物可以包括聚合物主链中的或在聚合物主链与聚合物分子的一个或一个以上的末端官能团之间的连接子基团中的可降解的键。举例而言,通过在生物活性剂上,PEG 羧酸或活化 PEG 羧酸与醇基的反应而形成的酯键通常在生理条件下水解释放药剂。其他水解可降解的键包括(但不限于)碳酸酯键;由胺和醛的反应产生的亚胺键;通过醇与磷酸基反应而形成的磷酸酯键;为酰肼和醛的反应产物的腙键;为醛和醇的反应产物的缩醛键;为甲酸酯和醇的反应产物的原酸酯键;通过(包括(但不限于))在诸如 PEG 的聚合物的末端处的胺基和肽的羧基而形成的肽键;和通过(包括(但不限于))在聚合物的末端处的亚磷酰胺基团和寡核苷酸的 5' 羟基而形成的寡核苷酸键。

[0073] 当术语“生物活性分子”、“生物活性部分”或“生物活性剂”在本文中使用,意思是能影响生物系统、路径、分子的任何物理性质或生物化学性质,或影响与包括(但不限于)病毒、细菌、噬菌体、转位子、蛋白感染素、昆虫、真菌、植物、动物和人类的生物体有关的相互作用的任何物质。具体来说,按本文中所使用,生物活性分子包括(但不限于)为用于诊断、治愈、缓和、治疗或预防人类或其他动物的疾病或另外增强人类或动物的身体或精神的良好状态的任何物质。生物活性分子的实例包括(但不限于)肽、蛋白质、酶、小分子药物、麻醉品、软质药、碳水化合物、无机原子或分子、染料、脂质、核苷、放射性核素、寡核苷酸、毒素、细胞、病毒、脂质体、微粒和胶束。适合供本发明使用的生物活性剂的种类包括(但不限于),药物、前药、放射性核素、显影剂、聚合物、抗生素、杀真菌剂、抗病毒剂、消炎药、抗肿瘤剂、心血管剂、抗焦虑剂、激素、生长因子、甾族药剂、微生物得到的毒素,诸如此类。

[0074] “双官能聚合物”指的是包含两个离散官能团的聚合物,所述官能团能够特异地与其他部分(包括(但不限于)氨基酸侧基)反应以形成共价键或非共价键。具有一个可与具体的生物活性组分上的基团反应的官能团,和另一个可与第二生物组分上的基团反应的基团的双官能连接子,可以用以形成包括第一生物活性组分、双官能连接子和第二生物活性

组分的结合物。用于将各种化合物连接于肽的许多程序和连接子是已知的。参见(例如), 欧洲专利申请案第 188, 256 号 ; 美国专利第 4, 671, 958、4, 659, 839、4, 414, 148、4, 699, 784、4, 680, 338 和 4, 569, 789 号, 所述专利都以引用的方式并入本文。“多官能聚合物”指的是包含两个或两个以上离散官能团的聚合物, 所述官能团能够特异地与其他部分(包括但不限于)氨基酸侧基)反应以形成共价键或非共价键。双官能聚合物或多官能聚合物可以为任何所要求的长度或分子量, 并且可以加以选择以提供连接于 hGH 的一个或一个以上的分子之间的具体的所要求的间隔或构象。

[0075] 在取代基是用其从左到右来书写的惯用化学式说明时, 其同样地涵盖将由从右到左来书写结构而得到的化学上相同的取代基, 例如, 结构 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 相当于结构 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0076] 按本文中所使用, 术语“经调节的血清半衰期”意思是经修饰的 hGH 的循环半衰期相对于其非修饰形式的正性或负性变化。血清半衰期是通过在投与 hGH 后的各种时间点采集血液样本并测定各个样本中的分子浓度来测量。血清浓度随时间的相互关系可计算血清半衰期。希望增加的血清半衰期具有至少约两倍, 但是在(例如)其能促成令人满意的给药方案或避免毒性效应时, 更小的增加可能是有效的。在一些实施例中, 增加量为至少约三倍、至少约五倍或至少约十倍。

[0077] 按本文中所使用, 术语“经调节的治疗半衰期”意思是治疗有效量的 hGH 多肽的半衰期相对于其非修饰形式的正性或负性变化。治疗半衰期是通过在投药后的各个时间点, 测量分子的药动力学和 / 或药效性质来测量。希望增加的治疗半衰期能促成具体的有益的给药方案、具体的有益的总剂量或避免非所要求的效应。在一些实施例中, 增加的治疗半衰期由增加的效力、修饰分子与其目标的增加或降低的结合、通过诸如蛋白酶的酶的分子分解的增加或降低, 或非修饰分子的另一参数或作用机理的增加或降低而产生。

[0078] 当应用于核酸或蛋白质时, 术语“分离”表示, 核酸或蛋白质不含至少一些在自然状态下与其缔合的其他细胞组分, 或核酸或蛋白质已经被浓缩到大于其在活体内或活体外生产中的浓度的水平。其可呈均态。被分离的物质可呈干燥状态或半干状态, 或者处于溶液状态, 包括(但不限于)水溶液。其可为包含其他的医药学上可接受的载剂和 / 或赋形剂的医药组合物的组分。纯度和均质性通常是使用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法的分析化学技术测定。为存在于制剂中的超优势种的蛋白质是大体上纯化的。具体来说, 被分离的基因从侧接基因并且编码不同于所关注的基因的蛋白质的开放阅读框架分离。术语“纯化的”表示, 核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生实质上一个带。确切地说, 其可以意谓, 核酸或蛋白质是至少 85% 纯的、至少 90% 纯的、至少 95% 纯的、至少 99% 或更大纯度的。

[0079] 术语“核酸”指的是呈单链形式或双链形式的脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核苷、核糖核苷或核糖核苷酸和其聚合物。除非特别限制, 否则术语涵盖含有已知天然核苷酸的类似物的核酸, 其具有与参考核酸相似的结合性质并且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另外特别限制, 否则术语也指的是包括 PNA (肽核酸)、用于反义技术中的 DNA 的类似物(硫代磷酸酯、氨基磷酸酯, 诸如此类)的寡核苷酸类似物。除非另外指示, 否则具体的核酸序列也含蓄地涵盖其保守修饰的变体(包括但不限于)简并密码子取代和互补序列以及明确指示的序列。特别地, 简并密码子取代可以通过产生如下序列达成, 其中一个或一个以上的所选择的(或全部)密码子的第三位置由混合碱基和 / 或脱氧肌苷残基取代(Batzer 等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka 等人, *J. Biol.*

Chem. 260:2605-2608(1985);Rossolini 等人, Mol. Cell. Probes8:91-98(1994)。

[0080] 术语“氨基酸”指的是天然存在的和非天然存在的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码的氨基酸是 20 种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天门冬酰胺、天门冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异白氨酸、白氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)和吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物指的是具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,也就是说,具有结合于氢、羧基、氨基和 R 基团的 α 碳的化合物,诸如高丝氨酸、正白氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。所述类似物具有修饰的 R 基团(诸如正白氨酸)或修饰的肽主链,但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。

[0081] 氨基酸可以在本文中通过其通常已知的 3 字母符号或者通过由 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission 推荐的 1 字母符号来提及。同样地,核苷酸可以通过其通常被接受的单一字母代码来提及。

[0082] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于具体的核酸序列,“保守修饰的变体”指的是编码相同或基本上相同的氨基酸序列的所述核酸,或在核酸不编码氨基酸序列时,指的是基本上相同的序列。由于遗传密码的简并,许多功能性相同的核酸编码任何给定蛋白质。举例而言,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸由密码子来规定的每一个位置,密码子能够被改变成所描述的任何对应密码子而不改变所编码的多肽。所述核酸变化是“静止变化”,其为一种保守修饰变化。本文中编码多肽的每一个核酸序列也描述核酸的每一种可能的静止变化。所属领域的技术人员将认识到,核酸中的各个密码子(除通常仅为甲硫氨酸的密码子的 AUG,和通常仅为色氨酸的密码子的 TGG 外)能被修饰以产生功能性相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各种静止变化隐含在所描述的各个序列中。

[0083] 关于氨基酸序列,所属领域的技术人员将认识到,改变、添加或除去所编码序列中的单一氨基酸或小百分比氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别的取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中所述改变造成氨基酸的缺失,氨基酸的添加或由化学相似的氨基酸取代氨基酸。提供功能性相似的氨基酸的保守取代表为所属领域的技术人员所知。所述保守修饰的变体除本发明的多晶变体、种间同系物和等位基因之外并且不排除本发明的多晶变体、种间同系物和等位基因。

[0084] 提供功能性相似的氨基酸的保守取代表为所属领域的技术人员所知。以下八种基团各自含有为用于彼此的保守取代的氨基酸:

[0085] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0086] 2) 天门冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0087] 3) 天门冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0088] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0089] 5) 异白氨酸(I)、白氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0090] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0091] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和

[0092] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)

[0093] (参见(例如), Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co. ;第二版(1993年12月))

[0094] 在两个或两个以上的核酸或多肽序列的情况下,术语“相同”或百分比“同一性”指的是两个或两个以上的相同序列或子序列。当在比较窗口上或指定区域上比较和比对最大对应性时,按使用以下序列比较算法(或所属领域的技术人员可用的其他算法)或通过手工比对和目测检查所测量的,如果序列具有相同的氨基酸残基或核苷酸的百分比(也就是说,在规定区域上约 60% 的同一性、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90% 或约 95% 的同一性),那么序列是“大体上相同的”。所述定义也是指测试序列的互补序列。同一性可存在于长度至少约 50 个氨基酸或核苷酸的区域上,或存在于长度为 75-100 个氨基酸或核苷酸的区域上,或在未规定时,跨越多核苷酸或多肽的全部序列。

[0095] 对序列比较来说,通常一个序列担当与测试序列比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,(必要时)指定子序列坐标并且指定序列算法程序参数。可使用默认的程序参数,或可指定替代参数。序列比较算法随后基于程序参数来计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0096] 按本文中所使用,“比较窗口”包括涉及具有选自 20 到 600,通常约 50 到约 200,更通常约 100 到约 150 组成的群组的任何一个数量的邻近位置的区段,其中在两个序列被最佳比对后,序列可以与具有相同数量的邻近位置的参考序列比较。用于比较的比对序列的方法为所属领域的技术人员所知。用于比较的最佳序列比对法可(包括(但不限于))通过 Smith 和 Waterman(1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c 的局部同源性算法,通过 Needleman 和 Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443 的同源性比对算法,通过 Pearson 和 Lipman(1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*85:2444 的寻找相似性方法的研究,通过所述算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的 GAP、ESTFIT、FASTA 和 TFASTA),或通过手工比对和目测检查(参见(例如) Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 增刊))来进行。

[0097] 适合于测定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法,其分别描述于 Altschul 等人(1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 中,和 Altschul 等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 中。用于执行 BLAST 分析的软件是通过 National Center for Biotechnology Information 而公开获得。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定比对的敏感性和速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)使用 11 的字长,10 的期望值(E),M=5,N=-4 和两个链的比较作为默认值。对氨基酸序列来说,BLASTP 程序使用 3 的字长和 10 的期望值(E)作为默认,并且 BLOSUM62 记分矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89:10915)使用 50 的比对值(B),10 的期望值(E),M=5,N=-4,和两个链的比较作为默认。BLAST 算法通常在“低复杂性”过滤器关闭时执行。

[0098] BLAST 算法也执行两个序列之间的相似性的统计分析(参见(例如) Karlin 和 Altschul(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:5873-5877)。通过 BLAST 算法提供的相似性的一种量度是最小总概率(P(N)),其指示两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配将偶然发生的概率。举例而言,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总概率小于约 0.2,小于约 0.01 或小于约 0.001,那么核酸可以视为与参考序列相似。

[0099] 词组“选择性地(或特别地)杂交成”指的是当序列存在于复杂混合物(包括(但不

限于) 总体细胞或库 DNA 或 RNA) 中时, 在严格杂交条件下, 仅将分子结合、双工或杂交于具体的核苷酸序列。

[0100] 短语“严格杂交条件”指的是在如所属领域中已知的低离子强度和高温条件下, 杂交 DNA、RNA、PNA 或其他核酸模拟物或其组合的序列。通常, 在严格条件下, 探针将杂交到核酸的复杂混合物(包括(但不限于) 总体细胞或库 DNA 或 RNA) 中的其目标子序列, 但未杂交到复杂混合物中的其他序列。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下将为不同的。更长的序列特别地在更高的温度下杂交。核酸杂交的广泛指南可见于 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) 中。通常, 严格条件选择为比在所定义的离子强度 pH 值下, 特定序列的热力学熔点(T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是 50% 补充到目标的探针与处于平衡的目标序列杂交(因为目标序列在 T_m 下过量存在, 所以 50% 的探针在平衡状态下被占据) 的温度(在所定义的离子强度、pH 值和核酸浓度下)。严格条件可以是其中在 pH7.0 到 8.3 下, 盐浓度小于约 1.0M 钠离子, 通常约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度(或其他盐) 并且对短探针(包括(但不限于) 10 到 50 个核苷酸) 来说, 温度至少约 30°C 并且对长探针(包括(但不限于) 大于 50 个核苷酸) 来说, 温度至少约 60°C 的所述严格条件。严格条件也可以由添加诸如甲酰胺的去稳定剂实现。对选择性杂交或特异性杂交来说, 正信号可以是至少 2 次背景杂交, 视需要 10 次背景杂交。示范性严格杂交条件可如下: 50% 甲酰胺、5X SSC 和 1%SDS, 在 42°C 下培养, 或 5X SSC、1%SDS, 在 65°C 下培养, 并在 65°C 下, 在 0.2X SSC 和 0.1%SDS 中洗涤。所述洗涤可执行 5、15、30、60、120 或 120 分钟以上。

[0101] 按本文中所使用, 术语“真核生物”指的是属于真核种系发生域(phylogenetic domain Eucarya) 的生物体, 诸如动物(包括(但不限于) 哺乳动物、昆虫、爬虫、鸟等), 纤毛虫, 植物(包括(但不限于) 单子叶植物、双子叶植物、藻类等), 真菌, 酵母, 鞭毛虫, 微粒子虫目, 原生生物等。

[0102] 按本文中所使用, 术语“非真核生物”指的是非真核生物体。举例而言, 非真核生物体可属于真细菌类(Eubacteria) (包括(但不限于) 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、嗜热细菌(*Thermus thermophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、荧光极毛杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶息极毛杆菌(*Pseudomonas putida*) 等) 种系发生域, 或原生类(Archaea) (包括(但不限于) 詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)、横川病毒(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)、诸如富饶盐菌(*Haloferax volcanii*)和盐杆菌种(*Halobacterium species*) NRC-1 的盐杆菌属(*Halobacterium*)、闪烁古生球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、火球菌(*Pyrococcus furiosus*)、掘越氏热球菌(*Pyrococcus horikoshii*)、嗜热菌敏捷气热菌(*Aeuropyrum pernix*) 等) 种系发生域。

[0103] 按本文中所使用, 术语“受检者”指的是动物, 在一些实施例中为哺乳动物, 并且在其他实施例中为人类, 其为治疗、观察或实验的目标。

[0104] 按本文中所使用, 术语“有效量”指的是所投与的非天然氨基酸多肽的量, 其在某种程度上将减轻欲治疗的疾病、病状或病症的一种或一种以上症状。可投与含有本文中描述的非天然氨基酸多肽的组合物用于预防性、增强性和 / 或治疗性的治疗。

[0105] 术语“增强”意思是增加或延长所要求的效应的效力或持续时间。因此,关于增强治疗剂的效应,术语“增强”指的是在效力或持续时间方面,增加或延长系统中的其他治疗剂的效应的能力。按本文中所使用,“增强有效量”指的是足以增强所要求的系统中的另一治疗剂的效应的量。当用于患者时,有效用于所述用途的量将视疾病、病症或病状的严重性和病程,上述的疗法,患者的健康状况和对药物的反应,和治疗医师的判断而定。

[0106] 按本文中所使用,术语“经修饰”指的是对给定多肽进行的任何改变,诸如对多肽的长度、氨基酸序列、化学结构的改变,多肽的共转译修饰或后转译修饰。术语“(经修饰的)”形式意思是所讨论的多肽视需要被修饰,也就是说,讨论中的多肽能被修饰或不被修饰。

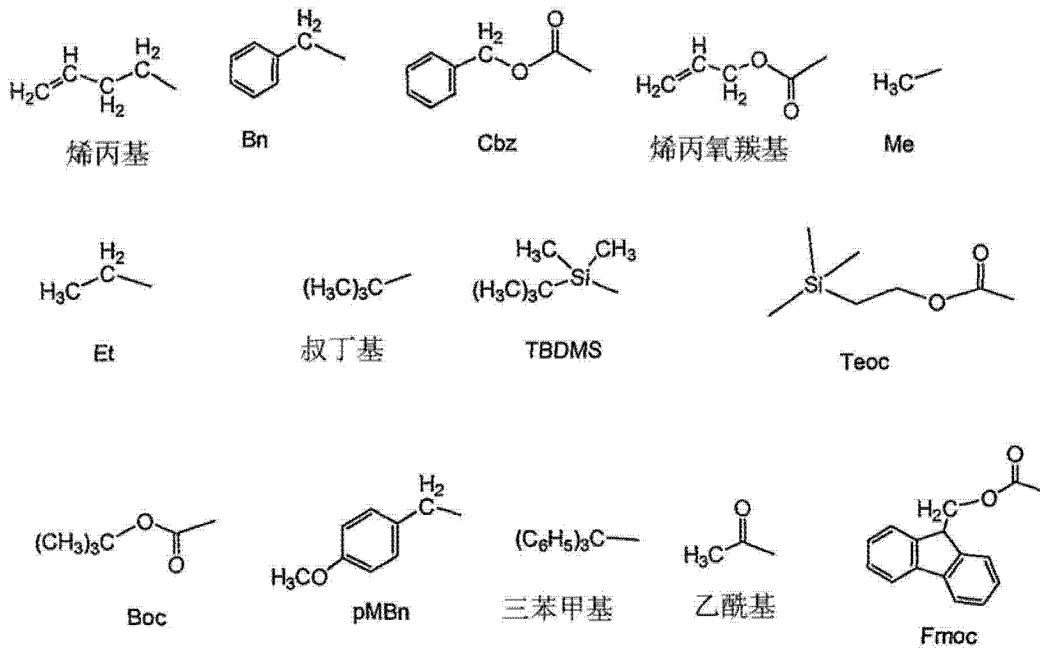
[0107] 术语“经后转译修饰的”指的是天然或非天然的氨基酸在其已经并入多肽链后,所述氨基酸发生的任何修饰。术语涵盖(仅举例而言)共转译的活体内修饰、共转译的活体外修饰(诸如,在无细胞转译的系统中)、后转译的活体内修饰和后转译的活体外修饰。

[0108] 在预防性应用中,将含有非天然的氨基酸多肽的组合物投与对具体的疾病、病症或病状敏感的或相反冒患有具体的疾病、病症或病状的风险的患者。所述量是定义为“预防性有效量”。在所述用途中,精确的量也视患者的健康状态、体重,诸如此类而定。所属领域的技术人员对通过常规实验(例如,剂量递增临床试验)来确定所述预防性有效量有充分了解。

[0109] 术语“经保护的”指的是防止化学反应性官能团在某些反应条件下反应的“保护基”或部分的存在。保护基将视被保护的化学反应性基团的类型而定。举例而言,如果化学反应性基团是胺或酰胺,那么保护基可选自叔丁基氧基羰基(t-Boc)和9-芴甲氧基羰基(Fmoc)的群组。如果化学反应性基团是硫醇,那么保护基可为邻吡啶基二硫化物。如果化学反应性基团是诸如丁酸或丙酸的羧酸,或羟基,那么保护基可为苄基或诸如甲基、乙基或叔丁基的烷基。所属领域中已知的其他保护基,包括诸如 Nvoc 和 MeNvoc 的对光不稳的基团,也可以用于本文中描述的方法和组合物中或与本文中描述的方法和组合物一起使用。所属领域中已知的其他保护基也可以用于本文中描述的方法和组合物中或与本文中描述的方法和组合物一起使用。

[0110] 仅举例而言,封端/保护基可以选自:

[0111]



[0112] 其他保护基描述于 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 中, 其是以引用的方式全部并入本文。

[0113] 在治疗应用中, 将量足以治愈或至少部分地阻止疾病、病症或病状的症状的含有(经修饰的)非天然的氨基酸多肽的组合物, 投与已经遭受疾病、病状或病症的患者。所述量是定义为“治疗有效量”, 并且将视疾病、病症或病状的严重性和病程, 上述的疗法, 患者的健康状况和对药物的反应, 和治疗医师的判断而定。所属领域的技术人员对通过常规实验(例如, 剂量递增临床试验)来确定所述治疗有效量有充分了解。

[0114] 术语“治疗”通常指预防性和/或治疗性治疗。

[0115] 本文中提出的非天然编码的氨基酸多肽可以包括经同位素标记的化合物, 其具有一个或一个以上的通过具有不同于自然界中常见的原子质量或质量数的原子质量或质量数的原子置换的原子。能并入本发明化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素, 诸如分别为, ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 。本文中描述的某些经同位素标记的化合物, 例如诸如 ^3H 和 ^{14}C 的放射同位素并入其中的所述化合物, 可适用于药物和/或基质组织分布检定。另外, 用诸如氘, 也就是, ^2H 的同位素的取代能提供某些由更大代谢稳定性而得到的治疗优点, 例如增加的活体内半衰期或降低的剂量要求。

[0116] 包括(但不限于)非对映异构体、对映异构体和其混合物的所有异构体被视为本文中描述的组合物的一部分。在其他的或另外实施例中, 非天然编码的氨基酸多肽在投与需要生产代谢物的生物体后代谢, 随后将所述代谢物用以生产包括所要求的治疗效应的所要求的效应。在其他或另外的实施例中的是非天然编码的氨基酸多肽的活性代谢物。

[0117] 在一些情况下, 非天然编码的氨基酸多肽可以呈互变异构体形式存在。另外, 本文中描述的非天然编码的氨基酸多肽可以未溶剂化的形式, 以及与诸如水、乙醇诸如此类的医药学上可接受的溶剂所形成的溶剂化形式存在。溶剂化形式也视为揭示于本文中。所属领域的技术人员将认识到, 一些本文中的化合物可以若干互变异构形式存在。所有所述互变异构形式被视为本文中描述的组合物的一部分。

[0118] 实施方式

[0119] I. 说明

[0120] 包含至少一种非天然氨基酸的 hGH 分子提供于本发明中。在本发明的某些实施例中,具有至少一种非天然氨基酸的 hGH 多肽包括至少一种后转译修饰。在一个实施例中,至少一种后转译修饰包含利用所属领域的技术人员所知的适于具体的反应性基团的化学方法,将包含第二反应性基团的包括(但不限于)以下物质的分子连接到包含第一反应性基团的至少一个非天然氨基酸:标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光致交联剂、放射性核素、细胞毒素化合物、药物、亲和标记、光亲和标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅助因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖官能团、共价地或非共价与其他分子相互作用的基团、光致笼罩部分、可光化辐射激发的部分、光敏异构化部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、并入重原子的部分、可化学裂解的基团、可光致裂解的基团、伸长的侧链、经碳连接的糖、氧化还原作用活性剂、氨基硫代酸、有毒的部分、同位素地标记的部分、生物物理学探针、发磷光的基团、化学发光的基团、电子密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测的标记、小分子、量子点、纳米传导物、放射性核苷酸、放射性传导物、中子俘获剂,或上述物质的任何组合或任何其他所需的化合物或物质。在本发明的经修饰的 hGH 多肽的某些实施例中,使用包含至少一种后转译修饰的至少一个非天然氨基酸(包括(但不限于)含有酮官能团的非天然氨基酸),其中至少一种后转译修饰包含糖类部分。在某些实施例中,后转译修饰是在真核细胞或在非真核细胞中,在活体内进行。

[0121] 在某些实施例中,蛋白质包括至少一种通过一种宿主细胞,在活体内进行的后转译修饰,其中后转译修饰不能正常地通过另一种宿主细胞类型来进行。在某些实施例中,蛋白质包括至少一种通过真核细胞,在活体内进行的后转译修饰,其中后转译修饰不能正常地通过非真核细胞来进行。后转译修饰的实例包括(但不限于)糖基化作用、乙酰化作用、酰化作用、脂质修饰、棕榈酰化作用、棕榈酸酯添加、磷酸化作用、糖脂键修饰,诸如此类。在一个实施例中,后转译修饰包含通过 GlcNAc- 天门冬酰胺键将寡糖连接到天门冬酰胺(包括(但不限于)其中寡糖包含 $(\text{GlcNAc}-\text{Man})_2-\text{Man}-\text{GlcNAc}-\text{GlcNAc}$, 诸如此类)。在另一个实施例中,后转译修饰包含通过 GalNAc- 丝氨酸键、GalNAc- 苏氨酸键、GlcNAc- 丝氨酸键或 GlcNAc- 苏氨酸键将寡糖(包括(但不限于)Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc 等)连接到丝氨酸或苏氨酸。在某些实施例中,本发明的蛋白质或多肽可包含分泌或定位序列、抗原决定基标签、FLAG 标签、聚组氨酸标签、GST 融合体和 / 或诸如此类。分泌信号序列的实例包括(但不限于)原核分泌信号序列、真核分泌信号序列、5' 最佳化用于细菌表达的真核分泌信号序列、新颖分泌信号序列、果胶酸裂合酶分泌信号序列、Omp A 分泌信号序列和噬菌体分泌信号序列。分泌信号序列的实例包括(但不限于)STIII (原核)、Fd GIII 和 M13 (噬菌体)、Bg12 (酵母)和由转位子得到的信号序列 b1a。

[0122] 所关注的蛋白质或多肽可含有至少 1 种、至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种、至少 5 种、至少 6 种、至少 7 种、至少 8 种、至少 9 种,或 10 种或 10 种以上的非天然氨基酸。非天然氨基酸可为相同的或不同的,例如,在蛋白质中可能存在包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或 10 种以上的不同的非天然氨基酸的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或 10 个以上的不同部位。在某

些实施例中,存在于蛋白质的天然存在的版本中的至少一种(但小于所有)具体的氨基酸经非天然氨基酸取代。

[0123] 本发明提供基于生长激素的方法和组合物,具体来说提供包含至少一种非天然编码的氨基酸的hGH。将至少一种非天然编码的氨基酸引入hGH中使得涉及(包括但不限于)与一个或一个以上非天然编码的氨基酸的特定化学反应但同时不与通常存在的20种氨基酸反应的结合化学作用得以应用。在一些实施例中,包含非天然编码的氨基酸的hGH通过非天然编码的氨基酸的侧链而连接或键联于诸如聚乙二醇(PEG)的水溶性聚合物。本发明提供用于由PEG衍生物选择性修饰蛋白质的高效方法,其涉及响应选择密码子将非遗传编码的氨基酸,包括(但不限于)含有在20种天然并入的氨基酸中不能见到的包括(但不限于)酮部分的官能团或取代基的所述氨基酸,选择性并入蛋白质中,和由适合的反应性PEG衍生物来后续修饰所述氨基酸。一旦并入后,随后就能通过利用所属领域的技术人员所知的,适于非天然编码的氨基酸中存在的具体的官能团或取代基的化学方法来修饰氨基酸侧链。多种已知的化学方法适用于本发明将水溶性聚合物并入蛋白质中。

[0124] 本发明提供具有多种官能团、取代基或部分的hGH多肽与包括(但不限于)以下物质的其他物质的结合物:标记;染料;聚合物;水溶性聚合物;聚乙二醇的衍生物;光致交联剂;放射性核素;细胞毒素化合物;药物;亲和标记;光亲和标记;反应性化合物;树脂;第二蛋白质或多肽或多肽类似物;抗体或抗体片段;金属螯合剂;辅助因子;脂肪酸;碳水化合物;多核苷酸;DNA;RNA;反义多核苷酸;糖类;水溶性树枝状聚合物;环糊精;抑制性核糖核酸;生物材料;纳米粒子;自旋标记物;荧光团、含金属的部分;放射性部分;新颖官能团;共价地或非共价地与其他分子相互作用的基团;光致笼罩部分;可光化辐射激发的部分;光敏异构化部分;生物素;生物素的衍生物;生物素类似物;并入重原子的部分;化学上可裂解的基团;可光致裂解的基团;伸长的侧链;经碳连接的糖;氧化还原作用活性剂;氨基硫代酸;有毒的部分;同位素标记的部分;生物物理学探针;发磷光的基团;化学发光基团;电子密基团;磁性基团;插入基团;发色团;能量转移剂;生物活性剂;可检测的标记;小分子;量子点;纳米传导物;放射性核素;放射性传导物;中子俘获剂;或上述物质的任何组合,或任何其他所需的化合物或物质。

[0125] 所属领域中已充分地确定,PEG可用于修饰生物材料的表面(参见(例如)美国专利第6,610,281号;Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1):125-136(2000),其是以引用的方式并入本文)。PEG衍生物可通过反应性部分直接与聚合物键联。或者,PEG衍生物可通过将在一个末端具有反应性部分的连接剂连接到惯用活化的聚合物来制备,以便所得的聚合物在其末端具有反应性部分。或者,具有至少一个活性亲核的或亲电子的部分的水溶性聚合物与在一个末端具有反应性基团的连接剂的反应,以便在PEG聚合物与连接剂之间形成共价键,并且反应性基团位于聚合物的末端。包括胺、硫醇、酰肼、肼、醇、羧酸酯、醛、酮、硫酸酯,诸如此类的亲核的和亲电子的部分为所属领域的技术人员所知。PEG衍生物可用于改变生物适应性、稳定性、可溶性和缺乏免疫原性较为重要的表面和分子的性质,而同时提供将PEG衍生物连接到蛋白质的比所属领域中先前已知的方式更具选择性的方式。

[0126] II. 生长激素超基因家族

[0127] 以下蛋白质包括通过生长激素(GH)超基因家族的基因所编码的所述蛋白质(Bazan, F., Immunology Today 11:350-354(1990);Bazan, J.

F. Science257:410-413(1992); Mott, H. R. 和 Campbell, I. D., Current Opinion in Structural Biology5:114-121(1995); Silvennoinen, O. 和 Ihle, J. N., SIGNALLING BY THE HEMATOPOIETIC CYTOKINE RECEPTORS(1996): 生长激素、催乳激素、胎盘催乳质、红血球生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、白细胞间介素-2(IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35子单元)、IL-13、IL-15、制瘤素M、纤毛神经生长因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、 α 干扰素、 β 干扰素、 ϵ 干扰素、 γ 干扰素、 ω 干扰素、 τ 干扰素、粒性白细胞-群落刺激因子(G-CSF)、粒性白细胞-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF)和心脏营养素-1(CT-1) (“GH超基因家族”)。可以预料所述基因家族的其他成员将在将来通过基因克隆和定序而加以识别。尽管GH超基因家族的成员通常具有有限的氨基酸或DNA序列同一性,但是其具有相似的二级和三级结构。共用的结构特征使基因家族的新成员容易被识别并且同样使本文中描述的非天然的氨基酸方法和组合物类似地得以应用。假定GH超基因家族的成员之间的结构同源性程度,可以使用本发明将非天然编码的氨基酸并入GH超基因家族的任何成员中。所述蛋白质家族各个成员包含4螺旋束。

[0128] 包括G-CSF(Zink等人, FEBS Lett. 314:435(1992); Zink等人, Biochemistry33:8453(1994); Hill等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:5167(1993)), GM-CSF(Diederichs, K.等人 Science154:1779-1782(1991); Walter et al, J. Mol. Biol. 224:1075-1085(1992)), IL-2(Bazan, J. F. 和 McKay, D. B. Science257:410-413(1992)), IL-4(Redfield等人, Biochemistry30:11029-11035(1991); Powers等人, Science256:1673-1677(1992)) 和 IL-5(Milburn等人, Nature363:172-176(1993))的大量细胞激素的结构已经通过X射线衍射和NMR研究加以确定并且尽管缺乏显著的初级序列同源性,但是展示GH结构的惊人保守。基于建模及其他研究, IFN被认为是所述家族的成员(Lee等人, J. Interferon Cytokine Res. 15:341(1995); Murgolo等人, Proteins17:62(1993); Radhakrishnan等人, Structure4:1453(1996); Klaus等人, J. Mol. Biol. 274:661(1997))。基于建模及突变研究, EPO被认为是所述家族的成员(Boissel等人, J. Biol. Chem. 268:15983-15993(1993); Wen等人, J. Biol. Chem. 269:22839-22846(1994))。现认为上述所有细胞激素和生长因子构成一个大的基因家族。

[0129] 除共用的相似二级和三级结构之外,所述家族的成员共用的性质为其必定将细胞表面受体寡聚以活化细胞内信号路径。包括(但不限于)GH和EPO的一些GH家族成员结合单一类型的受体并且使其形成同源二聚体。包括(但不限于)IL-2、IL-4和IL-6的其他家族成员,结合一种以上类型的受体并且使所述受体形成异源二聚体或高阶聚集体(Davis等人, (1993), Science260:1805-1808; Paonessa等人, (1995), EMBO J. 14:1942-1951; Mott and Campbell, Current Opinion in Structural Biology5:114-121(1995))。突变研究已展示,如同GH,所述其他的细胞激素和生长因子含有多个受体结合部位,通常为2个受体结合部位,并且依序结合其同源受体(Mott and Campbell, Current Opinion in Structural Biology5:114-121(1995); Matthews等人, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA93:9471-9476)。如同GH,所述其他的家族成员的初级受体结合部位首先出现在4个 α 螺旋和A-B环中。参与受体结合的螺旋束中的特定的氨基酸在家庭成员之间不同。与GH

超基因家族的成员相互作用的大部分细胞表面受体结构上相关并且包含第二大的多基因家族。参见(例如),美国专利第 6,608,183 号,其是以引用的方式并入本文。

[0130] 从 GH 超基因家族的各个成员的突变研究得到的一般结论是,结合 α 螺旋的环通常不趋向于涉及于受体结合中。具体来说,短 B-C 环似乎对大多数(如果不是全部)家族成员的受体结合为不必要的。因此,B-C 环可以由 GH 超基因家族的成员中的按本文中描述的非天然编码的氨基酸取代。A-B 环、C-D 环(和 GH 超家族的干扰素 /IL-10 样成员的 D-E 环)也可以由非天然存在的氨基酸取代。接近螺旋 A 的氨基酸和远离最后螺旋的氨基酸也趋向于不涉及于受体结合中并且也可以是用于引入非天然存在的氨基酸的部位。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸是在包括(但不限于)A-B、B-C、C-D 或 D-E 环的前 1、2、3、4、5、6、7 或 7 个以上的氨基酸的环结构中的任何位置处取代。在一些实施例中,一个或一个以上的非天然编码的氨基酸是在 A-B、B-C、C-D 或 D-E 环的后 1、2、3、4、5、6、7 或 7 个以上的氨基酸中处取代。

[0131] 包括(但不限于)EPO、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、G-CSF、GM-CSF、TPO、IL-10、IL-12p35、IL-13、IL-15 和 β 干扰素的 GH 家族的某些成员含有 N-连接和 / 或 O-连接的糖。蛋白质中的糖基化作用部位几乎专门出现在环区域中并且不在 α 螺旋束中。因为环区域通常不涉及于受体结合中并且因为其是用于糖基团的共价连接的部位,所以其可能是用于将非天然存在的氨基酸取代引入蛋白质中的有效部位。在蛋白质中包含 N-连接和 O-连接糖基化作用部位的氨基酸可能是非天然存在的氨基酸取代的部位,因为所述氨基酸是表面暴露的。因此,天然蛋白质能容许在所述部位连接于蛋白质的庞大的糖基团并且糖基化作用部位趋向于远离受体结合部位定位。

[0132] 可能在将来发现 GH 超基因家族的其他成员。GH 超基因家族的新成员可通过所预测的蛋白质序列的计算机辅助二级和三级结构分析和通过设计用以识别结合于具体的目标的分子的选择技术而识别。GH 超基因家族的成员通常拥有 4 个或 5 个通过非螺旋状氨基酸(环区域)结合的两亲性螺旋。蛋白质可以在其 N-末端含有疏水性信号序列以促进从细胞的分泌。所述后来发现的 GH 超基因家族的成员也包括在本发明中。相关的申请案是 2005 年 8 月 18 日公开为 W005/074650 的标题为“Modified Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses”的国际专利申请案,其是以引用的方式并入本文。

[0133] 因此,提供 hGH 的描述用于说明性目的并且仅举例说明,并且不作为本文中描述的方法、组合物、策略和技术的范畴的限制。另外,在本申请案中提及 hGH 多肽是旨在使用作为任何生长激素的实例的通称。因此,应了解本文中关于 hGH 多肽或蛋白质描述的修饰和化学作用能同样地适用于 GH 超基因家族的任何成员,包括具体列于本文中的所述成员。

[0134] III. 选择密码子

[0135] 本发明的选择密码子扩展蛋白质生物合成器的遗传密码子框架。举例而言,选择密码子包括(但不限于)独特的 3 碱基密码子,无义密码子,诸如包括(但不限于)琥珀密码子(UAG)、赭石密码子或蛋白石密码子(UGA)的终止密码子,非天然密码子,4 个或 4 个以上碱基密码子,稀有密码子等等。对所属领域的技术人员来说显而易见的是,能被引入所要求的基因或多核苷酸中的选择密码子的数量存在广泛范围,包括(但不限于)在编码 hGH 多肽的至少一部分的单一多核苷酸中,存在 1 个或 1 个以上、2 个或 2 个以上、3 个或 3 个以上、4、5、6、7、8、9、10 或 10 个以上的选择密码子。

[0136] 在一个实施例中,方法涉及使用选择密码子,其为在活体内用于并入一个或一个以上非天然氨基酸的终止密码子。举例而言,生产识别包括(但不限于)UAG的终止密码子的O-tRNA,并且通过O-RS用所要求的非天然氨基酸氨基酰化。所述O-tRNA不能通过天然存在的宿主的氨酰基-tRNA合成酶辨别。惯用的定位突变能用以在所关注的多肽中的所关注的部位,引入包括(但不限于)TAG的终止密码子。参见(例如),Sayers, J. R. 等人(1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res., 16:791-802。当O-RS、O-tRNA和编码所关注的多肽的核酸活体内组合时,响应UAG密码子并入非天然氨基酸来得到在规定位置含有非天然氨基酸的多肽。

[0137] 能在活体内完成非天然氨基酸的并入而不会显著干扰真核宿主细胞。举例而言,因为UAG密码子的抑制功效视包括(但不限于)琥珀抑制基因tRNA的O-tRNA与真核释放因子(包括(但不限于)eRF)(其结合于终止密码子并且引发生长中的肽从核糖体释放)之间的竞争而定,所以抑制功效可通过(包括(但不限于))增加O-tRNA和/或抑制基因tRNA的表达水平来调节。

[0138] 非天然氨基酸也能由稀有密码子编码。举例而言,当活体外蛋白质合成反应中的精氨酸浓度降低时,已经证明稀有的精氨酸密码子,即AGG对通过由丙氨酸酰化的合成tRNA插入Ala来说为有效的。参见(例如),Ma等人, Biochemistry, 32:7939(1993)。在所述情况下,合成tRNA与作为次要物种存在于大肠埃希氏菌中的天然存在的tRNA^{Arg}竞争。一些生物体不使用所有的三联体密码子。藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)中的未指定的密码子AGA已经被应用于在活体外转录/转译提取物中插入氨基酸。参见(例如),Kowal和Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685(1997)。可产生本发明的组分以在活体内使用所述稀有密码子。

[0139] 选择密码子也包含包括(但不限于)4个或4个以上碱基密码子的扩展密码子,诸如4、5、6或6个以上碱基密码子。4碱基密码子的实例包括(但不限于)AGGA、CUAG、UAGA、CCCU,诸如此类。5碱基密码子的实例包括(但不限于)AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC,诸如此类。本发明的特征包括基于移码抑制使用扩展密码子。4个或4个以上碱基密码子可将(包括(但不限于))一个或一个以上非天然氨基酸插入相同蛋白质中。举例而言,在具有反密码子环,例如具有至少8-10nt反密码子环的包括(但不限于)特殊移码抑制基因tRNA的突变O-tRNA存在下,4个或4个以上碱基密码子可读取为单一氨基酸。在其他实施例中,反密码子环可解码(包括(但不限于))至少4-碱基密码子、至少5-碱基密码子或至少6-碱基密码子或至少6个以上-碱基密码子。因为存在256种可能的4-碱基密码子,所以可在相同细胞中使用4个或4个以上碱基密码子编码多个非天然氨基酸。参见,Anderson等人,(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。

[0140] 举例而言,使用活体外生物合成方法,4-碱基密码子已经被用以将非天然氨基酸并入蛋白质中。参见(例如),Ma等人,(1993)Biochemistry, 32:7939;和Hohsaka等

人, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:34. CGGG 和 AGGU 用以同时将 2- 萘基丙氨酸和赖氨酸的 NBD 衍生物与两个经化学酰化的移码抑制基因 tRNA 一起活体外并入抗生蛋白链菌素中。参见(例如), Hohsaka 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194。在活体内研究中, Moore 等人研究了具有 NCUA 反密码子的 tRNA^{Leu} 衍生物抑制 UAGN 密码子(N 可为 U、A、G 或 C)的能力, 并且发现四联体 UAGA 能通过具有 UCUA 反密码子的 tRNA^{Leu}, 以 13 到 26% 的效率解码, 同时在 0 或 -1 框架中少量解码。参见, Moore 等人, *J. Mol. Biol.*, 298:195。在一个实施例中, 基于稀有密码子或无义密码子的扩展密码子可用于本发明中, 其可减少在其他不需要的部位的错义读取和移码抑制。

[0141] 对给定的系统来说, 选择密码子还可包括天然 3 碱基密码子之一, 其中内源性系统不使用(或很少使用)天然碱基密码子。举例而言, 所述系统包括缺乏能辨别出天然 3 碱基密码子的 tRNA 的系统, 和 / 或其中 3 碱基密码子是稀有密码子的系统。

[0142] 选择密码子视需要包括非天然碱基对。所述非天然碱基对进一步扩展现有的遗传字母表。一个额外的碱基对使三联体密码子的数目从 64 增加到 125。第三碱基对的性质包括稳定的和选择性的碱基配对、以高保真度通过聚合酶有效地酶促并入 DNA 中, 和在初生非天然碱基对的合成后有效的连续的引物延伸。可适宜于方法和组合物的非天然碱基对的描述包括(例如) Hirao 等人, (2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology*, 20:177182。又参见, Wu, Y. 等人, (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630。其他相关公开案列于下文。

[0143] 对活体内使用来说, 非天然核苷可渗透膜并且经磷酸化以形成对应的三磷酸盐。另外, 增加的遗传信息是稳定的并且不会被细胞酶破坏。Benner 和其它人的早先努力利用不同于典型的 Watson-Crick 对中的所述型式的氢键型式, 其中最值得注意的实例是 iso-C:iso-G 对。参见(例如), Switzer 等人, (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; 和 Piccirilli 等人, (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602。所述碱基一般说来在某种程度上与天然碱基错配并且不能酶促地复制。Kool 和同事证明, 碱基之间的疏水性包装相互作用能置换氢键以驱动碱基对的形成。参见, Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602; 和 Guckian 和 Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825。在致力于开发满足所有上述要求的非天然碱基对的过程中, Schultz, Romesberg 和同事系统地合成和研究了一系列非天然疏水性碱基。发现 PICS:PICS 自身对比天然碱基对更稳定, 并且可有效地通过大肠埃希氏菌 DNA 聚合酶 I 的克林诺片段(Klenow fragment, KF) 并入 DNA 中。参见(例如), McMinn 等人, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6; 和 Ogawa 等人, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274。3MN:3MN 自身对能通过 KF, 以足够用于生物功能的效率和选择性来合成。参见(例如), Ogawa 等人, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803。然而, 两个碱基担当进一步复制的链终止剂。最近, 已经开发可用以复制 PICS 自身对的突变 DNA 聚合酶。另外, 可复制 7AI 自身对。参见(例如), Tae 等人, (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439。也已经开发了新颖的金属碱基对, 即 Dipic:Py, 其在结合铜(II)后形成稳定的对。参见, Meggers 等人, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714。因为扩展密码子和非天然密码子本质上与天然密码子正交, 所以本发明的方法可以利用所述性质来产生其正交的 tRNA。

[0144] 转译旁路系统也可用以将非天然氨基酸并入所要求的多肽中。在转译旁路系统中, 大的序列被并入基因中但不转译成蛋白质。序列含有充当诱导核糖体跳过序列并且在

插入物的下游恢复转译的插入物的结构。

[0145] 在某些实施例中,本发明的方法和/或组合物中的所关注的蛋白质或多肽(或其部分)是通过核酸来编码。通常,核酸包含至少1个选择密码子、至少2个选择密码子、至少3个选择密码子、至少4个选择密码子、至少5个选择密码子、至少6个选择密码子、至少7个选择密码子、至少8个选择密码子、至少9个选择密码子、10个或10个以上的选择密码子。

[0146] 编码所关注的蛋白质或多肽的基因可使用所属领域的技术人员熟知的和本文中描述的方法来突变以包括(例如)一个或一个以上的选择密码子用于并入非天然氨基酸。举例而言,所关注的蛋白质的核酸经突变以包括一个或一个以上选择密码子,提供以并入一个或一个以上非天然氨基酸。本发明包括任何所述变体,其包括(但不限于)突变体,(例如)包括至少一种非天然氨基酸的任何蛋白质的版本。同样地,本发明也包括对应的核酸,也就是说,具有一个或一个以上编码一个或一个以上非天然氨基酸的选择密码子的任何核酸。

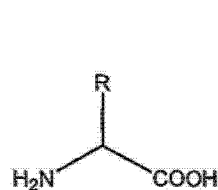
[0147] 编码诸如 hGH 多肽的所关注的蛋白质的核酸分子可以容易地经突变以在多肽的任何所要求的位置引入半胱氨酸。半胱氨酸被广泛地用以将反应性分子、水溶性聚合物、蛋白质或多种其他的分子引入到所关注的蛋白质上。适于将半胱氨酸并入多肽的所要求的位置中的方法为所属领域的技术人员所知,诸如描述于以引用的方式并入本文的美国专利第 6,608,183 号中的所述方法和标准突变技术。

[0148] IV. 非天然编码的氨基酸

[0149] 极广种类的非天然编码的氨基酸适用于本发明。可将任何数量的非天然编码的氨基酸引入 hGH 多肽中。一般说来,相对于 20 种常见的、遗传编码的氨基酸(也就是,丙氨酸、精氨酸、天门冬酰胺、天门冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异白氨酸、白氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)而言,经引入的非天然编码的氨基酸大体上为化学惰性的。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸包括有效地和选择性地与未见于 20 种常见氨基酸中的官能团(包括(但不限于)叠氮基、酮、醛和氨基氧基)反应以形成稳定的结合物的侧链官能团。

[0150] α -氨基酸的通用结构说明如下(式 I):

[0151]



[0152] 非天然编码的氨基酸通常为具有上文所列的式的任何结构,其中 R 基团是不同于 20 种天然氨基酸中所用取代基的任何取代基,并且可以适用于本发明。因为本发明的非天然编码的氨基酸通常仅在侧链的结构上不同于天然氨基酸,所以非天然编码的氨基酸与包括(但不限于)天然或非天然编码的氨基酸的其他氨基酸一起形成酰胺键,所述酰胺键是以其在天然存在的多肽中形成的同样方式来形成。然而,非天然编码的氨基酸具有可将其与天然氨基酸区分的侧链基团。举例而言,R 视需要包含烷基-、芳基-、酰基-、酮基-、叠氮基、羟基-、肼、氰基-、卤基-、酰肼、烯基、炔基、醚、硫醇、硒基-、磺酰基-、硼酸基、西酮酸基、磷酸基、膦酰基、膦、杂环基、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺、氨基等等或其任何组合。可适用

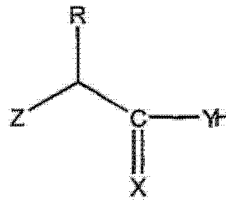
于本发明的其他所关注的非天然存在的氨基酸包括(但不限于)包含可光活化的交联剂的氨基酸、经自旋标记的氨基酸、发荧光的氨基酸、结合金属的氨基酸、含金属的氨基酸、放射性氨基酸、具有新颖的官能团的氨基酸、共价地或非共价地与其他分子相互作用的氨基酸、光致笼罩和 / 或光敏异构化的氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、诸如经糖取代的丝氨酸的经糖基化的氨基酸、经其他碳水化合物修饰的氨基酸、含酮的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、经重原子取代的氨基酸、可化学裂解和 / 或光致裂解的氨基酸、当与天然氨基酸比较时具有伸长侧链的氨基酸,所述伸长侧链包括(但不限于)聚醚或(包括但不限于)大于约 5 个或大于约 10 个碳的长链烃、经碳连接的含糖氨基酸、氧化还原活性的氨基酸、含氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或一个以上的毒性部分的氨基酸。

[0153] 可以适用于本发明并且适用于与水溶性聚合物反应的示范性非天然编码的氨基酸包括(但不限于)具有羰基、氨基氧基、肼、酰肼、氨基脒、叠氮化物和炔反应性基团的所述氨基酸。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸包含糖类部分。所述氨基酸的实例包括 N-乙酰基-L-氨基葡萄糖基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-氨基半乳糖基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-氨基葡萄糖基-L-苏氨酸、N-乙酰基-L-氨基葡萄糖基-L-天冬酰胺和 O-氨基甘露糖基-L-丝氨酸。所述氨基酸的实例也包括其中氨基酸与糖类之间的天然存在的 N-键或 O-键被自然界上不常见的共价键-包括(但不限于)烯烃、脞、硫醚、酰胺,诸如此类的共价键置换的实例。所述氨基酸的实例也包括不常见于天然存在的蛋白质中的糖类,诸如 2-脱氧-葡萄糖、2-脱氧半乳糖等等。

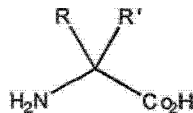
[0154] 本文中提供的许多非天然编码的氨基酸可购自(例如)Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)、Novabiochem (a division of EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) 或 Peptech (Burlington, MA, USA)。不能购得的所述氨基酸是视需要按本文中所提供的或使用为所属领域的技术人员所知的标准方法来合成。对有机合成技术来说,参见(例如),Fessenden 和 Fessenden 的 Organic Chemistry (1982, 第二版, Willard Grant Press, Boston Mass.); March 的 Advanced Organic Chemistry (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York); 和 Carey 和 Sundberg 的 Advanced Organic Chemistry (第三版, 部分 A 和 B, 1990, Plenum Press, New York)。又参见,美国专利申请公开案 2003/0082575 和 2003/0108885, 其都以引用的方式并入本文。除含有新颖侧链的非天然氨基酸之外,可以适用于本发明的非天然氨基酸也视需要包含经修饰的主链结构,包括(但不限于)由式 II 和 III 的结构加以说明:

[0155]

II



III



[0156] 其中 Z 通常包含 OH、NH₂、SH、NH-R'、或 S-R'；可为相同或不同的 X 和 Y 通常包含 S 或 O，并且视需要为相同或不同的 R 和 R' 通常是选自上文对具有式 I 的非天然氨基酸所描述的 R 基团的成分的同清单以及氢。举例而言，本发明的非天然氨基酸视需要包含如由式 II 和 III 所说明的氨基或羧基的取代。所述类型的非天然氨基酸包括(但不限于)α-羟酸、α-硫代酸、α-氨基硫代羧酸酯，包括(但不限于)具有对应于常见的 20 种天然氨基酸的侧链或非天然侧链的那些非天然氨基酸。另外，在 α-碳处的取代视需要包括(但不限于)诸如 D-谷氨酸、D-丙氨酸、D-甲基-0-酪氨酸、氨基丁酸诸如此类的 L、D 或 α-α-二取代的氨基酸。其他结构替代物包括诸如脯氨酸类似物以及 3、4、6、7、8 和 9 元环脯氨酸类似物的环状氨基酸，诸如经取代的 β-丙氨酸和 γ-氨基丁酸的 β 和 γ 氨基酸。

[0157] 许多非天然氨基酸是基于诸如酪氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸，诸如此类的天然氨基酸，并且适用于本发明。酪氨酸类似物包括(但不限于)，对位取代的酪氨酸、邻位取代的酪氨酸和间位取代的酪氨酸，其中经取代的酪氨酸包含(包括(但不限于))酮基(包括(但不限于)乙酰基)、苯甲酰基、氨基、肼、羟胺、硫醇基、羧基、异丙基、甲基、C₆-C₂₀ 直链或支链烃、饱和或不饱和烃、0-甲基、聚醚基、硝基、炔基等等。另外，也涵盖经多取代的芳基环。可以适用于本发明的谷氨酰胺类似物包括(但不限于)，α-羟基衍生物、γ-取代的衍生物、环状衍生物和经酰胺取代的谷氨酰胺衍生物。可以适用于本发明的实例苯丙氨酸类似物包括(但不限于)对位取代的苯丙氨酸、邻位取代的苯丙氨酸和间位取代的苯丙氨酸，其中取代基包含(包括(但不限于))羟基、甲氧基、甲基、烯丙基、醛、叠氨基、碘基、溴基、酮基(包括(但不限于)乙酰基)、苯甲酰基、炔基等等。可以适用于本发明的非天然氨基酸的特定的实例包括(但不限于)对乙酰基-L-苯丙氨酸、0-甲基-L-酪氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、0-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-0-乙酰基-GlcNAc β-丝氨酸、L-Dopa、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氨基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸基丝氨酸、磷酸基酪氨酸、对碘-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸和对炔丙基氧基-苯丙氨酸，诸如此类。可以适用于本发明的各种非天然氨基酸的结构实例提供于(例如)标题为“*In vivo* incorporation of unnatural amino acids”的 W02002/085923 中。对其他甲硫氨酸类似物来说也可参见，Kiick 等人，(2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, *PNAS*99:19-24，其是以引用的方式并入本文。

[0158] 在一个实施例中,提供包括非天然氨基酸(诸如对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸)的hGH多肽的组合物。也提供包含对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸且包括(但不限于)蛋白质和/或细胞的各种组合物。一方面,包括对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸非天然氨基酸的组合物另外包括正交的tRNA。非天然氨基酸可(包括(但不限于)共价地)键结于正交的tRNA,其包括(但不限于)通过氨基-酰基键共价地键结于正交的tRNA,共价地键结于正交的tRNA的末端核糖的3'OH或2'OH等等。

[0159] 经由可并入蛋白质中的非天然氨基酸的化学部分提供各种蛋白质的优点和操纵。举例而言,酮官能团的独特的反应性允许由许多含肼或含羟胺试剂的任何一种试剂在活体外和活体内选择性地修饰蛋白质。重原子非天然氨基酸(例如)可适用于定相X射线结构数据。使用非天然氨基酸的重原子的部位特异性引入也为重原子提供选择位置的选择性和适应性。光反应性非天然氨基酸(包括(但不限于)具有二苯甲酮和芳基叠氮化物(包括(但不限于)苯基叠氮化物)侧链的氨基酸),(例如)容许蛋白质的有效活体内和活体外光致交联。光反应性非天然氨基酸的实例包括(但不限于)对叠氨基-苯丙氨酸和对苯甲酰基-苯丙氨酸。具有光反应性非天然氨基酸的蛋白质可因此通过提供瞬时控制的光反应性基团的激发而随意地交联。在一个实例中,非天然氨基酸的甲基可经同位素标记的(包括(但不限于))甲基取代,作为(包括(但不限于))供核磁共振和振动光谱学使用的局部结构和动力学的探针。炔基或叠氮基官能团(例如)允许通过[3+2]环化加成反应,用分子选择性地修饰蛋白质。

[0160] 在氨基末端并入多肽中的非天然的氨基酸可包含为不同于20种天然氨基酸中所用取代基的任何取代基的R基团,和不同于正常地存在于 α -氨基酸(参见式I)中的 NH_2 基团的第二反应性基团。相似的非天然氨基酸可在羧基末端并入具有不同于正常地存在于 α -氨基酸(参见式I)中的 COOH 基团的第二反应性基团。

[0161] 本发明的非天然氨基酸可以经选择或设计以提供在20种天然氨基酸中得不到的其他特征。举例而言,非天然氨基酸可以视需要经设计或选择以改变(例如)其并入其中的蛋白质的生物学性质。举例而言,以下性质可以视需要通过将非天然氨基酸包含于蛋白质中来改变:毒性,体内分解,可溶性,例如热稳定性、水解稳定性、氧化稳定性,抗酶促降解诸如此类的稳定性,提纯和处理的容易性,结构性质,光谱性质,化学的和/或光化性质,催化活性,氧化还原电位,半衰期,与其他分子(例如)共价地或非共价地反应的能力,诸如此类。以引用的方式并入本文的美国专利申请案第11/046,432号,讨论了许多不同的非天然编码的氨基酸。

[0162] 非天然氨基酸的化学合成

[0163] 适用于本发明的许多非天然氨基酸是可购自Sigma (USA) 或Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 的。不能购得的所述氨基酸是视需要按本文中所提供的或按各种公开案中所提供的或使用为所属领域的技术人员所知的标准方法来合成。关于有机合成技术,参见(例如),Fessenden和Fessenden的 Organic Chemistry (1982, 第二版,Willard Grant Press,Boston Mass);March的 Advanced Organic Chemistry (第三版,1985,Wiley and Sons,New York);和Carey和Sundberg的 Advanced Organic Chemistry (第三版,部分A和B,1990,Plenum Press,New York)。描述非天然氨基酸的合成的其他公开案包括,(例如)标题为 "In vivo incorporation of Unnatural

Amino Acids”的 W02002/085923 ;Matsoukas 等人, (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. 等人 (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 Pipecolates 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 等人, (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 ; 和 Subasinghe 等人, (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. 也可参见标题为“Protein Arrays”的美国专利公开案第 US2004/0198637 号, 其是以引用的方式并入本文。

[0164] 举例而言, 对乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸和间乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸的合成描述于 Zhang, Z. 等人, *Biochemistry* 42:6735-6746 (2003) 中, 其是以引用的方式并入本文。其他含羰基氨基酸可由所属领域的技术人员来相似地制备。羰基官能基可在温和条件下, 在水溶液中选择性地与含胍、含酰胍、含羟胺或含氨基脲的试剂反应以分别形成在生理条件下稳定的对应的脲、脲或缩氨基脲键。参见(例如), 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)。此外, 羰基的独特反应性容许在其他氨基酸侧链存在下的选择性修饰。参见(例如), Cornish, V. W. 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996) ; Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992) ; Mahal, L. K. 等人, *Science* 276:1125-1128 (1997)。

[0165] 非天然氨基酸的生物合成

[0166] 许多生物合成路径已经存在于细胞中用于生产氨基酸和其他化合物。虽然具体的非天然氨基酸的生物合成方法可能实质上不存在于(包括(但不限于))细胞中, 但是本发明提供所述方法。举例而言, 非天然氨基酸的生物合成路径视需要在宿主细胞中, 通过增加新颖的酶或改变现有的宿主细胞路径来产生。其他新颖的酶视需要为天然存在的酶或人工开发的酶。举例而言, 对氨基苯丙氨酸的生物合成(如标题为“In vivo incorporation of unnatural amino acids”的 W02002/085923 中所呈现) 依靠于添加来自其他生物体的已知酶的组合。所述酶的基因能通过用包含基因的质粒使细胞转型而引入真核细胞中。当在细胞中表达时, 基因提供酶促路径以合成所要求的化合物。视需要添加的酶的类型实例提

供于下文的实例中。其他的酶序列可见于(例如)基因库中。也视需要以同样方式将人工开发的酶添加到细胞中。如此,操纵细胞器和细胞的资源来生产非天然氨基酸。

[0167] 各种方法可用于生产供生物合成路径使用或用于发展现有路径的新颖的酶。举例而言,视需要将(包括(但不限于))如由 Maxygen, Inc. 开发的递归性重组(可在 World Wide Web, maxygen.com 上购得)用于开发新颖的酶和路径。参见(例如), Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* 370(4):389-391; 和 Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:10747-10751。同样地,视需要将由 Genencor 开发的 DesignPath™ (可在 World Wide Web, genencor.com 上购得)用于代谢路径工程化,包括(但不限于)用于工程化路径以在细胞中产生 O-甲基-L-酪氨酸。所述技术使用(包括(但不限于))通过功能基因组而识别的新颖基因,和分子进化和设计的组合,而在宿主生物体中重建现有路径。Diversa Corporation(可在 World Wide Web, diversa.com 上购得)也提供基因和基因路径的快速筛选程序库(包括(但不限于))以产生新颖路径的技术。

[0168] 通常,由本发明的工程化生物合成路径生产的非天然氨基酸,是以包括(但不限于)天然细胞量的足够用于有效的蛋白质生物合成,但不达到影响其他氨基酸的浓度或耗尽细胞资源的程度的浓度来生产。以所述方式在活体内生产的典型浓度是约 10mM 到约 0.05mM。一旦细胞由包含用以生产特定路径和非天然氨基酸所需的酶的基因的质粒转型,活体内选择就视需要用以进一步优化用于核糖体蛋白合成和细胞生长的非天然氨基酸的生产。

[0169] 非天然氨基酸的细胞吸收

[0170] 细胞的非天然氨基酸吸收是通常在设计和选择(包括(但不限于))用于并入蛋白质中的非天然氨基酸时所考虑的一个问题。举例而言, α -氨基酸的高电荷密度暗示所述化合物不可能为可渗透细胞的。天然氨基酸是通过许多以蛋白质为主的运输系统而吸收到真核细胞中。可进行快速筛选,其评定哪种非天然氨基酸(即使有的话)被细胞吸收。参见(例如), (例如)标题为“Protein Arrays”的美国专利公开案第 US 2004/0198637 号中的毒性检定,所述专利是以引用的方式并入本文;和 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 中的毒性检定。虽然吸收容易用各种检定来分析,但是设计经受细胞吸收路径的非天然氨基酸的另一选择为提供生物合成路径以在活体内产生氨基酸。

[0171] V. 具有非天然氨基酸的多肽

[0172] 可由于包括(但不限于)以下目的的各种目的来进行非天然氨基酸的并入:调节蛋白质结构和/或功能的改变,改变大小、酸度、亲核性、氢键、疏水性、蛋白酶目标部位的可达性,将一个部分作为目标(包括(但不限于)蛋白质排列的部分),添加生物活性分子,连接聚合物,连接放射性核素,调节血清半衰期,调节组织穿透率(例如肿瘤),调节主动运输,调节组织、细胞或器官特异性或分布,调节免疫原性,调节蛋白酶抵抗力等等。包括非天然氨基酸的蛋白质能具有增强的或甚至全新颖催化性质或生物物理学性质。举例而言,以下性质视需要通过将非天然氨基酸包含于蛋白质中来改变:毒性、体内分解、结构性质、光谱性质、化学的和/或光化性质、催化能力、半衰期(包括(但不限于)血清半衰期)、与其他分子

(包括但不限于)) 共价地或非共价地反应的能力, 诸如此类。包括包含至少一种非天然氨基酸的蛋白质的组合物适用于(包括但不限于)) 新颖的疗法、诊断法、催化酶、工业酶、结合蛋白质(包括但不限于) 抗体) 和(包括但不限于)) 蛋白质结构和功能的研究。参见(例如), Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652。

[0173] 在本发明的一个方面中, 组合物包括至少 1 种具有至少 1 种, (包括但不限于)) 至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种、至少 5 种、至少 6 种、至少 7 种、至少 8 种、至少 9 种或至少 10 种或 10 种以上的非天然氨基酸的蛋白质。非天然氨基酸可为相同的或不同的, (包括但不限于)) 蛋白质中存在包含 1 种、2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种或 10 种或 10 种以上的不同的非天然氨基酸的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个或 10 个以上的不同的部位。另一方面, 组合物包括存在于蛋白质中的具体的氨基酸的至少一种(但少于全部) 经非天然氨基酸取代的蛋白质。对给定的具有多于一种非天然氨基酸的蛋白质来说, 非天然氨基酸可为相同的或不同的(包括但不限于) 蛋白质可包括 2 种或 2 种以上的不同类型的非天然氨基酸, 或可包括 2 种相同非天然氨基酸)。对给定的具有多于 2 种非天然氨基酸的蛋白质来说, 非天然氨基酸可为相同的、不同的或为多个具有相同种类的非天然氨基酸与至少 1 种不同的非天然氨基酸的组合。

[0174] 所关注的具有至少 1 种非天然氨基酸的蛋白质或多肽是本发明的特征。本发明也包括具有至少 1 种使用本发明的组合物和方法生产的非天然氨基酸的多肽或蛋白质。赋形剂(包括但不限于) 医药学上可接受的赋形剂) 也能与蛋白质一起存在。

[0175] 对在真核细胞中生产所关注的具有至少 1 种非天然氨基酸的蛋白质或多肽来说, 蛋白质或多肽将通常包括真核后转译修饰。在某些实施例中, 蛋白质包括至少 1 种非天然氨基酸和至少 1 种通过真核细胞在活体内进行的后转译修饰, 其中后转译修饰非通过原核细胞进行。举例而言, 后转译修饰包括(包括但不限于)) 乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化作用、棕榈酸酯添加、磷酸化、糖脂键修饰、糖基化作用, 诸如此类。一方面, 后转译修饰包括通过 GlcNAc- 天门冬酰胺键, 将寡糖(包括但不限于) $(\text{GlcNAc-Man})_2\text{-Man-GlcNAc-GlcNAc}$ 连接到天门冬酰胺。参见表 1, 其列出了真核蛋白质的 N- 连接寡糖的实例(也可存在未展示的其他的残基)。另一方面, 后转译修饰包括通过 GalNAc- 丝氨酸或 GalNAc- 苏氨酸键, 或 GlcNAc- 丝氨酸或 GlcNAc- 苏氨酸键, 将寡糖(包括但不限于) Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc 等等) 连接到丝氨酸或苏氨酸。

[0176] 表 1 : 通过 GLCNAC- 键合的寡糖的实例

[0177]

类型	碱基结构
I.高甘露糖	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Man}\alpha\text{1-3} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$
II.杂合物	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\alpha\text{1-3} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$
III.复合物	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \text{---} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2} \text{---} \text{Man}\alpha\text{1-3} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$
IV.木糖	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha\text{1-6} \\ \text{Xyl}\beta\text{1-2} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn}$

[0178] 另一方面,后转译修饰包括前驱物的蛋白水解处理,装配到多子单元蛋白质中或大分子装配,转译到细胞中的另一个部位(包括但不限于)转译到诸如内质网、高尔基体(Golgi apparatus)、核、溶酶体、过氧化物酶体、线粒体、叶绿体、液泡等等的细胞器中,或通过分泌路径)。在某些实施例中,蛋白质包含分泌序列或定位序列、抗原决定基标签、FLAG标签、聚组氨酸标签、GST 融合体等等。以引用的方式并入本文的美国专利第 4,963,495 和 6,436,674 号,详细描述了经设计以改善 hGH 多肽的分泌的构筑体。

[0179] 非天然氨基酸的一个优点是其存在能用以添加其他分子的其他的化学部分。所述修饰可在真核或非真核细胞中,活体内或活体外进行。因此,在某些实施例中,后转译修饰是通过非天然氨基酸完成。举例而言,后转译修饰可通过亲核-亲电子反应完成。当前用于选择性修饰蛋白质的大多数反应涉及在亲核和亲电子反应搭配物之间形成共价键,包括(但不限于) α -卤基酮与组氨酸或半胱氨酸侧链的反应。所述情况下的选择性是由蛋白质中的亲核残基的数量和可达性决定。在本发明的蛋白质中,可使用其他更有选择性的反应,诸如在活体外和活体内,非天然酮-氨基酸与酰肼或氨基氧化化合物的反应。参见(例如),Cornish 等人,(1996)J. Am. Chem. Soc.118:8150-8151; Mahal 等人,(1997)Science,276:1125-1128;Wang 等人,(2001)Science292:498-500; Chin 等人,(2002)J. Am. Chem. Soc.124:9026-9027;Chin 等人,(2002)Proc. Natl. Acad. Sci.,99:11020-11024;Wang 等人,(2003)Proc Natl. Acad. Sci.,100:56-61;Zhang 等人,(2003)Biochemistry.42:6735-6746 和 Chin 等人,(2003)Science,301:964-7,其全部所有以引用的方式并入本文。所述反应允许用包括荧光团、交联剂、糖类衍生物和细胞毒素分子的大量试剂来选择性标记几乎任何的蛋白质。又参见,标题为“Glycoprotein Synthesis”的美国专利第 6,927,042 号,其是以引用的方式并入本文。(包括但不限于)通过叠氮基氨基酸的后转译修饰也能通过 Staudinger 连接(包括但不限于)用三芳基膦试剂)来进行。参见(例如),Kiick 等人,(2002)Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation,PNAS99:19-24。

[0180] 本发明提供选择性修饰蛋白质的另一个高效方法,其涉及非天然氨基酸的遗传并

入。可添加到蛋白质的分子包括(但不限于),染料、荧光团、交联剂、糖类衍生物、聚合物(包括(但不限于)聚乙二醇的衍生物)、光致交联剂、细胞毒素化合物、亲和标记、生物素的衍生物、树脂、珠粒、第二蛋白质或多肽(或更多)、多核苷酸(包括(但不限于)DNA、RNA等等)、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物,诸如此类。在一个实施例中,所述方法进一步包括将非天然氨基酸并入蛋白质中,其中非天然氨基酸包含第一反应性基团;和使蛋白质与包含第二反应性基团的分子(包括(但不限于)标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光致交联剂、放射性核素、细胞毒素化合物、药物、亲和标记、光亲和标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、糖类、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖的官能团、共价地或非共价地与其他分子相互作用的基团、光致笼罩部分、可光化辐射激发的部分、可光致异构化的部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、并入重原子的部分、可化学裂解的基团、可光致裂解的基团、伸长的侧链、经碳连接的糖、氧化还原活化剂、氨基硫代酸、毒性部分、同位素标记的部分、生物物理学探针、发磷光的基团、化学发光的基团、电子密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测的标记、小分子、量子点、纳米传导物、放射性核苷酸、放射性传导物、中子俘获剂,或上述上述物质的任何组合或任何其他所需的化合物或物质)接触。

[0181] VI. 包含非遗传编码的氨基酸的 hGH 多肽的活体内产生

[0182] 本发明的 hGH 多肽可在活体内使用经修饰的 tRNA 和 tRNA 合成酶来添加或取代未在天然存在的系统中编码的氨基酸而产生。

[0183] 使用未在天然存在的系统中编码的氨基酸的用于产生 tRNA 和 tRNA 合成酶的方法,描述于(例如)美国专利申请公开案 2003/0082575 (第 10/126, 927 号)和 2003/0108885 (第 10/126, 931)中,所述专利是以引用的方式并入本文。所述方法涉及产生独立于对转译系统来说内源性的(并且因此有时称作“正交的”)合成酶和 tRNA 而起作用的转译器。通常,转译系统包含正交的 tRNA (O-tRNA) 和正交的氨酰基 tRNA 合成酶(O-RS)。通常, O-RS 优先地在转译系统中,用至少一种非天然存在的氨基酸将 O-tRNA 氨基酰化并且 O-tRNA 辨别出至少一个不能被系统中的其他 tRNA 辨别出的选择密码子。响应经编码的选择密码子,转译系统因此将非天然编码的氨基酸插入到系统中生产的蛋白质中,从而将氨基酸“取代”到经编码的多肽中的位置中。

[0184] 用于将具体的合成氨基酸插入到多肽中的多种正交的 tRNA 和氨酰基 tRNA 合成酶已经在所属领域中描述,并且通常适用于本发明。举例而言,酮-特异性 O-tRNA/氨酰基-tRNA 合成酶描述于 Wang, L. 等人, Proc. Natl. Acad. Set USA100:56-61 (2003) 和 Zhang, Z. 等人, Biochem. 42(22):6735-6746 (2003) 中。示范性 O-RS 或其部分是通过多核苷酸序列来编码并且包括揭示于美国专利申请公开案 2003/0082575 和 2003/0108885 中的氨基酸序列,各个专利以引用的方式并入本文。供 O-RS 使用的对应的 O-tRNA 分子也描述于美国专利申请公开案 2003/0082575 (第 10/126, 927 号)和 2003/010888 (第 10/126, 931 号)中,所述专利是以引用的方式并入本文。

[0185] 叠氮化物-特异性 O-tRNA/氨酰基-tRNA 合成酶系统的实例描述于 Chin, J. W. 等人, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)中。对叠氮基-L-Phe 的示范性 O-RS 序列包括

(但不限于),如美国专利申请公开案 2003/0108885(第 10/126, 931 号)中揭示的核苷酸序列 SEQ ID NO:14-16 和 29-32 和氨基酸序列 SEQ ID NO:46-48 和 61-64,所述专利是以引用的方式并入本文。适用于本发明的示范性 O-tRNA 序列包括(但不限于)如美国专利申请公开案 2003/0108885 (第 10/126, 931 号)中揭示的核苷酸序列 SEQ ID NO:1-3,所述专利是以引用的方式并入本文。对具体的非天然编码的氨基酸具有特异性的 O-tRNA/ 氨酰基-tRNA 合成酶对的其他实例描述于美国专利申请公开案 2003/0082575 (第 10/126, 927 号)中,所述专利以引用的方式并入本文。将含酮的氨基酸和含叠氮化物的氨基酸并入酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)中的 O-RS 和 O-tRNA 描述于 Chin, J. W. 等人, *Science*301:964-967(2003)中。

[0186] 已经报道了若干其他的正交对。从酿酒酵母 tRNA 和合成酶得到的谷氨酰胺酰基(参见(例如), Liu, D. R. 和 Schultz, P. G. (1999)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785), 天冬氨酰基(参见(例如), Pastrnak, M. 等人, (2000)Helv. Chim. Acta83:2277-2286) 和酪氨酰(参见(例如), Ohno, S. 等人, (1998)J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; 和 Kowal, A. K. 等人, (2001)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) 系统已经被描述用于将非天然氨基酸潜在地并入大肠杆菌中。从大肠杆菌谷氨酰胺酰基(参见(例如), Kowal, A. K. 等人, (2001)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273)和酪氨酰(参见(例如), Edwards, H. 和 Schimmel, P. (1990)Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) 合成酶得到的系统已经被描述适用于酿酒酵母。大肠杆菌酪氨酰系统已经用于在活体内将 3-碘-L-酪氨酸并入哺乳动物细胞中。参见, Sakamoto, K. 等人, (2002)Nucleic Acids Res. 30:4692-4699。

[0187] O-tRNA/ 氨酰基-tRNA 合成酶的使用涉及编码非天然编码的氨基酸的特异性密码子的选择。虽然能使用任何密码子,但是通常需要选择很少或从不用于其中表达 O-tRNA/ 氨酰基-tRNA 合成酶的细胞中的密码子。举例而言,示范性密码子包括无义密码子,诸如终止密码子(琥珀密码子、赭石密码子和蛋白石密码子)、4 个或 4 个以上碱基密码子及很少或不使用的其他天然 3 碱基密码子。

[0188] 可使用所属领域中已知的突变方法(包括(但不限于)部位特异性突变、盒式突变、限制选择突变等等)将特异性选择密码子引入 hGH 多核苷酸编码序列中的适当位置中。

[0189] 产生可用以并入非天然编码的氨基酸的诸如 O-RS、O-tRNA 和正交的 O-tRNA/O-RS 对的蛋白质生物合成器的组分的方法,描述于 Wang, L. 等人, *Science*292:498-500(2001); Chin, J. W. 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027(2002); Zhang, Z. 等人, *Biochemistry*42:6735-6746(2003) 中。用于在活体内并入非天然编码的氨基酸的方法和组合物描述于美国专利申请公开案 2003/0082575(第 10/126, 927 号)中,所述专利是以引用的方式并入本文。用于选择适用于生物体的活体内转译系统的正交的 tRNA-tRNA 合成酶对的方法也描述于美国专利申请公开案 2003/0082575(第 10/126, 927 号)和 2003/0108885 (第 10/126, 931 号)中,所述专利是以引用的方式并入本文。以引用的方式全部并入本文的标题为“Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins”的 PCT 公开案第 W004/035743 号,描述用于并入酮氨基酸的正交的 RS 和 tRNA 对。以引用的方式全部并入本文的标题为“Expanding the Eukaryotic Genetic Code”的 PCT 公开案第 W004/094593 号描述用于将非天然编码的氨基酸并入真核宿主细胞中的正交的 RS 和 tRNA 对。

[0190] 用于生产至少一个重组正交的氨酰基-tRNA 合成酶(O-RS)的方法包含:(a)产生由来自第一生物体的至少一个氨酰基-tRNA 合成酶(RS)得到的(视需要突变的)RS 库,所述第一生物体包括(但不限于)诸如詹氏甲烷球菌、横川病毒、盐杆菌属、大肠埃希氏杆菌、闪烁古生球菌、火球菌、掘越氏热球菌、嗜热菌敏捷气热菌、高度嗜热菌(*T. thermophilus*)等等的原核生物或真核生物;(b)选择(和/或筛选)RS(视需要突变的)RS 库的成员,所述成员在非天然编码的氨基酸和天然氨基酸存在下氨基酰化正交的 tRNA(O-tRNA),从而提供活性(视需要突变的)RS 的池;和/或,(c)选择(视需要通过否定选择)池的活性 RS(包括但不限于)突变 RS),所述活性 RS 在不存在非天然编码的氨基酸的情况下优先地氨基酰化 O-tRNA,从而提供至少一个重组 O-RS;其中至少一个重组 O-RS 优先地用非天然编码的氨基酸氨基酰化 O-tRNA。

[0191] 在一个实施例中,RS 是非活性 RS。非活性 RS 能通过使活性 RS 突变来产生。举例而言,非活性 RS 能通过使至少约 1 种、至少约 2 种、至少约 3 种、至少约 4 种、至少约 5 种、至少约 6 种或至少约 10 种或 10 种以上的氨基酸突变成包括(但不限于)丙氨酸的不同的氨基酸来产生。

[0192] 突变 RS 的库能使用所属领域中已知的各种技术,包括(但不限于)基于蛋白质三维 RS 结构的合理设计,或 RS 核苷酸在随机或合理设计技术中的突变来产生。举例而言,突变 RS 能通过部位特异性突变、随机突变、差异产生重组突变、嵌合构筑体、合理设计和本文中描述的或所属领域中已知的其他方法产生。

[0193] 在一个实施例中,选择(和/或筛选)RS(视需要突变的)RS 库的活性成员,即(包括但不限于)在非天然编码的氨基酸和天然氨基酸存在下氨基酰化正交的 tRNA(O-tRNA)的成员,包括:将包括(但不限于)抗生素抗性基因等等的正性选择或筛选标记和(视需要突变的)RS 库引入多个细胞中,其中正性选择和/或筛选标记包含至少一个包括(但不限于)琥珀密码子、赭石密码子或蛋白石密码子的选择密码子;使多个细胞在选择剂的存在下生长;通过抑制正性选择或筛选标记中的至少一个选择密码子,识别在选择和/或筛选剂存在下存活(或展示特异性反应)的细胞,从而提供含有活性(视需要突变的)RS 的池的被正性选择的细胞的子集。视需要,选择和/或筛选剂浓度可变化。

[0194] 一方面,正性选择标记是氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因并且 CAT 基因中的选择密码子是琥珀终止密码子。视需要,正性选择标记是 β -内酰胺酶并且 β -内酰胺酶基因中的选择密码子是琥珀终止密码子。另一方面,正性筛选标记包含荧光标记或发光筛选标记或基于亲和力的筛选标记(包括但不限于)细胞表面标记)。

[0195] 在一个实施例中,负性选择或筛选池的在不存在非天然编码的氨基酸的情况下优先氨基酰化 O-tRNA 的活性 RS(视需要突变的),包括:将负性选择或筛选标记与具有来自正性选择或筛选的活性(视需要突变的)RS 的池一起引入第二生物体的多个细胞中,其中负性选择或筛选标记包含至少一个选择密码子(包括但不限于)抗生素抗性基因,包括(但不限于)氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因);和,识别在由非天然编码的氨基酸和筛选或选择剂补充的第一培养基中存活或展示特异性筛选反应,但在未由非天然编码的氨基酸和选择或筛选剂补充的第二培养基中未能存活或展示特异性反应的细胞,从而提供具有至少一个重组 O-RS 的存活细胞或经筛选的细胞。举例而言,CAT 识别方案视需要在适当的 O-RS 重组体的确定中,起正性选择和/或负性筛选作用。举例而言,视需要,在含有具有或不具有一个或

一个以上非天然编码的氨基酸的 CAT (其包含至少一个选择密码子) 的生长培养盘上, 复制无性系的池。因此认为, 专门在含有非天然编码的氨基酸的培养盘上生长的群落含有重组 O-RS。一方面, 选择(和 / 或筛选)剂的浓度是变化的。在一些方面中, 第一生物体和第二生物体是不同的。因此, 第一生物体和 / 或第二生物体视需要包含: 原核生物、真核生物、哺乳动物、大肠埃希氏杆菌、真菌、酵母、古细菌 (archaebacterium)、真细菌、植物、昆虫、原生生物等等。在其他实施例中, 筛选标记包含荧光标记或发光筛选标记或基于亲和力的筛选标记。

[0196] 在另一个实施例中, 选择或筛选(包括(但不限于)负性选择)池的活性(视需要突变的) RS 包括: 使具有来自正性选择步骤(b)的活性突变 RS 的池分离; 将负性选择或筛选标记和活性(视需要突变的)RS 的池引入第二生物体的多个细胞中, 其中负性选择或筛选标记包含至少一个选择密码子(包括(但不限于)包含至少一个选择密码子的毒性标记基因, 包括(但不限于)核糖核酸酶 barnase 基因); 和, 识别在未由非天然编码的氨基酸补充的第一培养基中存活或展示特异性筛选反应, 但在由非天然编码的氨基酸补充的第二培养基中未能存活或展示特异性筛选反应的细胞, 从而提供具有至少一个重组 O-RS 的存活细胞或经筛选的细胞, 其中至少一个重组 O-RS 对非天然编码的氨基酸来说为特异性的。一方面, 至少一个选择密码子包含约 2 个或 2 个以上的选择密码子。所述实施例视需要可包括, 其中至少一个选择密码子包含 2 个或 2 个以上的选择密码子, 和其中第一生物体和第二生物体是不同的(包括(但不限于), 各个生物体视需要为(包括(但不限于))原核生物、真核生物、哺乳动物、大肠埃希氏杆菌、真菌、酵母、古细菌、真细菌、植物、昆虫、原生生物等等)。此外, 一些方面包括, 其中负性选择标记包含核糖核酸酶 barnase 基因(其包含至少一个选择密码子)。其他方面包括, 其中筛选标记视需要包含荧光标记或发光筛选标记或基于亲和力的筛选标记。在本文中的实施例中, 筛选和 / 或选择视需要包括筛选和 / 或选择严格性的变化。

[0197] 在一个实施例中, 生产至少一个重组正交的氨酰基-tRNA 合成酶(O-RS)的方法可进一步包含:(d) 分离至少一个重组 O-RS;(e) 产生第二组由至少一个重组 O-RS 得到的 O-RS (视需要突变的); 和, (f) 重复步骤(b)和(c)直到获得包含优先氨酰化 O-tRNA 的能力的突变 O-RS 为止。视需要, 重复步骤(d)-(f), 包括(但不限于)重复至少约两次。一方面, 第二组由至少一个重组 O-RS 得到的突变的 O-RS 可通过包括(但不限于)随机突变、部位特异性突变的突变, 重组或其组合来产生。

[0198] 在上述方法中, 包括(但不限于)正性选择 / 筛选步骤(b)、负性选择 / 筛选步骤(c)或正性和负性选择 / 筛选步骤(b)和(c)的选择 / 筛选步骤的严格性, 视需要包括使选择 / 筛选严格性变化。在另一个实施例中, 正性选择 / 筛选步骤(b)、负性选择 / 筛选步骤(c)或正性和负性选择 / 筛选步骤(b)和(c)包含使用报道体, 其中报道体是通过荧光活化细胞分类术(FACS)检测或其中报道体通过发光检测。视需要, 报道体是在细胞表面、噬菌体展示器等等上展示, 并且是基于涉及非天然编码的氨基酸或类似物的亲和力或催化活性而选择。在一个实施例中, 突变的合成酶是在细胞表面、噬菌体展示器等等上展示。

[0199] 生产重组正交的 tRNA (O-tRNA) 的方法包括:(a) 产生由来自第一生物体的至少一个包括(但不限于)抑制基因 tRNA 的 tRNA 得到的突变 tRNA 的库;(b) 选择(包括(但不限于), 负性选择)或筛选库的在不存在来自第一生物体的氨酰基-tRNA 合成酶(RS)的情况

下被来自第二生物体的 RS 氨基酰化的(视需要突变的) tRNA, 从而提供 tRNA (视需要突变的) 的池; 和, (c) 选择或筛选 tRNA (视需要突变的) 池的被所引入的正交的 RS (O-RS) 氨基酰化的成员, 从而提供至少一个重组 O-tRNA; 其中至少一个重组 O-tRNA 辨别出选择密码子并且未被来自第二生物体的 RS 有效辨别出并且被 O-RS 优先地氨基酰化。在一些实施例中, 至少一个 tRNA 是抑制基因 tRNA 和 / 或包含具有天然和 / 或非天然碱基的独特的 3 碱基密码子, 或是无义密码子、稀有密码子、非天然密码子、包含至少 4 个碱基的密码子、琥珀密码子、赭石密码子或蛋白石终止密码子。在一个实施例中, 重组 O-tRNA 拥有改善的正交性。应了解, 在一些实施例中, O-tRNA 视需要无需修饰即可从第二生物体带进第一生物体中。在各种实施例中, 第一生物体和第二生物体是相同的或不同的并且视需要选自(包括但不限于) 原核生物(包括但不限于), 詹氏甲烷球菌、横川病毒、大肠埃希氏杆菌、盐杆菌属等等)、真核生物、哺乳动物、真菌、酵母、古细菌、真细菌、植物、昆虫、原生生物等等。另外, 重组 tRNA 视需要通过非天然编码的氨基酸来氨基酰化, 其中非天然编码的氨基酸是在活体内, 天然地或通过遗传操纵而生物合成。非天然编码的氨基酸视需要被添加到用于至少第一生物体或第二生物体的生长培养基。

[0200] 一方面, 选择(包括但不限于), 负性选择)或筛选库的被氨基酰基-tRNA 合成酶氨基酰化的(视需要突变的)tRNA (步骤(b)), 包括: 将毒性标记基因和(视需要突变的)tRNA 库引入到来自第二生物体的多个细胞中, 其中毒性标记基因包含至少一个选择密码子(或导致产生毒性剂或静电剂的基因或对其中所述标记基因包含至少一个选择密码子的生物体为必要的基因); 和, 选择存活的细胞, 其中存活细胞含有包含至少一个正交的 tRNA 或非功能性 tRNA 的(视需要突变的) tRNA 的池。举例而言, 存活细胞可通过使用细胞密度比较率测定加以选择。

[0201] 另一方面, 毒性标记基因可包括 2 个或 2 个以上的选择密码子。在所述方法的另一个实施例中, 毒性标记基因是核糖核酸酶 barnase 基因, 其中核糖核酸酶 barnase 基因包含至少一个琥珀密码子。视需要, 核糖核酸酶 barnase 基因可包括 2 个或 2 个以上的琥珀密码子。

[0202] 在一个实施例中, 选择或筛选(视需要突变的) tRNA 的池的被所引入的正交的 RS (O-RS) 氨基酰化的成员可包括: 将正性选择或筛选标记基因连同 O-RS 和(视需要突变的) tRNA 的池引入到来自第二生物体的多个细胞中, 其中正性标记基因包含抗药性基因(包括但不限于) β -内酰胺酶基因, 其包含至少一个选择密码子, 诸如至少一个琥珀终止密码子) 或对生物体为必要的基因, 或导致毒性剂解毒的基因; 和, 识别在包括(但不限于) 抗生素的选择或筛选剂存在下生长的存活细胞或被筛选的细胞, 从而提供拥有至少一个重组 tRNA 的细胞的池, 其中响应至少一个选择密码子, 至少一个重组 tRNA 被 O-RS 氨基酰化并且将氨基酸插入到通过正性标记基因编码的转译产物中。在另一个实施例中, 选择和 / 或筛选剂的浓度是变化的。

[0203] 提供产生特异性 O-tRNA/O-RS 对的方法。方法包括: (a) 产生由来自第一生物体的至少一个 tRNA 得到的突变 tRNA 的库; (b) 负性选择或筛选库的在不存在来自第一生物体的氨基酰基-tRNA 合成酶(RS) 的情况下被来自第二生物体的 RS 氨基酰化的(视需要突变的) tRNA, 从而提供(视需要突变的) tRNA 的池; (c) 选择或筛选(视需要突变的) tRNA 的池的被所引入的正交的 RS (O-RS) 氨基酰化的成员, 从而提供至少一个重组 O-tRNA。至少一

个重组 O-tRNA 辨别出选择密码子并且未被来自第二生物体的 RS 有效辨别出,并且被 O-RS 优先地氨基酰化。所述方法也包括(d)产生由来自第三生物体的至少一个氨酰基-tRNA 合成酶(RS)得到的(视需要突变的)RS 库;(e)选择或筛选突变 RS 库的在非天然编码的氨基酸和天然氨基酸存在下优先地氨基酰化至少一个重组 O-tRNA 的成员,从而提供活性(视需要突变的)RS 的池;和,(f)负性选择或筛选池的在不存在非天然编码的氨基酸的情况下优先地氨基酰化至少一个重组 O-tRNA 的活性(视需要突变的)RS,从而提供至少一个特异性 O-tRNA/O-RS 对,其中至少一个特异性 O-tRNA/O-RS 对包含至少一个对非天然编码的氨基酸为特异性的重组 O-RS 和至少一个重组 O-tRNA。包括由所述方法产生的特异性 O-tRNA/O-RS 对。举例而言,特异性 O-tRNA/O-RS 对可包括(包括但不限于)mutRNATyr-mutTyrRS 对,诸如 mutRNATyr-SS12TyrRS 对、mutRNALeu-mutLeuRS 对、mutRNAThr-mutThrRS 对、mutRNAGlu-mutGluRS 对等等。另外,所述方法包括,其中第一生物体和第三生物体是相同的(包括但不限于)詹氏甲烷球菌)。

[0204] 选择适用于第二生物体的活体内转译系统的正交的 tRNA-tRNA 合成酶对的方法也包括在本发明中。所述方法包括:将标记基因、tRNA 和从第一生物体分离或得到的氨酰基-tRNA 合成酶(RS)引入到来自第二生物体的第一组细胞中;将标记基因和 tRNA 引入到来自第二生物体的复制细胞组中;和选择第一组中在复制细胞组中未能存活的存活细胞,或筛选在复制细胞组中未展示特异性筛选反应的产生所述反应的细胞,其中第一组和复制细胞组是在选择或筛选剂存在下生长,其中存活细胞或所筛选的细胞包含适用于第二生物体的活体内转译系统的正交的 tRNA-tRNA 合成酶对。在一个实施例中,比较和选择或筛选包括活体内互补检定。选择或筛选剂的浓度可为变化的。

[0205] 本发明的生物体包含各种生物体和各种组合。举例而言,本发明的方法的第一和第二生物体可为相同的或不同的。在一个实施例中,生物体视需要为原核生物,包括(但不限于)詹氏甲烷球菌、横川病毒、盐杆菌属、大肠埃希氏杆菌、闪烁古生球菌、火球菌、掘越氏热球菌、嗜热菌敏捷气热菌、高度嗜热菌等等。或者,生物体视需要包含真核生物体,包括(但不限于)植物(包括但不限于,诸如单子叶植物或双子叶植物的复杂植物)、藻类、原生生物、真菌(包括但不限于)酵母等等)、动物(包括但不限于)哺乳动物、昆虫、节肢动物等等)等等。在另一个实施例中,第二生物体是原核生物,包括(但不限于)詹氏甲烷球菌、横川病毒、盐杆菌属、大肠埃希氏杆菌、闪烁古生球菌、盐杆菌属、火球菌、掘越氏热球菌、嗜热菌敏捷气热菌、高度嗜热菌等等。或者,第二生物体可为真核生物体,包括(但不限于),酵母、动物细胞、植物细胞、真菌、哺乳动物细胞等等。在各种实施例中,第一和第二生物体是不同的。

[0206] VII. 非天然存在的氨基酸在 hGH 多肽中的定位

[0207] 本发明涵盖将一个或一个以上非天然存在的氨基酸并入例如 hGH 的 GH 多肽中。一个或一个以上非天然存在的氨基酸可以在不破坏多肽的活性的具体的位置并入。所述并入可通过进行包括(但不限于)用疏水性氨基酸取代疏水性氨基酸、庞大的氨基酸取代庞大的氨基酸、亲水性氨基酸取代亲水性氨基酸和/或将非天然存在的氨基酸插入不为活性所需的位置中的“保守的”取代而实现。

[0208] 例如 hGH 的 GH 的区域可说明如下,其中 hGH 中的氨基酸位置指示于中间一行中 (SEQ ID NO:2):

[0209] 螺旋 A 螺旋 B 螺旋 C 螺旋 D

[0210] [1-5]-[6-33]-[34-74]-[75-96]-[97-105]-[106-129]-[130-153]-[154-183]-[184-191]

[0211] N-末端 A-B 环 B-C 环 C-D 环 C-末端

[0212] 可使用各种生物化学和结构方法以选择用于在例如 hGH 的 GH 多肽内,用非天然编码的氨基酸进行取代的所要求的部位。对所属领域的技术人员来说显而易见的是多肽链的任何位置适于选择并入非天然编码的氨基酸,并且选择可能基于合理设计或通过随机选择以用于任何具体的所要求的目的或非具体的所要求的目的。选择所要求的部位可以用于生产 GH,例如具有任何所要求的性质或活性的 hGH 分子,包括(但不限于)促效剂、超促效剂、反促效剂、拮抗剂、受体结合调节剂、受体活性调节剂,用于二聚体或多聚体形成,与原生分子相比不改变活性或性质,或操纵任何诸如可溶性、聚集性或稳定性的多肽物理或化学性质。举例而言,在例如 hGH 的 GH 多肽的生物活性所需要的多肽中的定位可使用所属领域中已知的点突变分析、丙氨酸扫描或同系物扫描法来识别。参见(例如),Cunningham, B. 和 Wells, J., *Science*, 244:1081-1085(1989) (识别 14 个对 GH,例如 hGH 生物活性关键的残基)和 Cunningham, B. 等人 *Science*243:1330-1336(1989) (使用同系物扫描突变识别抗体和受体抗原决定基)。以引用的方式并入本文的美国专利第 5,580,723 号;第 5,834,250 号;第 6,013,478 号;第 6,428,954 号;和第 6,451,561 号描述通过识别影响具有目标物质的多肽的活性的活性域,系统分析诸如 hGH 的多肽的结构和功能的方法。不同于通过丙氨酸或同系物扫描突变而识别为对生物活性关键的所述残基的残基可以视所寻找多肽的所要求的活性而定,而为使用非天然编码的氨基酸进行取代的良好候选物。或者,识别为对生物活性关键的部位,也可以再次视所寻找多肽的所要求的活性而定,而为使用非天然编码的氨基酸进行取代的良好候选物。另一替代方法为简单地在多肽链上的各个位置上,用非天然编码的氨基酸进行连续取代并且观察对多肽活性的效应。对所属领域的技术人员来说显而易见的是,用于选择将非天然的氨基酸取代到任何多肽中的位置的任何方式、技术或方法适用于本发明。

[0213] 也可研究含有缺失的 hGH 多肽的天然存在的突变体的结构和活性,以确定可能容许用非天然编码的氨基酸进行取代的蛋白质的区域。对 hGH 来说,参见(例如),Kostyo 等人,*Biochem. Biophys. Acta*, 925:314(1987);Lewis, U. 等人,*J. Biol. Chem.*, 253:2679-2687(1978)。以相似方式,蛋白酶消化和单克隆抗体可用以识别担负结合 hGH 受体的 hGH 的区域。参见(例如),Cunningham, B. 等人 *Science*243:1330-1336(1989);Mills, J. 等人,*Endocrinology*, 107:391-399(1980);Li, C., *Mol. Cell. Biochem.*, 46:31-41(1982) (指示,无需损失活性即可除去残基 134-149 之间的氨基酸)。一旦可能不容许用非天然编码的氨基酸进行取代的残基已经消除,就可从 hGH 和其结合蛋白质的三维晶体结构来研究所建议的取代在各个剩余位置上的影响。对 hGH 来说,参见 de Vos, A. 等人,*Science*, 255:306-312(1992);hGH 的所有晶体结构可在蛋白质数据库(Protein Data Bank)中得到(包括 3HHR、1AXI 和 1HWG)(PDB,可在 World Wide Web,rcsb.org 上得到),所述数据库为含有蛋白质和核酸的大分子的三维结构数据的集中式数据库。如果三维结构数据不可得到,那么可以建立研究多肽的二级和三级结构的模型。因此,所属领域的技术人员可容易识别可用非天然编码的氨基酸进行取代的氨基酸位置。

[0214] 在一些实施例中,例如本发明的hGH的GH多肽包含一个或一个以上位于不会破坏多肽的螺旋或 β 二级片状结构的蛋白质区域中的非天然存在的氨基酸。

[0215] 并入非天然编码的氨基酸的示范性残基可以是那些从可能的受体结合区域(包括但不限于)部位I和部位II)排除的残基,可以是那些是完全地或部分地暴露于溶剂的残基,那些具有与邻近残基的最小氢键相互作用或不具有氢键相互作用的残基,可以是那些最低限度暴露于邻近反应性残基的残基,并且可以是那些如通过结合或不结合到其受体的hGH的三维的晶体结构,二级、三级或四级结构所预测的,在高度挠性的(包括但不限于)C-D环)或结构上刚性的(包括但不限于)B螺旋)区域中的残基。

[0216] 在一些实施例中,一个或一个以上非天然编码的氨基酸是在如下对应于hGH中的二级结构的1个或1个以上的以下区域中的任何位置上并入:对应于来自SEQ ID NO:2的1-5(N-末端)、6-33(A螺旋)、34-74(A螺旋与B螺旋之间的区域,A-B环)、75-96(B螺旋)、97-105(B螺旋与C螺旋之间的区域,B-C环)、106-129(C螺旋)、130-153(C螺旋与D螺旋之间的区域,C-D环)、154-183(D螺旋)、184-191(C-末端)的位置。在其他实施例中,例如本发明的hGH的GH多肽多肽包含至少一种取代位于例如hGH的GH的至少一个区域中的至少一种氨基酸的非天然存在的氨基酸,所述区域是选自由对应于以下区域的区域组成的群组:SEQ ID NO:2的N-末端(1-5)、A-B环的N-末端(32-46);B-C环(97-105)、C-D环(132-149)和C-末端(184-191)。在一些实施例中,一个或一个以上非天然编码的氨基酸是在例如hGH的GH的一个或一个以上的以下位置上并入,所述位置对应于:SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:1或3的对应氨基酸的位置1之前(也就是说,在N-末端处)、位置1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(也就是说,在蛋白质的羧基末端处)。

[0217] 并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位包括对应于以下部位:来自SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:1或3的对应氨基酸的位置29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、183、186和187或其任何组合。

[0218] 并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的子集,包括对应于以下部位:来自SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:1或3的对应氨基酸的位置29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186和187或其任何组合。例如hGH的GH的晶体结构和其与例如hGH的GH受体的相互作用的研究指示,所述氨基酸残基的侧链是完全地或部分地为溶剂所能达到的并且非天然编码的氨基酸的侧链可以远离蛋白质表面指向溶剂中。

[0219] 并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性位置包括对应于以下部位:来自SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:1或3的对应氨基酸的位置35、88、91、92、94、95、99、

101、103、111、131、133、134、135、136、139、140、143、145 和 155 或其任何组合。例如 hGH 的 GH 的晶体结构和其与例如 hGH 的 GH 受体的相互作用的研究指示,所述氨基酸残基的侧链是完全地暴露于溶剂的并且天然残基的侧链指向溶剂中。

[0220] 并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的子集包括对应于以下部位的位置:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 30、74、103 或其任何组合。并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的另一个子集包括对应于以下部位的位置:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的 35、92、143、145 或其任何组合。并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的另一个子集包括对应于以下部位的位置:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、131、134、143、145 或其任何组合。并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的另一个子集包括对应于以下部位的位置:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 30、35、74、92、103、145 或其任何组合。并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的另一个子集包括对应于以下部位的位置:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、143、145 或其任何组合。在某些实施例中,并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的部位包括对应于来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35 的部位。

[0221] 在一些实施例中,并入例如 hGH 的 GH 中的至少一种非天然编码的氨基酸含有例如酮基的羰基。在某些实施例中,并入例如 hGH 的 GH 中的至少一种非天然编码的氨基酸是对乙酰苯丙氨酸。在其中例如 hGH 的 GH 含有多个非天然编码的氨基酸的一些实施例中,并入例如 hGH 的 GH 中的一种以上的非天然编码的氨基酸是对乙酰苯丙氨酸。在其中例如 hGH 的 GH 含有多个非天然编码的氨基酸的一些实施例中,并入例如 hGH 的 GH 中的大体上所有非天然编码的氨基酸是对乙酰苯丙氨酸。

[0222] 在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上与水溶性聚合物连接:位置 1 之前(也就是说,在 N-末端处)、位置 1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(也就是说,在蛋白质的羧基末端处)(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于一个或一个以上以下所述者的位置的位置上与水溶性聚合物连接:30、35、74、92、103、143、145(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于一个或一个以上以下所述者的位置的位置上与水溶性聚合物连接:35、92、143、145(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于一个或一个以上以下所述者的位置的位置上与水溶性聚合物连接:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、131、134、143、145 或其任何组合。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于一个或一个以上以下所述者的位置的位置上与水溶性聚合物连

接:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 30、35、74、92、103、145 或其任何组合。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在包括(但不限于)对应于一个或一个以上以下所述者的位置的位置上与水溶性聚合物连接:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、143、145 或其任何组合。在一些实施例中,非天然存在的氨基酸是在对应于(但不限于)来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35 的位置上与水溶性聚合物连接。

[0223] 在一些实施例中,与例如 hGH 的 GH 连接的水溶性聚合物包括一种或一种以上聚乙二醇分子(PEG)。例如 PEG 的聚合物可以是直链或分支的。通常,用于本发明的例如 PEG 的直链聚合物可具有约 0.1 到约 100kDa,或约 1 到约 60kDa,或约 20 到约 40kDa,或约 30kDa 的 MW。通常,用于本发明的例如 PEG 的分支聚合物可具有约 1 到约 100kDa,约 30 到约 50kDa,或约 40kDa 的 MW。诸如 PEG 的聚合物进一步描述于本文中。在某些实施例中,例如 hGH 的 GH 与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的键是肽键。

[0224] 本发明的某些实施例涵盖包括通过共价键与至少一种水溶性聚合物连接的例如 hGH 的 GH 的组合物,其中共价键是肽键。在一些实施例中,水溶性聚合物是例如直链 PEG 的 PEG。在涵盖至少一种通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的一些实施例中,PEG 可具有约 0.1 到约 100kDa,或约 1 到约 60kDa,或约 20 到约 40kDa,或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中,PEG 具有约 30kDa 的 MW。在涵盖至少一种通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的一些实施例中,PEG 可具有约 0.1 到约 100kDa 或约 30 到约 50kDa,或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中,PEG 具有约 40kDa 的 MW。在一些实施例中,GH 是例如 hGH 的 GH 并且在某些所述实施例中,例如 hGH 的 GH 具有至少约 80% 相同于 SEQ ID NO:2 的序列;在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 具有为 SEQ ID NO:2 的序列的序列。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 含有至少一种非天然编码的氨基酸;在一些所述实施例中,至少一个肽键在非天然编码的氨基酸与至少一种水溶性聚合物之间。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸含有诸如酮基的羰基;在一些实施例中,非天然编码的氨基酸是对乙酰苯丙氨酸。在一些实施例中,对乙酰苯丙氨酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上被取代。

[0225] 因此,在一些实施例中,本发明提供通过共价键与至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物连接的例如 hGH 的 GH,其中共价键是肽键。在某些实施例中,水溶性聚合物是 PEG 并且 PEG 是直链 PEG。在所述实施例中,直链 PEG 具有约 0.1 到约 100kDa,或约 1 到约 60kDa,或约 20 到约 40kDa,或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中,PEG 具有约 30kDa 的 MW。在某些实施例中,水溶性聚合物是为分支 PEG 的 PEG。在所述实施例中,分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa,或约 30 到约 50kDa,或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过肽键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中,PEG 具有约 40kDa 的 MW。

[0226] 在一些实施例中,本发明提供例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 含有非天然编码的氨基酸,其中 GH 是通过共价键与至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物连接,并且共价键是非天然编码的氨基酸与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的肽键。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中,PEG 是直链 PEG。在所述实施例中,直链 PEG 具有约 0.1 到

约 100kDa, 或约 1 到约 60kDa, 或约 20 到约 40kDa, 或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 30kDa 的 MW。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是分支 PEG。在所述实施例中, 分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa, 或约 30 到约 50kDa, 或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 40kDa 的 MW。

[0227] 在一些实施例中, 本发明提供例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 含有为含羰基的非天然编码的氨基酸的非天然编码的氨基酸, GH 是通过共价键与至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物连接, 并且共价键是非天然编码的含羰基氨基酸与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的脞键。在一些实施例中, 非天然编码的含羰基氨基酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是直链 PEG。在所述实施例中, 直链 PEG 具有约 0.1 到约 100kDa, 或约 1 到约 60kDa, 或约 20 到约 40kDa, 或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 30kDa 的 MW。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是分支 PEG。在所述实施例中, 分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa, 或约 30 到约 50kDa, 或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 40kDa 的 MW。

[0228] 在一些实施例中, 本发明提供含有包括酮基的非天然编码的氨基酸的例如 hGH 的 GH, 其中 GH 是通过共价键与至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物连接, 并且共价键是含有酮基的非天然编码的氨基酸与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的脞键。在一些实施例中, 含有酮基的非天然编码的氨基酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是直链 PEG。在所述实施例中, 直链 PEG 具有约 0.1 到约 100kDa, 或约 1 到约 60kDa, 或约 20 到约 40kDa, 或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 30kDa 的 MW。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是分支 PEG。在所述实施例中, 分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa, 或约 30 到约 50kDa, 或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 40kDa 的 MW。

[0229] 在一些实施例中, 本发明提供含有为对乙酰苯丙氨酸的非天然编码的氨基酸的例如 hGH 的 GH, 其中 GH 是通过共价键与至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物连接, 并且共价键是对乙酰苯丙氨酸与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的脞键。在一些实施例中, 对乙酰苯丙氨酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是直链 PEG。在所述实施例中, 直链 PEG 具有约 0.1 到约 100kDa, 或约 1 到约 60kDa, 或约 20 到约 40kDa, 或约 30kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的直链 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 30kDa 的 MW。在水溶性聚合物是 PEG 的某些实施例中, PEG 是分支 PEG。在所述实施例中, 分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa, 或约 30 到约 50kDa, 或约 40kDa 的 MW。在涵盖通过脞键与例如 hGH 的 GH 连接的分支 PEG 的某些实施例中, PEG 具有约 40kDa 的 MW。

[0230] 在某些实施例中, 本发明提供例如 hGH 的 GH, 其包括 SEQ ID NO:2 并且例如 hGH 的 GH 是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上经对乙酰苯丙氨酸取代, 所述乙酰苯丙氨酸通过脞键连接到具有约 30kDa 的 MW 的直链 PEG。

[0231] 在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过脞键连接到至少一种例如

直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 位置 1 之前(也就是说, 在 N-末端处)、位置 1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(也就是说, 在蛋白质的羧基末端处)(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 30、35、74、92、103、143、145 (SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 35、92、143、145 (SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、131、134、143、145 或其任何组合。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 30、35、74、92、103、145 或其任何组合。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸: 来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、143、145 或其任何组合。在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35 的位置的一个或一个以上位置上被取代的至少一种非天然编码的氨基酸。在其中 PEG 是直链 PEG 的实施例中, PEG 可具有约 0.1 到约 100kDa, 或约 1 到约 60kDa, 或约 20 到约 40kDa, 或约 30kDa 的 MW。

[0232] 在一些实施例中, 本发明提供激素组合物, 其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH, 其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被

取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸：位置1之前(也就是说,在N-末端处)、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(也就是说,在蛋白质的羧基末端处)(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸:30、35、74、92、103、143、145(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸:35、92、143、145 (SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸)。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35、92、131、134、143、145 或其任何组合。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的为 30、35、74、92、103、145 或其任何组合。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于以下位置的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸:来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的为 35、92、143、145 或其任何组合。在一些实施例中,本发明提供激素组合物,其包括通过肽键连接到至少一种例如直链 PEG 的 PEG 的例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,并且例如 hGH 的 GH 含有在包括(但不限于)对应于来自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1 或 3 的对应氨基酸的位置 35 的位置的一个或一个以上位置上被取代的为对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸。在其中 PEG 是直链 PEG 的实施例中,PEG 可具有约 0.1 到约 100kDa,或约 1 到约 60kDa,或约 20 到约 40kDa,或约 30kDa 的 MW。

[0233] 在一些实施例中,本发明提供例如 hGH 的 GH,其中例如 hGH 的 GH 含有至少一种非天然编码的氨基酸,GH 是通过共价键与例如多个 PEG 的多个水溶性聚合物连接,其中一个或一个以上共价键是至少一种非天然编码的氨基酸与例如 PEG 的水溶性聚合物之间的

脲键。例如 hGH 的 GH 可以连接于约 2-100 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 2-50 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 2-25 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 2-10 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 2-5 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 5-100 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 5-50 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 5-25 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 5-10 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 10-100 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 10-50 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 10-20 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 20-100 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 20-50 个例如 PEG 的水溶性聚合物,或约 50-100 个例如 PEG 的水溶性聚合物。一个或一个以上非天然编码的氨基酸可以在本文中描述的任何位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在一些实施例中,至少一种非天然编码的氨基酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸包括为含羰基的非天然编码的氨基酸,例如含酮的非天然编码的氨基酸,诸如对乙酰苯丙氨酸的至少一种非天然编码的氨基酸。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 包括对乙酰苯丙氨酸。在一些实施例中,对乙酰苯丙氨酸是在对应于 SEQ ID NO:2 的位置 35 的位置上并入例如 hGH 的 GH 中,其中对乙酰苯丙氨酸是通过脲键与例如 PEG 之一的聚合物之一连接。在一些实施例中,至少一种例如 PEG 的水溶性聚合物是通过与至少一种非天然编码的氨基酸的共价键而与例如 hGH 的 GH 连接。在一些实施例中,共价键是脲键。在一些实施例中,多个例如 PEG 的水溶性聚合物是通过与多个非天然编码的氨基酸的共价键而与例如 hGH 的 GH 连接。在一些实施例中,至少一个共价键脲键;在一些实施例中,多个共价键是脲键;在一些实施例中,大体上所有的键是脲键。多个例如 PEG 的水溶性聚合物可以是直链的、分支的或其任何组合。在并入一种或一种以上直链 PEG 的实施例中,直链 PEG 具有约 0.1 到约 100kDa,或约 1 到约 60kDa,或约 20 到约 40kDa,或约 30kDa 的 MW。在并入一种或一种以上分支 PEG 的实施例中,分支 PEG 具有约 1 到约 100kDa,或约 30 到约 50kDa,或约 40kDa 的 MW。应了解,使用多个例如 PEG 的水溶性聚合物的实施例一般而言将使用比在其中使用单个 PEG 的实施例中更低 MW 的所述聚合物。因此,在一些实施例中,多个 PEG 的总 MW 是约 0.1-500kDa,或约 0.1-200kDa,或约 0.1-100kDa,或约 1-1000kDa,或约 1-500kDa,或约 1-200kDa,或约 1-100kDa,或约 10-1000kDa,或约 10-500kDa,或约 10-200kDa,或约 10-100kDa,或约 10-50kDa,或约 20-1000kDa,或约 20-500kDa,或约 20-200kDa,或约 20-100kDa,或约 20-80kDa、约 20-60kDa、约 5-100kDa、约 5-50kDa,或约 5-20kDa。

[0234] 人类 GH 拮抗剂包括(但不限于),在位置 1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123 和 127 上或另外在位置 1 (也就是说,在 N-末端处)或其任何组合(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1、3 或任何其他 GH 序列中的对应氨基酸)的位置上具有取代的所述拮抗剂。

[0235] 可将多种非天然编码的氨基酸取代或并入例如 hGH 的 GH 多肽的中的给定位置。一般而言,选择具体的非天然编码的氨基酸用于基于例如 hGH 的 GH 多肽的三维晶体结构的研究与其受体合并,优选保守取代(也就是说,基于芳基的非天然编码的氨基酸,诸如对乙酰苯丙氨酸或 O- 炔丙基酪氨酸取代 Phe、Tyr 或 Trp)和所属领域技术人员希望引入例如 hGH 的 GH 多肽中的特异性结合化学作用(例如,如果所属领域技术人员想实现与带有炔部分的水溶性聚合物的 Huisgen[3+2] 环加成作用或与带有又并入膦部分的芳基酯的水溶性聚合物的酰胺键形成作用,那么就引入 4- 叠氮基苯丙氨酸)。

[0236] 在一个实施例中,方法另外包括将非天然氨基酸并入蛋白质中,其中非天然氨基酸包含第一反应性基团;和使蛋白质与包含第二反应性基团的分子(包括但不限于)标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光致交联剂、放射性核素、细胞毒素化合物、药物、亲和标记、光亲和标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖的官能团、共价地或非共价地与其他分子相互作用的基团、光致笼罩部分、可光化辐射激发的部分、光敏异构化部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、并入重原子的部分、可化学裂解的基团、可光致裂解的基团、伸长的侧链、碳连接的糖、氧化还原作用活性剂、氨基硫代酸、有毒的部分、同位素标记的部分、生物物理学探针、发磷光的基团、化学发光的基团、电子密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测标记、小分子、量子点、纳米传导物、放射性核苷酸、放射性传导物、中子俘获剂,或上述物质的任何组合或任何其他所需的化合物或物质)接触。第一反应性基团与第二反应性基团反应以通过 [3+2] 环加成作用将分子连接到非天然氨基酸。在一个实施例中,第一反应性基团是炔基或叠氮基部分并且第二反应性基团是叠氮基或炔基部分。举例而言,第一反应性基团是炔基部分(包括但不限于)在非天然氨基酸对炔丙基氧基苯丙氨酸中)并且第二反应性基团是叠氮基部分。在另一个实例中,第一反应性基团是叠氮基部分(包括但不限于)在非天然氨基酸对叠氮基-L-苯丙氨酸中)并且第二反应性基团是炔基部分。

[0237] 在一些情况下,非天然编码的氨基酸取代将与例如 hGH 的 GH 多肽中的其他添加、取代或缺失组合以影响例如 hGH 的 GH 多肽的其他生物特征。在一些情况下,其他添加、取代或缺失可以增加例如 hGH 的 GH 多肽的稳定性(包括但不限于)对蛋白水解降解的抵抗性)或增加例如 hGH 的 GH 多肽对其受体的亲和力。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 多肽包含选自以下取代组成的群组的氨基酸取代;SEQ ID NO:2 中的 F10A、F10H、F10I;M14W、M14Q、M14G;H18D;H21N;G120A;R167N;D171S;E174S;F176Y、I179T 或其任何组合。在一些情况下,其他添加、取代或缺失可以增加例如 hGH 的 GH 多肽的可溶性(包括但不限于)当在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达时)。在一些实施例中,添加、取代或缺失可以增加在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的多肽可溶性。在一些实施例中,除用于并入非天然的氨基酸的部位之外,选择用于由天然编码的或非天然的氨基酸进行取代的其他部位,以增加在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的多肽可溶性。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 多肽包含另一添加、取代或缺失,其调节对例如 hGH 的 GH 多肽受体的亲和力,调节(包括但不限于)增加或降低)受体二聚作用,稳定受体二聚物,调节循环半衰期,调节释放或生物可用性,促进纯化,或改良或改变具体的投药路线。举例而言,除如上文所述引入一个或一个以上非天然编码的氨基酸之外,引入一个或一个以上以下取代来增加例如 hGH 的 GH 变体对其受体的亲和力:F10A、F10H 或 F10I;M14W、M14Q 或 M14G;H18D;H21N;R167N;D171S;E174S;F176Y 和 I179T。同样地,例如 hGH 的 GH 多肽可包含化学或酶裂解序列、蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体结合域(包括但不限于)FLAG 或聚 His)或其他基于亲和力的序列(包括但不限于)FLAG、聚 His、GST 等)或连接分子(包括但不限于)生物素),其改善检测(包括但不限于)GFP)、纯化、通过组织或细胞膜的运输、前药释放或活化、hGH 尺寸减缩或多肽的

其他特征。

[0238] 在一些实施例中,非天然编码的氨基酸的取代产生例如 hGH 的 GH 拮抗剂。用于并入一个或一个以上非天然编码的氨基酸的示范性部位的子集包括:位置 1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、127 或另外位置 1 之前(SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:1、3 的对应氨基酸,或任何其他 GH 序列)。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 拮抗剂包含使 GH 充当拮抗剂的在以下区域中的至少一次取代:区域 1-5 (N-末端)、6-33 (A 螺旋)、34-74 (A 螺旋与 B 螺旋之间的区域,A-B 环)、75-96 (B 螺旋)、97-105 (B 螺旋与 C 螺旋之间的区域,B-C 环)、106-129 (C 螺旋)、130-153 (C 螺旋与 D 螺旋之间的区域,C-D 环)、154-183 (D 螺旋)、184-191 (C-末端)。在其他实施例中,并入非天然编码的氨基酸的示范性部位包括螺旋 A 和一部分螺旋 C 的氨基末端区域中的残基。在另一个实施例中,由诸如对叠氨基-L-苯丙氨酸或 O-炔丙基-L-酪氨酸的非天然编码的氨基酸取代 G120。在其他实施例中,上文所列出的取代是与使例如 hGH 的 GH 多肽成为例如 hGH 的 GH 拮抗剂的其他取代组合。举例而言,非天然编码的氨基酸是在本文中识别的位置之一处取代并且同时在 G120 处引入取代(例如 G120R、G120K、G120W、G120Y、G120F 或 G120E)。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 拮抗剂包含与存在于例如 hGH 的 GH 分子的受体结合区域中的水溶性聚合物连接的非天然编码的氨基酸。

[0239] 在一些情况下,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或 10 种以上的氨基酸经一个或一个以上非天然编码的氨基酸取代。在一些情况下,例如 hGH 的 GH 多肽另外包括一个或一个以上非天然编码的氨基酸对天然存在的氨基酸的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 次或 10 次以上的取代。举例而言,在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 的以下区域中的一个或一个以上残基经一个或一个以上非天然编码的氨基酸取代:1-5 (N-末端);32-46 (A-B 环的 N-末端);97-105 (B-C 环);和 132-149(C-D 环);和 184-191(C-末端)。在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 的以下区域中的一个或一个以上残基经一个或一个以上非天然编码的氨基酸取代:1-5 (N-末端)、6-33 (A 螺旋)、34-74 (A 螺旋与 B 螺旋之间的区域,A-B 环)、75-96 (B 螺旋)、97-105 (B 螺旋与 C 螺旋之间的区域,B-C 环)、106-129 (C 螺旋)、130-153 (C 螺旋与 D 螺旋之间的区域,C-D 环)、154-183 (D 螺旋)、184-191 (C-末端)。在一些情况下,一个或一个以上非天然编码的残基是与一个或一个以上低分子量直链或分支 PEG (质量大约 5-20kDa 或更小)连接,进而相对于连接于单一、高分子量 PEG 的物质来说,增强结合亲和力和相当的血清半衰期。

[0240] 在一些实施例中,例如 hGH 的 GH 的以下残基的最多 2 个残基在以下位置上经一个或一个以上非天然编码的氨基酸取代:29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、183、186 和 187。在一些情况下,进行以下成对的取代中的任何取代:K38X* 和 K140X*;K41X* 和 K145X*;Y35X* 和 E88X*;Y35X* 和 F92X*;Y35X* 和 Y143X*;F92X* 和 Y143X*,其中 X* 表示非天然编码的氨基酸。用于并入两种或两种以上的非天然编码的氨基酸的优选部位包括以下残基的组合:29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186 和 187。用于并入两种或两种以上的非天然编码的氨基酸的尤其优选部位包括以下残基的

组合 :35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、131、133、134、135、136、139、140、143、145 和 155。

[0241] 用于将两种或两种以上的非天然编码的氨基酸并入例如 hGH 的 GH 中的优选部位包括以下残基的组合 :来自 SEQ ID NO:2 的位置 1 之前(也就是说,在 N-末端处)、位置 1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(也就是说,在蛋白质的羧基末端处)或其任何组合。

[0242] VIII. 测量 hGH 多肽活性和 hGH 多肽对 hGH 多肽受体的亲和力

[0243] hGH 的活性可以使用包括(但不限于)细胞结合检定或对 IM9 细胞的 pSTAT5 检定的所属领域中已知的若干技术的任何技术来测量。为评估经修饰 hGH 多肽的生物活性,可以使用监测 hGH 与其受体之间的相互作用的检定。举例而言,可以使用在人类 IM-9 淋巴细胞细胞系(ATCC, Manassas, VA)中测量转录家族成员的信号转导物和活化子,即 STAT5 的酪氨酸磷酸化作用的检定。参见(例如), Silva 等人, Mol. Endocrinol. (1996) 10(5):508-518。使 IM-9 细胞在检定培养基(苯酚-红游离 RPMI、10mM HEPES、1% 加热失活的木炭/经葡聚糖处理的 FBS、丙酮酸钠、青霉素(penicillin)和链霉素(streptomycin))中饥饿隔夜,之后在 37°C 下,用 12- 点剂量范围的 hGH 多肽刺激 10min。用 1% 甲醛固定受激细胞,之后用 90% 冰冷甲醇在冰上透性化 1 小时。STAT5 磷酸化作用的水平是通过在室温下,用初级磷酸 STAT5 抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)细胞内染色 30min,接着用 PE 结合的二级抗体染色而检测。样品采集是在 FACS Array 上执行,并在 Flowjo 软件(Tree Star Inc., Ashland, OR)上分析所获得的数据。EC50 值是由利用 SigmaPlot,以平均荧光强度(MFI)相对蛋白质浓度绘制的剂量反应曲线得到。

[0244] 或者,使用 BrdU 的增殖研究可以在诸如经大鼠生长激素受体稳定转染的 BAF3 的细胞系中进行。表达 BAF3 细胞系,2E2-2B12-F4 的缺血大鼠生长激素受体,即 GHR(L43R)是以 5×10^4 个细胞/孔的密度涂于 96 孔培养盘中。用 12- 点剂量范围的 hGH 蛋白质活化细胞并且同时用 50 μ M BrdU(Sigma, St. Louis, MO)标记。在培养物中 48 小时后,在室温下,用 100 μ l 的 BD cytofix/cytoperm 溶液(BD Biosciences)固定/透性化细胞 30min。为暴露 BrdU 抗原决定基,在 37°C 下,用 30 微克/孔的 DNase(Sigma)处理经固定/透性化的细胞历时 1 小时。使用 APC 结合的抗 BrdU 抗体(BD Biosciences)进行荧光免疫染色使得能够在 FACS Array 上进行样品分析。

[0245] hGH 受体可按 McFarland 等人, Science, 245:494-499(1989) 和 Leung, D. 等人, Nature, 330:537-543(1987) 中所述来制备。hGH 多肽活性可使用标准或已知的活体外或活体内检定测定。举例而言,在 hGH 存在下增殖的细胞系(例如表达 hGH 受体或催乳受体的细胞系)可用以监测 hGH 受体结合。参见(例如), Clark, R. 等人, J. Biol. Chem. 271(36):21969(1996); Wada 等人, Mol. Endocrinol. 12:146-156(1998); Gout, P. W. 等人 Cancer Res. 40, 2433-2436(1980); W099/03887。对包含非天然的氨基酸的非聚乙二醇化或聚乙二醇化的 hGH 多肽来说,激素对其受体的亲和力可通过使用 BIAcore™ 生物

传感器(GE Healthcare)测量。参见(例如),第 5,849,535 号美国专利;Spencer, S. A. 等人, *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867(1988)。用于测试 hGH 活性的活体内动物模型包括描述于(例如)Clark 等人, *J. Biol. Chem.* 271(36):21969-21977(1996) 中的所述模型。包含一个或一个以上非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的二聚能力的检定可按 Cunningham, B. 等人, *Science*, 254:821-825(1991) 和 Fuh, G. 等人, *Science*, 256:1677-1680(1992) 中所述进行。所有引用的参考文献和专利是以引用的方式并入本文。上述对检定方法的参考文献的编写是不完全的,并且所属领域的技术人员将认识到适用于对所要求的最终结果进行测试的其他检定。

[0246] 以引用的方式并入本文的申请于 2005 年 1 月 28 号并且标题为“Modified Growth Hormone Polypeptides and Their Uses”的美国专利公开案第 2005/0170404 号另外详细描述用于并入一个或一个以上非天然存在的氨基酸、非天然编码的氨基酸、正交的 tRNA、正交的氨酰基 tRNA 合成酶的 hGH 的残基和表征 hGH 的方法。

[0247] IX. 测量效力、功能性活体内半衰期和药物动力学参数

[0248] 本发明的一个重要方面是延长的生物半衰期,其是通过构筑具有或不具有多肽与水溶性聚合物部分的结合作用的 hGH 多肽而获得。hGH 多肽血清浓度的快速降低已使评估对用结合的和非结合的 hGH 多肽和其变体进行治疗的生物反应成为重要的。本发明的结合和非结合的 hGH 多肽和其变体也可在皮下投药或静脉内投药后具有延长的血清半衰期,使通过(例如)ELISA 方法或通过初级筛选检定进行测量成为可能。可以使用来自 BioSource International (Camarillo, CA) 或 Diagnostic Systems Laboratories (Webster, TX) 的 ELISA 或 RIA 试剂盒。活体内生物半衰期的测量是按本文所述执行。

[0249] 包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的效力和功能性活体内半衰期可根据 Clark, R. 等人, *J. Biol. Chem.* 271(36):21969-21977(1996) 中所述的方案而测定。

[0250] 包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的药物动力学参数可在正常的 Sprague-Dawley 雄性大鼠中评估(每个处理组 N=5 只动物)。动物将接受单一剂量的 25 微克/大鼠(静脉内)或 50 微克/大鼠(皮下),并且将根据预先定义的时程抽取大约 5-7 个血样,通常,对包含非天然编码的氨基酸的未与水溶性聚合物结合的 hGH 多肽来说,时程涵盖约 6 小时,并且对包含非天然编码的氨基酸且与水溶性聚合物结合的 hGH 多肽来说,时程涵盖约 4 小时。已在若干物种中充分研究了 hGH 多肽的药物动力学数据,并且所述数据可直接与由包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽所获得的数据比较。参见 Mordenti J. 等人, *Pharm. Res.* 8(11):1351-59(1991) 对有关 hGH 的研究。

[0251] 药物动力学参数也可在例如猕猴的灵长类动物中评估。通常,皮下投与或静脉内投与单一注射液,并且随时间监测血清 hGH 水平。

[0252] 根据本发明的 hGH 多肽的特异活性可通过所属领域中已知的各种检定测定。根据本发明获得和纯化的 hGH 多肽突变蛋白质或其片段的生物活性可通过本文中描述或提及的方法或为所属领域的技术人员所知的方法来测试。

[0253] X. hGH 多肽的治疗性用途

[0254] hGH 促效剂多肽可以适用于(例如)治疗生长不足、免疫病症并且适用于促进心脏功能。具有生长不足的个体包括(例如),具有特纳氏(Turner)综合症的个体, GH 不足的个体(包括儿童),在其生长板封闭之前经历约 2-3 年,其正常生长曲线减慢或延迟的儿童(有

时称为“矮小正常儿童”),和其中对 GH 胰岛素样生长因子 -I (IGF-I)反应已经被化学阻断(也就是说,因糖皮质激素治疗)的个体或诸如在对 GH 的 IGF-I 反应自然地降低的成年患者中的个体。本发明的 hGH 多肽可以适用于治疗具有以下病状的个体:儿科生长激素不足、特发性身材矮小、儿童期发作成年生长激素不足、成年发作成年生长激素不足或二次生长激素不足。被诊断具有成年期生长激素不足的成年人可能具有垂体瘤或放射物。包括(但不限于)代谢综合症、颅脑损伤、肥胖、骨质疏松症或抑郁症的病状可能会造成成年人的类似生长激素不足综合症。

[0255] 促效剂 hGH 变体可以通过增加哺乳动物的免疫功能而起作用以刺激哺乳动物的免疫系统,无论增加是由于抗体介导作用还是细胞介导作用,并且无论免疫系统对用 hGH 多肽治疗的宿主来说是为内源性的,还是从供体移植到接受 hGH 多肽的宿主接受者(如在骨髓移植中)。“免疫病症”包括任何病状,其中个体的免疫系统具有比正常的免疫系统减少的对抗原的抗体或细胞反应,所述个体包括由于药物(例如化学治疗性的)治疗而具有降低免疫性的小脾脏的所述个体。具有免疫病症的实例个体包括(例如),老年患者、经历化学疗法或辐射疗法的个体、从重大疾病恢复或将要进行手术的个体、具有 AIDS 的个体、具有诸如低丙种球蛋白血症不足、普遍变化的丙种球蛋白血症不足和选择性免疫球蛋白不足(例如, IgA 不足)的先天和后天 B 细胞不足的患者,感染诸如狂犬病的病毒,而潜伏时间比患者的免疫反应更短的患者;和具有诸如 diGeorge 综合症的遗传病症的个体。

[0256] hGH 拮抗剂多肽可以适用于治疗巨人症和肢端肥大症、糖尿病和由糖尿病产生的并发症(糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变)、眼睛血管疾病(例如,包括增生性新血管形成)、肾病和 GH 反应性恶性肿瘤。眼睛血管疾病包括(例如)视网膜病(由(例如)早产儿贫血病或镰刀形红细胞贫血病引起)和黄斑变性。GH 反应性恶性肿瘤包括(例如),威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor),肉瘤(例如,骨源性肉瘤),乳癌、结肠癌、前列腺癌和甲状腺癌,和表达 GH 受体 mRNA 的组织的癌症(也就是说,胎盘、胸腺、脑、唾液腺、前列腺、骨髓、骨骼肌、气管、脊髓、视网膜、淋巴结的癌症和来自伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、结肠直肠癌、肺癌、成淋巴细胞的白血病和黑素瘤的癌症)。

[0257] 本发明的例如 hGH 的 GH 促效剂多肽可以适用于(例如)治疗慢性肾衰竭、与慢性肾功能不全(CRI)有关的生长不良、与脱纳氏综合症(Turner Syndrome)有关的身材矮小、儿科帕德维利综合症(Prader-Willi Syndrome)(PWS)、具有消瘦或恶病体质的 HIV 患者、小于孕龄出生的儿童(SGA)、肥胖和骨质疏松症。

[0258] 包括聚乙二醇化的 hGH 的本发明的 hGH 多肽,可以通过适合于蛋白质或肽的包括(但不限于)非经肠的路线的任何惯用路线投与,例如通过包括(但不限于)皮下或静脉内注射或任何其他形式的注射或输液来投与。多肽组合物可通过包括(但不限于)经口、静脉内、腹膜内、肌肉内、经皮、皮下、局部、舌下或直肠方式的大量路线投与。包含经修饰或未经修饰的非天然的氨基酸多肽的组合物也能通过脂质体投与。所述投药路线和适当配方通常为所属领域的技术人员所知。包括聚乙二醇化 hGH 的包含非天然的氨基酸的 hGH 多肽可以单独使用或与诸如医药载剂的其他适合的组分一起组合使用。

[0259] hGH 的平均量可以变化并且具体来说,应基于有资格的医师的推荐和处方。hGH 的精确量优先对以下所述因素进行考虑:所治疗的病状的确切类型、所治疗的患者的病状以及组合物中的其他成分。待给予的量可以容易地由所属领域的技术人员,基于使用 hGH 的

疗法加以确定。

[0260] 本发明的医药组合物可以惯用方式来制造。

[0261] XI. 供本发明使用的通用重组核酸方法

[0262] 在本发明的许多实施例中,将使用重组方法分离、克隆和通常改变编码所关注的 hGH 多肽的核酸。所述实施例适用于(包括但不限于)蛋白质表达或在变体、衍生物、表达序列盒或由 hGH 多肽得到的其他序列的产生期间使用。在一些实施例中,编码本发明的多肽的序列是可操作地与异源启动子连接。在宿主细胞中的 hGH 的分离和 GH 的产生描述于(例如)美国专利第 4,601,980、4,604,359、4,634,677、4,658,021、4,898,830、5,424,199、5,795,745、5,854,026、5,849,535、6,004,931、6,022,711、6,143,523 和 6,608,183 号中,所述专利是以引用的方式并入本文。

[0263] 编码包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的核苷酸序列可以基于母体多肽的氨基酸序列并且接着改变核苷酸序列以便实现相关氨基酸残基的引入(也就是说,并入或取代)或除去(也就是说,缺失或取代)而合成。核苷酸序列可以便利地通过根据惯用方法的定位诱变而被修饰。或者,核苷酸序列可以通过化学合成制备,包括(但不限于)通过使用寡核苷酸合成器制备,其中寡核苷酸是基于所要求的多肽的氨基酸序列并且优先选择在其中产生重组多肽的宿主细胞中有利的所述密码子而设计。举例而言,若干编码所要求的多肽的部分的小寡核苷酸可以通过 PCR、连接或连接链反应合成和装配。参见(例如),Barany 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. 88:189-193(1991);美国专利第 6,521,427 号,其是以引用的方式并入本文。

[0264] 本发明利用重组遗传学领域中的常规技术。揭示用于本发明的通用方法的基本文章包括 Sambrook 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第三版 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等人, 编, 1994)。

[0265] 描述分子生物技术的一般文章包括 Berger 和 Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* 第 152 卷 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook 等人, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (第二版), 第 1-3 卷, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel 等人编, *Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc.*, (通过 1999 补充) ("Ausubel")。所述文章描述突变, 载体、启动子的用途和许多其他关于(包括但不限于)基因或多核苷酸的产生的相关主题, 所述基因或多核苷酸包括用于产生包括非天然氨基酸、正交 tRNA、正交 tRNA 合成酶和其对的蛋白质的选择密码子。

[0266] 本发明使用各种类型的突变用于各种目的, 包括(但不限于)产生新颖的合成酶或 tRNA, 使 tRNA 分子突变, 使编码合成酶的多核苷酸突变, 产生 tRNA 的库, 产生合成酶的库, 产生选择密码子, 将编码非天然氨基酸的选择密码子插入所关注的蛋白质或多肽中。所述突变包括(但不限于)定位、随机点突变, 同源重组, DNA 滑移或其他回归突变方法, 嵌合建构, 使用含有模板的尿嘧啶的突变、寡核苷酸定位突变, 经硫代磷酸酯修饰的 DNA 突变、使用缺口双链体 DNA 等等的突变, 或其任何组合。其他适合方法包括点错配修复、使用修复缺

失宿主菌株的突变,限制选择和限制-纯化、缺失突变、通过总基因合成的突变、双链断裂修复,诸如此类。包括(但不限于)涉及嵌合构筑体的突变也包括在本发明中。在一个实施例中,突变可通过天然存在的分子或经改变或突变的天然存在的分子的包括(但不限于)序列,序列比较,物理性质,二级、三级或四级结构,晶体结构等等已知信息来加以指导。

[0267] 本文中所见的文章和实例描述所述程序。其他信息见于以下本文中引用的公开案和参考文献中:Ling 等人,Approaches to DNA mutagenesis:an overview,Anal Biochem. 254(2):157-178(1997);Dale 等人,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. 和 Lilley, D. M. J, 编, Springer Verlag, Berlin) (1987);Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492(1985);Kunkel 等人, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol. 154, 367-382(1987);Bass 等人, 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 M13vectors, 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 等人, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl. Acids Res. 13:8749-8764(1985);Taylor 等人, 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 等人, 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 16:791-802(1988);Sayers 等人, 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 等人, 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 等人, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16:7207(1988); Fritz 等人, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, Nucl. Acids Res. 16:6987-6999(1988); Kramer 等人, 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 等人, 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 等人, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A317:415-423(1986); Nambiar 等人, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223:1299-1301(1984); Sakmar 和 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 等人, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323(1985); Grundstrom 等人, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13:3305-3316(1985); Mandeck, 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 等人, Nature Biotechnology, 19:456-460(2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91(1994); 和 I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8(1995)。对许多上述方法的其他详细描述可见于 Methods in Enzymology 第 154 卷中, 其也描述对使用各种突变方法故障寻找问题的有效控制。

[0268] (例如) 适用于例如使合成酶的库突变或改变 tRNA 的本发明突变的寡核苷酸, 通常是根据由 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, (1981) 描述的固相亚磷酰胺三酯方法, (例如) 使用如 Needham-VanDevanter 等人, Nucleic Acids Res., 12:6159-6168(1984) 中所述的自动合成器, 来化学合成。

[0269] 本发明也涉及真核宿主细胞、非真核宿主细胞和用于通过正交 tRNA/RS 对活体内并入非天然氨基酸的生物体。宿主细胞是用本发明的多核苷酸, 或包括本发明的多核苷酸 (包括 (但不限于) 可为 (例如) 克隆载体或表达载体的本发明的载体) 的构筑体遗传工程化 (包括 (但不限于), 转形、转导或转染)。举例而言, 正交 tRNA、正交 tRNA 合成酶和待衍生化

的蛋白质的编码区域是可操作地与在所要求的宿主细胞中起作用的基因表达控制元件连接。载体可(例如)呈质粒、粘质粒、噬菌体、细菌、病毒、裸露多核苷酸或结合多核苷酸形式。载体通过包括以下方法的标准方法引入细胞和/或微生物中:电穿孔(Fromm 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA82, 5824(1985))、通过病毒载体进行感染、通过在小珠粒或粒子的基质中或表面上(Klein et al., Nature327, 70-73(1987))具有核酸的小粒子的高速弹道渗透作用,和/或诸如此类。

[0270] 经工程化的宿主细胞可在惯用营养培养基中培养,所述营养培养基适当时为诸如筛选步骤、活化启动子或选择转化体的所述活性而改质。可视需要使所述细胞在转基因生物体中培养。其他对(包括但不限于)细胞分离和培养(例如,对后续核酸分离)而言有用的参考文献包括 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第三版, Wiley-Liss, New York 和其中引用的参考文献;Payne 等人(1992)Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley&Sons, Inc. New York, NY;Gamborg 和 Phillips(编)(1995)Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York) 和 Atlas and Parks(编)The Handbook of Microbiological Media(1993)CRC Press, Boca Raton, FL。

[0271] 将目标核酸引入细胞中的若干熟知的方法是可用的,任何的方法可用于本发明中。所述方法包括:将接受者细胞与含有 DNA 的细菌原生质体融合、电穿孔、抛射体轰击和用病毒载体进行感染(下文中进一步讨论)等。细菌细胞可用以扩增含有本发明的 DNA 构筑体的质粒的数量。使细菌生长到对数期并且细菌中的质粒可通过所属领域中已知的各种方法分离(例如参见 Sambrook)。另外,用于从细菌纯化质粒的试剂盒是市售的(例如参见, EasyPrep™、FlexiPrep™, 都来自 GE Healthcare;来自 Stratagene 的 StrataClean™;和来自 Qiagen 的 QIAprep™)。然后进一步操纵经分离和纯化的质粒来产生用以转染细胞或并入相关载体中以感染生物体的其他质粒。典型的载体含有转录和转译终止子、转录和转译起始序列和用于调节具体的目标核酸的表达的启动子。载体视需要包含基因表达序列盒,所述表达序列盒含有至少一个独立的终止子序列、允许序列盒在真核生物或原核生物或两者(包括但不限于)穿梭载体)中复制的序列和用于原核系统和真核系统的选择标记物。载体适于在原核生物、真核生物或两者中复制和合并。参见, Gillam & Smith, Gene8:81(1979);Roberts 等人, Nature. 328:731(1987);Schneider, E. 等人, Protein Expr. Purif. 6(1):10-14(1995);Ausubel, Sambrook, Berger(所有同上)。用于克隆的细菌和噬菌体的目录(例如)由 ATCC 提供,例如由 ATCC 出版的 The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage(1992)Ghera 等人(编)提供。用于定序、克隆及分子生物学的其他方面的其他基本程序和基础的理论观点也见于 Watson 等人(1992)Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY。另外,基本上任何核酸(和事实上任何经标记的核酸,无论标准或非标准与否)可为习惯或标准的,其是从各种商业来源的任何来源,诸如 Midland Certified Reagent Company(可在 World Wide Web, merc.com 上购得的 Midland, TX)、The Great American Gene Company(可在 World Wide Web, genco.com 上购得的 Ramona, CA)、ExpressGen Inc.(可在 World Wide Web, expressgen.com 上购得的 Chicago, IL)、Operon Technologies Inc.(Alameda, CA)和许多其它来源订购。

[0272] XII. 在非真核生物和真核生物中的表达

[0273] 为获得克隆 hGH 多核苷酸的高水平表达, 所属领域的技术人员通常将编码本发明的 hGH 多肽的多核苷酸亚克隆到表达载体中, 该表达载体含有指导转录的强启动子、转录/转译终止子和(如果用于编码蛋白质的核酸)用于转译起始的核糖体结合部位。适合的细菌启动子为所属领域的技术人员所知并且描述于(例如) Sambrook 等人 and Ausubel 等人中。

[0274] 用于表达本发明的 hGH 多肽的细菌表达系统在(包括但不限于)大肠杆菌、芽胞杆菌种、荧光极毛杆菌、绿脓杆菌、恶息极毛杆菌和沙门氏菌中可得到(Palva 等人, Gene22:229-235(1983); Mosbach 等人, Nature302:543-545(1983))。用于所述表达系统的试剂盒是市售的。用于哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达系统为所属领域的技术人员所知并且也是市售的。在正交 tRNA 和氨酰基 tRNA 合成酶用以表达本发明的 hGH 多肽的情况下, 用于表达的宿主细胞是基于其使用正交组分的能力而选择。示范性宿主细胞包括革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria)(包括但不限于)短小芽胞杆菌(*B. brevis*)、枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)或链霉菌属(*Streptomyces*)和革兰氏阴性细菌(Gram-negative bacteria)(大肠杆菌、荧光极毛杆菌、绿脓杆菌、恶息极毛杆菌)以及酵母和其他真核细胞。按本文中所述, 可使用包含 O-tRNA O-RS 对的细胞。

[0275] 本发明的真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供合成包含大量有效的非天然氨基酸的蛋白质的能力。一方面, 组合物视需要包括(包括但不限于)至少 10 微克、至少 50 微克、至少 75 微克、至少 100 微克、至少 200 微克、至少 250 微克、至少 500 微克、至少 1 毫克、至少 10 毫克、至少 100 毫克、至少 1 克或 1 克以上的包含非天然氨基酸的蛋白质, 或可用活体内蛋白质生产方法(本文中提供对重组蛋白质生产和纯化的详细描述)所达到的量。另一方面, 蛋白质是视需要以包括(但不限于)每升至少 10 微克的蛋白质、每升至少 50 微克的蛋白质、每升至少 75 微克的蛋白质、每升至少 100 微克的蛋白质、每升至少 200 微克的蛋白质、每升至少 250 微克的蛋白质、每升至少 500 微克的蛋白质、每升至少 1 毫克的蛋白质或每升至少 10 毫克或 10 毫克以上的蛋白质的浓度存在于包括(但不限于)细胞溶胞产物、缓冲液、医药缓冲液或其他液体悬浮液(包括(但不限于), 呈包括(但不限于)约 1nL 到约 100L 或 100L 以上之间的任何数量的体积)的组合物中。在真核细胞或非真核细胞中, 生产大量(包括(但不限于), 比通常可能用包括(但不限于)活体外转译的其他方法所生产的量更大的量)的包括至少一种非天然氨基酸的蛋白质是本发明的特征。

[0276] 本发明的真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供生物合成包含大量有效非天然氨基酸的蛋白质的能力。举例而言, 包含非天然氨基酸的蛋白质可以包括(但不限于)以下浓度的浓度在细胞提取物、细胞溶胞产物、培养基、缓冲液和/或诸如此类中生产: 至少 10 微克/升、至少 50 微克/升、至少 75 微克/升、至少 100 微克/升、至少 200 微克/升、至少 250 微克/升或至少 500 微克/升、至少 1 毫克/升、至少 2 毫克/升、至少 3 毫克/升、至少 4 毫克/升、至少 5 毫克/升、至少 6 毫克/升、至少 7 毫克/升、至少 8 毫克/升、至少 9 毫克/升、至少 10 毫克/升、至少 20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 毫克/升、1g/升、5g/升、10g/升或 10g/升以上蛋白质。

[0277] 表达系统、培养和分离

[0278] hGH 可以在包括(例如)酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞和细菌的许多适合的表达系统中表达。示范性表达系统的描述提供于下文。

[0279] 酵母

[0280] 如本文所使用,术语“酵母”包括能够表达编码 hGH 的基因的各种酵母中的任何酵母。所述酵母包括(但不限于),产子囊孢子酵母(内孢霉目(Endomycetales))、担子菌有孢子酵母(basidiosporogenous yeast)和属于半知菌(芽生菌(Blastomycetes))群组的酵母。产子囊孢子酵母分成 2 个科,即蚀精霉科(Spermophthoraceae)和酵母科(Saccharomycetaceae)。后者包含 4 个亚科,即裂殖酵母亚科(Schizosaccharomycoideae)(例如,裂殖酵母属(genus Schizosaccharomyces))、拿逊酵母亚科(Nadsonioideae)、Lipomycoideae 和 Saccharomycoideae(例如毕赤氏酵母属(genera Pichia)、克卢费氏酵母属(Kluyveromyces)和酵母菌属(Saccharomyces))。担子菌有孢子酵母包括担子菌白冬孢酵母属(genera Leucosporidium)、红冬孢酵母属(Rhodosporeidium)、锁掷酵母属(Sporidiobolus)、线黑粉菌属(Filobasidium)和香灰拟锁担菌属(Filobasidiella)。属于半知菌(芽生菌)群组的酵母分成 2 个科,即掷孢酵母科(Sporobolomycetaceae)(例如,掷孢酵母属(genera Sporobolomyces)和布勒弹孢酵母属(Bullera))和隐球酵母科(Cryptococcaceae)(例如念珠菌属(genus Candida))。

[0281] 供本发明使用的尤其受关注的是以下物种中的物种:毕赤氏酵母属、克卢费氏酵母属、酵母菌属、裂殖酵母属、汉逊酵母属(Hansenula)、球拟酵母属(Torulopsis)和念珠菌属,包括(但不限于),巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)、*P. guillermondii*、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、嘉士伯酵母(*S. carlsbergensis*)、糖化酵母(*S. diastaticus*)、道格拉斯酵母(*S. douglasii*)、科鲁维尔酵母(*S. kluyveri*)、诺本斯酵母(*S. norbensis*)、卵形酵母(*S. oviformis*)、乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)、乳糖酶酵母(*K. fragilis*)、白色念珠菌(*C. albicans*)、麦芽糖假丝酵母(*C. maltosa*)和汉森酵母(*H. polymorpha*)。

[0282] 选择用于表达 hGH 的适合酵母在所属领域的技术人员的技术水平内。在选择用于表达的酵母宿主时,适合的宿主可以包括展示具有(例如)良好分泌能力、低蛋白质分解活性和总坚固性的所述宿主。酵母通常可从包括(但不限于)以下来源的各种来源购得:Yeast Genetic Stock Center、Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) 和 American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA)。

[0283] 术语“酵母宿主”或“酵母宿主细胞”包括可用作或已经用作用于重组载体或其他转移 DNA 的接受者的酵母。术语包括已经接受重组载体或其他转移 DNA 的原始酵母宿主细胞的子代。应了解,由于意外的或有意的突变,单一亲代细胞的子代可以不必在形态学或补充到原始母体的染色体组或总 DNA 方面完全相同。足够相似于有待通过诸如编码 hGH 的核苷酸序列存在的相关性质表征的母体的亲代细胞的子代包括在所述定义所指的子代中。

[0284] 已经开发包括染色体外复制子或合并载体的表达和转形载体,用于转形到许多酵母宿主中。举例而言,已经开发用于酿酒酵母的表达载体(Sikorski 等人, GENETICS(1989)122:19; Ito 等人, J. BACTERIOL. (1983)153:163; Hinnen 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA(1978)75:1929);用于白色念珠菌的表达载体(Kurtz 等人, MOL. CELL. BIOL. (1986)6:142);用于麦芽糖假丝酵母的表达载体(Kunze 等人, J. BASIC MICROBIOL. (1985)25:141);用于汉森酵母的表达载体(Gleeson 等人, J. GEN. MICROBIOL. (1986)132:3459; Roggenkamp 等人, MOL. GENETICS AND GENOMICS(1986)202:302);

用于乳糖酶酵母的表达载体(Das 等人, J. BACTERIOL. (1984)158:1165);用于乳酸克鲁维酵母的表达载体(De Louvencourt 等人, J. BACTERIOL. (1983)154:737;Van den Berg 等人, BIOTECHNOLOGY(NY) (1990)8:135);用于 *P. guillerimondii* 的表达载体(Kunze 等人, J. BASIC MICROBIOL. (1985)25:141);用于巴斯德毕赤酵母的表达载体(美国专利第 5,324,639;4,929,555;和 4,837,148 号;Cregg 等人, MOL. CELL. BIOL. (1985)5:3376);用于粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的表达载体(Beach 等人, NATURE(1982)300:706);和用于解脂耶罗威亚酵母(*Y. lipolytica*);构巢曲霉(*A. nidulans*)的表达载体(Ballance 等人, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983)112:284-89;Tilburn 等人, GENE(1983)26:205-221;和 Yelton 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA(1984)81:1470-74);用于黑霉菌(*A. niger*)的表达载体(Kelly 和 Hynes, EMBO J. (1985)4:475-479);用于里氏木霉(*T. reesia*)的表达载体(EP0244234);和用于诸如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolyposcladium*)的丝状真菌的表达载体(WO 91/00357),各个参考文献是以引用的方式并入本文。

[0285] 酵母载体的控制序列为所属领域的技术人员所知并且包括(但不限于),来自诸如以下基因的基因的启动子区域:醇脱氢酶(ADH)(EP 0284044);烯醇酶;葡糖激酶;葡糖-6-磷酸异构酶;甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAP 或 GAPDH);己糖激酶;磷酸果糖激酶;3-磷酸甘油酸变位酶;和丙酮酸激酶(PyK)(EP 0329203)。编码酸性磷酸酶的酵母 PH05 基因也可以提供有效的启动子序列(Miyanochara 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA(1983)80:1)。供酵母宿主使用的其他适合的启动子序列可以包括 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman 等人, J. BIOL. CHEM. (1980)255:12073);和其他糖解酶,诸如丙酮酸脱羧酶、磷酸丙糖异构酶和磷酸葡糖异构酶(Holland 等人, Biochemistry(1978)17:4900;Hess 等人, J. Adv. ENZYME REG. (1969)7:149)的启动子。具有通过生长条件来控制的转录的额外的优点的可诱导酵母启动子可以包括醇脱氢酶 2;异细胞色素 C;酸性磷酸酶;金属硫蛋白;甘油醛-3-磷酸脱氢酶;与氮代谢相关的降解酶;和担负麦芽糖和半乳糖应用的酶的启动子区域。适用于酵母表达的适合的载体和启动子另外描述于 EP0073657 中。

[0286] 酵母强化子也可以与酵母启动子一起使用。另外,合成启动子也可以起酵母启动子的作用。举例而言,酵母启动子的上游活化序列(UAS)可以与另一酵母启动子的转录活化区域接合,产生合成杂交启动子。所述杂交启动子的实例包括与 GAP 转录活化区域连接的 ADH 调节序列。参见美国专利第 4,880,734 和 4,876,197 号。杂交启动子的其他实例所包括的启动子由与诸如 GAP 或 PyK 的糖解酶基因的转录活化区域组合的 ADH2、GAL4、GAL10 或 PH05 基因的调节序列组成。参见 EP0164556。此外,酵母启动子可以包括具有结合酵母 RNA 聚合酶并且引发转录的能力的非酵母源天然存在的启动子。

[0287] 可以包含部分酵母表达载体的其他控制元件包括(例如)来自 GAPDH 或烯醇酶基因的终止子(Holland 等人, J. BIOL. CHEM. (1981)256:1385)。另外,来自 2 μ 质粒源的复制源适用于酵母。适用于酵母的适合的选择基因是存在于酵母质粒中的 *trp1* 基因。参见, Tschumper 等人, GENE(1980)10:157;Kingsman 等人, GENE(1979)7:141。*trp1* 基因提供为没有能力在色氨酸中生长的酵母突变菌株的选择标记物。同样地,缺 *Leu2* 的酵母菌株(ATCC20,622 或 38,626)是通过带有 *Leu2* 基因的已知质粒补充。

[0288] 将外源性 DNA 引入酵母宿主中的方法为所属领域的技术人员所知,并且通常包括

(但不限于)用碱性阳离子处理的球形体或完整酵母宿主细胞的转形。举例而言,酵母的转形可根据 Hsiao 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 和 Van Solingen 等人, J. BACT. (1977) 130:946 中所述的方法执行。然而,诸如通过核注射、电穿孔或原生质体融合的用于将 DNA 引入细胞中的其他方法,也可以按 SAMBROOK 等人, MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001) 中的一般描述使用。然后,可以使用为所属领域的技术人员所知的标准技术培养酵母宿主细胞。

[0289] 用于在酵母宿主细胞中表达异源蛋白质的其他方法为所属领域的技术人员所知。通常参见,美国专利申请案第 20020055169 号、美国专利第 6,361,969 ; 6,312,923 ; 6,183,985 ; 6,083,723 ; 6,017,731 ; 5,674,706 ; 5,629,203 ; 5,602,034 ; 和 5,089,398 号 ; 美国再 审 专 利 第 RE37,343 和 RE35,749 号 ; PCT 公 开 专 利 申 请 案 WO 99/078621 ; WO 98/37208 ; 和 WO 98/26080 ; 欧 洲 专 利 申 请 案 EP 0946736 ; EP 0732403 ; EP0480480 ; WO 90/10277 ; EP 0340986 ; EP 0329203 ; EP 0324274 ; 和 EP 0164556, 所述专利是以引用的方式并入本文。又参见 Gellissen 等人, ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2) : 79-93 ; Romanos 等 人 , YEAST (1992) 8(6) : 423-488 ; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7, 各个参考文献是以引用的方式并入本文。

[0290] 酵母宿主菌株在扩增阶段,使用为所属领域的技术人员所知的标准进料分批发酵方法,在发酵罐中生长。发酵方法可以由于具体的酵母宿主的碳利用路径或表达控制的模式的差异而修改。举例而言,酵母菌属酵母宿主的发酵可能需要单一葡萄糖进料、复合氮源(例如酪蛋白水解物)和多次维生素增补。相反,甲基营养型酵母巴斯德毕赤酵母可能需要甘油、甲醇和痕量矿物质进料,但仅需要简单的铵(氮)盐以达到最佳生长和表达。参见(例如),美国专利第 5,324,639 号 ; Elliott 等人, J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95 ; 和 Fieschko 等人, BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113。

[0291] 然而,所述发酵方法可以具有某些独立于所用酵母宿主菌株的共同特征。举例而言,通常为碳的生长限制营养物可在扩增阶段期间被添加到发酵罐中以容许最大生长。另外,发酵方法通常使用经设计以含有足够量的碳、氮、基本盐、磷和其他微量养分(维生素、痕量矿物质和盐等)的发酵培养基。适于供毕赤氏酵母属使用的发酵培养基的实例描述于美国专利第 5,324,639 和 5,231,178 号中,所述专利是以引用的方式并入本文。

[0292] 经杆状病毒感染的昆虫细胞

[0293] 术语“昆虫宿主”或“昆虫宿主细胞”指的是可用作或已经作用于重组载体或其他转移 DNA 的接受者的昆虫。术语包括已经被转染的原始昆虫宿主细胞的子代。应了解,由于意外的或有意的突变,单一亲代细胞的子代可以不必在形态学或补充到原始母体的染色体组或总 DNA 方面完全相同。足够相似于有待通过诸如编码 hGH 的核苷酸序列存在的相关性质表征的母体的亲代细胞的子代包括在所述定义所指的子代中。

[0294] 用于表达 hGH 的适合昆虫细胞的选择为所属领域的技术人员所知。若干昆虫物种充分描述于所属领域中并且是市售的,包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)。在选择用于表达的昆虫宿主时,适合的宿主可以包括展示具有(尤其)良好分泌能力、低蛋白质分解活性和总坚固性的所述宿主。昆虫通常可从包括(但不限

于)以下来源的各种来源购得 :Insect Genetic Stock Center、Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley;CA); 和 American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA)。

[0295] 通常,经杆状病毒感染的昆虫表达系统的组分包括转移载体,通常为细菌质粒,其含有杆状病毒基因组的片段和用于插入待表达的异源基因的适当的限制性部位;具有与转移载体中的杆状病毒特异性片段同源的序列的野生型杆状病毒(其允许异源基因在杆状病毒基因组中的同源重组);和适当的昆虫宿主细胞和生长培养基。用于建构载体、转染细胞、挑选溶菌斑、使细胞在培养物中生长,诸如此类的材料、方法和技术在所属领域中为已知的并且描述所述技术的手册是可用的。

[0296] 将异源基因插入转移载体中后,载体和野生型病毒基因组被转染到载体和病毒基因组在其中重组的昆虫宿主细胞中。表达经包装的重组病毒并且识别和纯化重组溶菌斑。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法,是来自(例如)Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)的试剂盒形式市售。所述技术通常为所属领域的技术人员所知并且全部描述于以引用的方式并入本文的 SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555(1987)中。又参见, RICHARDSON, 39METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY:BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS(1995);AUSUBEL 等人, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY16. 9-16. 11(1994);KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM:A LABORATORY GUIDE(1992); 和, O’REILLY 等人, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS:A LABORATORY MANUAL(1992)。

[0297] 实际上,使用杆状病毒/昆虫细胞表达系统的各种异源蛋白质的生产为所属领域的技术人员所知。参见(例如),美国专利第 6, 368, 825 ;6, 342, 216 ;6, 338, 846 ;6, 261, 805 ;6, 245, 528, 6, 225, 060 ;6, 183, 987 ;6, 168, 932 ;6, 126, 944 ;6, 096, 304 ;6, 013, 433 ;5, 965, 393 ;5, 939, 285 ;5, 891, 676 ;5, 871, 986 ;5, 861, 279 ;5, 858, 368 ;5, 843, 733 ;5, 762, 939 ;5, 753, 220 ;5, 605, 827 ;5, 583, 023 ;5, 571, 709 ;5, 516, 657 ;5, 290, 686 号 ;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, 所述专利以引用的方式并入本文。

[0298] 适用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的载体在所属领域中为已知的并且包括(例如)由杆状病毒苜蓿丫纹夜蛾(Autographacalifornica)核型多角体病毒(AcNPV)得到的昆虫表达和转移载体,其为辅助病毒(helper)独立性、病毒表达载体。由所述系统得到的病毒表达载体通常使用强病毒性多角体蛋白基因启动子来驱动异源基因的表达。通常参见, O’Reilly 等人, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS:A LABORATORY MANUAL(1992)。

[0299] 在将外来基因插入杆状病毒基因组中之前,通常将包含启动子、引子(如果需要)、所关注的编码序列和转录终止序列的上述组分装配成中间错位构筑体(转移载体)。常将中间错位构筑体维持在诸如能够稳定维持在诸如细菌的宿主中的额外染色体元件(例如质粒)的复制子中。复制子将会具有复制系统,因此容许其被维持在用于克隆和扩增的适合的宿主中。更明确地说,质粒可以含有多角体蛋白多聚腺苷酸化信号(Miller, Ann. Rev.

Microbiol. (1988)42:177) 和原核抗氨苄青霉素(ampicillin)(amp)基因和用于在大肠杆菌中选择和繁殖的复制源。

[0300] 用于将外来基因引入 AcNPV 中的一种常用转移载体是 pAc373。也已经设计了为所属领域的技术人员所知的许多其他载体,包括(例如) pVL985,其将多角体蛋白起始密码子从 ATG 改变成 ATT,并且在 ATT 下游的 32 个碱基对处引入 BamHI 克隆部位。参见, Luckow 和 Summers, VIROLOGY 170:31 (1989)。其他市售载体包括(例如) PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。

[0301] 在插入异源基因后,将转移载体和野生型杆状病毒基因组共转染到昆虫细胞宿主中。用于将异源 DNA 引入杆状病毒病毒中的所要求的部位中的方法在所属领域中为已知的。参见, SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith 等人, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 170:31。举例而言,插入可为通过同源复式转线轨道重组,插入到诸如多角体蛋白基因的基因中;插入也可为插入到被工程化成所要求的杆状病毒基因的限制性内切酶部位中。参见, Miller 等人, BioESSAYS (1989) 11 (4):91。

[0302] 转染可以通过电穿孔完成。参见, TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann 和 King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501。或者,脂质体可以用重组表达载体和杆状病毒转染昆虫细胞。参见(例如), Liebman 等人, BIOTECHNIQUES (1999) 26 (1):36; Graves 等人, BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura 等人, J. BIOL. CHEM. (1998) 273 (22):13570; Schmidt 等人, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert 等人, NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS 等人, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai 等人, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin 等人, NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost 等人, GENE (1997) 190:139; Jakobsson 等人, J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles 等人, J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (37):22376; Reverey 等人, J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (39):23607-10; Stanley 等人, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk 等人, J. VIROL. (1994) 68 (2):766; 和 Peng 等人, BIOTECHNIQUES (1993) 14 (2):274。市售脂质体包括(例如), **Cellfectin®** 和 **Lipofectin®** (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA)。另外,可以使用磷酸钙转染。参见, TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18 (19):5667; 和 Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501。

[0303] 杆状病毒表达载体通常含有杆状病毒启动子。杆状病毒启动子是指任何能够结合杆状病毒 RNA 聚合酶并且引发将编码序列(例如结构基因)下游(3')转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子将具有通常位于最接近于编码序列的 5' 末端的转录起始区域。所述转录起始区域通常包括 RNA 聚合酶结合部位和转录起始部位。杆状病毒启动子也可以具有称为强化子的第二域,如果存在,那么其通常远离结构基因。此外,表达可为调节性或为构成性的。

[0304] 在感染循环的后期充分转录的结构基因提供尤其有效的启动子序列。实例包括由编码病毒多面体蛋白质的基因(FRIESEN 等人, The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP0127839 和 0155476)和编码 p10 蛋白质的基因(Vlak 等人, J. GEN. VIROL. (1988) 69:765)得到的序列。

[0305] 将新形成的杆状病毒表达载体包装到感染重组杆状病毒中并且随后,可

以通过为所属领域的技术人员所知的技术纯化已生长的溶菌斑。参见, Miller 等人, BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555(1987)。

[0306] 已经开发用于感染到若干昆虫细胞中的重组杆状病毒表达载体。举例而言, 已经开发尤其用于埃及伊蚊(ATCC 第 CCL-125 号)、家蚕(ATCC 第 CRL-8910 号)、果蝇(ATCC 第 1963 号)、草地夜蛾和粉纹夜蛾的重组杆状病毒。参见, Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell 等人, J. VIROL. (1985) 56:153; Smith 等人, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156。通常参见, Fraser 等人, IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225。更明确地说, 用于杆状病毒表达载体系统的细胞系通常包括(但不限于) Sf9 (草地夜蛾) (ATCC 第 CRL-1711 号)、Sf21 (草地夜蛾) (Invitrogen Corp., Cat. 第 11497-013 号 (Carlsbad, CA))、Tri-368 (粉纹夜蛾) 和 High-Five™BTI-TN-5B1-4 (粉纹夜蛾)。

[0307] 用于在杆状病毒 / 表达中直接表达和融合表达异源多肽的细胞和培养基是市售的, 并且细胞培养技术是通常为所属领域的技术人员所知。

[0308] 大肠杆菌、假单胞菌种和其他原核生物

[0309] 细菌表达技术为所属领域的技术人员所知。多种载体可得到用于细菌宿主中。载体可以是单拷贝或低或高多拷贝载体。载体可以用于克隆和 / 或表达。鉴于关于载体、许多载体的工业效用和甚至描述载体和其限制图和特征的手册的丰富的文献, 在此不需要广泛讨论。如所熟知的, 载体通常涉及允许选择的标记物, 所述标记物可以提供细胞毒素剂抵抗性、原营养或免疫性。常常, 存在提供不同特征的多个标记物。

[0310] 细菌启动子是指任何能够结合细菌 RNA 聚合酶和引发将编码序列(例如结构基因)下游(3')转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子将具有通常位于最接近于编码序列的 5' 末端的转录起始区域。所述转录起始区域通常包括 RNA 聚合酶结合部位和转录起始部位。细菌的启动子也可以具有称为操纵子的第二域, 其可以重叠 RNA 合成开始处的邻近 RNA 聚合酶结合部位。操纵子容许负性调节(可诱导的)转录, 因为基因阻遏蛋白可以结合操纵子并且进而抑制特定基因的转录。构成性表达可以在不存在诸如操纵子的负性调节元件时发生。另外, 正性调节可以通过基因活化子蛋白结合序列达成, 如果存在, 那么其通常最接近于 RNA 聚合酶结合序列(5')。基因活化子蛋白质的实例是代谢物活化蛋白(CAP), 其帮助引发 lac 操纵子在大肠埃希氏菌(E. coli)中的转录 [Raibaud 等人, ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]。经调节的表达因此可以是正性的或负性的, 进而增强或者减少转录。

[0311] 编码代谢路径酶的序列提供尤其有效的启动子序列。实例包括由诸如半乳糖、乳糖(lac) [Chang 等人, NATURE (1977) 198:1056] 和麦芽糖的糖代谢酶得到的启动子序列。其他实例包括由诸如色氨酸(trp)的生物合成酶得到的启动子序列 [Goeddel 等人, Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton 等人, NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; 美国专利第 4, 738, 921 号; 欧洲专利公开案第 036776 和 121775 号, 其是以引用的方式并入本文]。g-内酰胺酶(bla)启动子系统 [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (I. Gresser 编)], 噬菌体 λ PL [Shimatake 等人, NATURE (1981) 292:128] 和 T5 [美国专利第 4, 689, 406 号] 启动子系统也提供有效的启动子序列。本发明的优选方法利用诸如 T7 启动子的强启动子来诱导高水平的 hGH。所述载体的实例为所属领域的技术人员所知并且包括来自 Novagen 的 pET29 系列和描述于

W099/05297 中的 pPOP 载体。所述表达系统在宿主中产生高水平的 hGH, 而不会危害宿主细胞生存性或生长参数。pET19 (Novagen) 是在所属领域中已知的另一种载体。

[0312] 另外, 非天然存在的合成启动子也起细菌启动子的作用。举例而言, 一个细菌启动子或噬菌体启动子的转录活化序列可以与另一个细菌启动子或噬菌体启动子的操纵子序列接合, 产生合成杂交启动子 [美国专利第 4, 551, 433 号, 所述专利是以引用的方式并入本文]。举例而言, tac 启动子是通过 lac 阻遏物调节的由 trp 启动子和 lac 操纵子序列组成的杂交 trp-lac 启动子 [Amann 等人, GENE (1983) 25:167; de Boer 等人, PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]。此外, 细菌启动子可包括具有结合细菌 RNA 聚合酶并且引发转录的能力的非细菌性源的天然存在的启动子。非细菌性源的天然存在的启动子也可与相容的 RNA 聚合酶偶合以产生一些基因在原核生物中的高水平表达。细菌磷酸酶 (bacteriophage) T7RNA 聚合酶 / 启动子系统是经偶合的启动子系统的实例 [Studier 等人, J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor 等人, Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]。另外, 杂交启动子也可由噬菌体启动子和大肠杆菌操纵子区域组成 (欧洲专利公开案第 267851 号)。

[0313] 除功能启动子序列之外, 有效的核糖体结合部位也适用于外来基因在原核生物中的表达。在大肠杆菌中, 核糖体结合部位称为 Shine-Dalgarno (SD) 序列并且包括起始密码子 (ATG) 和定位于起始密码子的 3-11 个核苷酸上游的长度为 3-9 个核苷酸的序列 [Shine 等人, NATURE (1975) 254:34]。认为 SD 序列通过 SD 序列与大肠杆菌 16SrRNA 的 3' 末端之间的碱基的配对, 而促进 mRNA 与核糖体的结合 [Steitz 等人 "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]。用弱核糖体结合部位表达真核基因和原核基因 [Sambrook 等人 "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]。

[0314] 术语“细菌宿主”或“细菌宿主细胞”指的是可用作或已经用作用于重组载体或其他转移 DNA 的接受者的细菌。术语包括已经转染的原始细菌宿主细胞的子代。应了解, 由于意外的或有意的突变, 单一亲代细胞的子代可以不必在形态学或补充于原始母体的染色体组或总 DNA 方面完全相同。足够相似于有待通过诸如编码 hGH 的核苷酸序列存在的相关性质表征的母体的亲代细胞的子代包括在所述定义所指的子代中。

[0315] 用于表达 hGH 的适合宿主细菌的选择为所属领域的技术人员所知。在选择用于表达的细菌宿主时, 适合的宿主可以包括展示具有 (尤其) 良好内含体形成能力、低蛋白质分解活性和总坚固性的所述宿主。细菌宿主通常可从包括 (但不限于) 以下来源的各种来源购得: Bacterial Genetic Stock Center、Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); 和 American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA)。工业发酵 / 医药发酵通常使用由 K 菌株 (例如 W3110) 得到的细菌或由 B 菌株 (例如 BL21) 得到的细菌。所述菌株是尤其有效的, 因为其生长参数是十分熟知的和稳固的。另外, 所述菌株是非病原性的, 其在商业上对安全性和环境原因为重要的。在一个实施例中, 大肠杆菌宿主是包括 (但不限于) DH10B (fis) 的 DH10B 的菌株。适合的大肠杆菌宿主的其他实例包括 (但不限于) BL21、DH10B 或其衍生物的菌株。在另一个实施例中, 大肠杆菌宿主是 W3110 的菌株。重组宿主细胞菌株可以通过遗传突变修饰以优化所要求的特征。举例而言, 宿主细胞菌株可以经遗传修饰以调节诸如涉及碳源代谢、氨基

酸代谢或蛋白酶生产的所述基因的代谢性重要基因的表达。所述基因可以经突变以降低、增加、剔除或敲入在所要求的宿主菌株中的表达。举例而言,菌株 W3110 可以经修饰以实现在包括(但不限于)araB 基因的一种或一种以上涉及阿拉伯糖(arabinose)的新陈代谢的基因中的遗传突变。举例而言,菌株可以经修饰以实现遗传突变或剔除其他基因。突变或剔除基因的方法为所属领域的技术人员所知。菌株也可以经突变以调节内源蛋白酶活性以增加全长 hGH 的生产和 / 或最小化对将外生化学抑制剂添加到蛋白酶的需要。其他宿主细胞菌株包括(但不限于) BL21。在本发明的方法的另一个实施例中,大肠杆菌宿主是蛋白酶负菌株,包括(但不限于) OMP⁻ 和 LON⁻。宿主细胞菌株可以是假单胞菌种,包括(但不限于) 荧光极毛杆菌、绿脓杆菌和恶息极毛杆菌。已知命名为菌株 MB101 的荧光极毛杆菌生物变种 1 适用于重组生产并且可用于治疗性蛋白质生产工艺。假单胞菌表达系统的实例包括可以宿主菌株(可在 World Wide Web, dow.com 上购得的 Midland, MI) 购自 Dow Chemical Company 的系统。以引用的方式并入本文的美国专利第 4,755,465 和 4,859,600 号,描述假单胞菌株作为用于 hGH 生产的宿主细胞的用途。

[0316] 一旦重组宿主细胞菌株已经建立(也就是说,表达构筑体已经被引入宿主细胞中并且具有正确表达构筑体的宿主细胞被分离),就在适于生产 hGH 的条件下培养重组宿主细胞。如所属领域的技术人员显而易见的,培养重组宿主细胞菌株的方法将视所利用的表达构筑体的性质和宿主细胞的同一性而定。通常使用为所属领域的技术人员所知的方法培养重组宿主菌株。重组宿主细胞通常是在含有碳、氮和无机盐的可吸收源,和(视需要)含有维生素、氨基酸、生长因子和其他为所属领域的技术人员所知的蛋白质培养补充物的液体培养基中培养。用于最佳生长的培养基或进料组合物和 / 或养分需要量可以由于不同重组宿主细胞和 / 或由于更小相对更大规模的制备而不同。举例而言,所需要的痕量金属或维生素可以随生长条件改变和 / 或使用替代性宿主细胞而改变。为优化 hGH 多肽的生产,适合于诱导的条件可以视所使用的重组宿主细胞、表达构筑体和 / 或对宿主细胞进行的诸如突变的修饰而改变,包括(但不限于)用于诱导的阿拉伯糖水平的改变。发酵中的阿拉伯糖水平可以在约 0.0001% 到约 0.1% 之间,包括(但不限于),0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.0095%、0.009%、0.0085%、0.008%、0.0075%、0.007%、0.0065%、0.006%、0.0055%、0.005%、0.0045%、0.004%、0.0035%、0.003%、0.0025%、0.002%、0.0015%、0.001%、0.00095%、0.0009%、0.00085%、0.0008%、0.00075%、0.0007%、0.00065%、0.0006%、0.00055%、0.0005%、0.00045%、0.0004%、0.00035%、0.0003%、0.00025%、0.0002%、0.00015%、0.0001%。在一些实施例中,阿拉伯糖水平在 0.0005% 与 0.05% 之间。在一些实施例中,阿拉伯糖水平在 0.001% 到 0.02% 之间。也可以执行改变以提供更高细胞收集密度;可以执行包括(但不限于)添加第二进料的步骤。用于培养宿主细胞的液体培养基可以视需要含有防止不良微生物生长的抗生素或抗真菌剂和 / 或包括(但不限于)抗生素的化合物以选择含有表达载体的宿主细胞。重组宿主细胞可以分批或以连续形式培养,同时细胞收集(在变体 hGH 细胞内积聚的情况下)或培养物上清液的收集呈分批或连续形式。为在原核宿主细胞中进行生产,分批培养和细胞收集为优选的。

[0317] 可以执行调节抑制、连续抑制或诱导抑制。对所属领域的技术人员显而易见的是,非天然编码的氨基酸可在细胞生长期间的多个不同时间,被添加到细胞培养物中,或可以在细胞生长期间连续存在。添加一个或一个以上用于并入 hGH 中的非天然编码的氨基酸可

在通过宿主细胞诱导 hGH 表达之前,在诱导时或在诱导之后发生。在一个实施例中,非天然编码的氨基酸是在诱导 hGH 表达之前添加。在一个实施例中,非天然编码的氨基酸是在诱导前大致 1 小时添加。在另一个实施例中,非天然编码的氨基酸是在细胞生长期间存在。

[0318] 表达 hGH 的重组宿主细胞,无论是是否为可溶性的、经分泌的或不溶的,都可以多种的培养体积来生长。本发明的方法服从小实验室规模培养体积以及大规模工业规模体积。对所属领域的技术人员显而易见的是,本文中揭示的本发明的方法是可升高到较大培养体积的。大规模工业培养体积可以具有广泛范围,例如各自从 1 升或 1 升以上到数百升、数千升、5000 升、10,000 升、20,000 升、30,000 升、40,000 升、50,000 升,高达 100,000 升或 100,000 升以上。在生产大规模体积时,对方法的一些步骤的修改可以是必要的并且对所属领域的技术人员是显而易见的。

[0319] 本发明的 hGH 通常是在表达于重组系统中后被纯化。hGH 可以通过所属领域中已知的各种方法从宿主细胞或培养基纯化。产生于细菌宿主细胞中的 hGH 可以是难溶的或不溶的(呈内含体形式)。在不溶蛋白质的情况下,蛋白质可以通过离心从宿主细胞溶胞产物收集并且可以另外接着进行细胞的匀化作用。在难溶蛋白质的情况下,可以添加包括(但不限于)聚乙烯亚胺(PEI)的化合物以诱导部分可溶的蛋白质的沉淀。然后,所沉淀的蛋白质可通过离心方便地收集。可以使用为所属领域的技术人员所知的各种方法,将重组宿主细胞碎裂或均质化以从细胞内释放内含体。可以使用包括(但不限于)酶促细胞碎裂、超声处理、杜恩斯(dounce)匀化作用或高压释放碎裂的熟知技术,执行宿主细胞碎裂或匀化作用。在本发明的方法的一个实施例中,高压释放技术用以使大肠杆菌宿主细胞碎裂以释放 hGH 的内含体。

[0320] 然后,可以使用所属领域中已知的多种适合的增溶剂的任何一种,使不溶的或沉淀的 hGH 溶解。hGH 可以与尿素或盐酸胍一起溶解。应使所溶解的 hGH 的体积最小化以便可以使用方便易管理的批量大小来生产大批量。所述因素在大规模工业设定中可以是重要的,其中重组宿主可以体积为呈数千升的批量生长。另外,当以大规模工业设定来制造 hGH 时,尤其用于人类医药用途时,如果可能的话,那么应避免可损坏机器和容器,或蛋白质产物本身的不佳的化学品。在本发明的方法中已经展示,更温和的变性剂尿素可用以代替更苛刻的变性剂盐酸胍而使 hGH 内含体溶解。尿素的使用会显著降低对在 hGH 的制造和纯化工艺中所利用的不锈钢设备的损坏的风险,同时有效地使 hGH 内含体溶解。

[0321] 在可溶性 hGH 蛋白质的情况下,可以将 hGH 分泌到细胞周质间隙中或分泌到培养基中。另外,可溶性 hGH 可以存在于宿主细胞的细胞质中。在执行纯化步骤之前,可能需要浓缩可溶性 hGH。为所属领域的技术人员所知的标准技术可用以从(例如)细胞溶胞产物或培养基浓缩可溶性 hGH。另外,为所属领域的技术人员所知的标准技术可用以使宿主细胞碎裂并且从宿主细胞的细胞质或细胞周质间隙释放可溶性 hGH。

[0322] 当作为融合蛋白质生产 hGH 时,可以除去融合序列。融合序列的除去可以通过酶促裂解或化学裂解完成。融合序列的酶促除去可以使用为所属领域的技术人员所知的方法完成。用于除去融合序列的酶的选择将通过融合的同源性而确定,并且如将对所属领域的技术人员显而易见的,反应条件将通过酶的选择而规定。化学裂解可以使用为所属领域的技术人员所知的,包括(但不限于)溴化氰、TEV 蛋白酶和其他试剂的试剂完成。经裂解的 hGH 可以通过为所属领域的技术人员所知的方法从经裂解的融合序列纯化。如将对所属领

域的技术人员显而易见的,所述方法将通过融合序列和 hGH 的同一性和性质而确定。用于纯化的方法可以包括(但不限于)空间排阻色谱法、疏水性相互作用色谱法、离子交换色谱法或透析或其任何组合。

[0323] 也可以纯化 hGH 以从蛋白质溶液除去 DNA。DNA 可以通过诸如沉淀或离子交换色谱法的所属领域中已知的任何适合的方法除去,也可以通过用诸如(但不限于)硫酸鱼精蛋白的核酸沉淀剂产生沉淀而除去。可以使用包括(但不限于)离心或过滤的标准的熟知方法,从所沉淀的 DNA 分离 hGH。宿主核酸分子的除去是在其中 hGH 待用以治疗人类的设定中的重要因素,并且本发明的方法将宿主细胞 DNA 降低到医药学上可接受的水平。

[0324] 包括(但不限于)发酵罐、摇瓶、流态化床生物反应器、中空纤维生物反应器、转瓶培养系统和搅拌槽生物反应器系统的小规模发酵或大规模发酵的方法也可用于蛋白质表达。所述方法的每一种方法可以分批方法、进料-分批方法或连续模式方法来执行。

[0325] 本发明的人类 hGH 多肽可通常使用所属领域中的方法标准回收。举例而言,培养基或细胞溶胞产物可经离心或过滤以除去细胞残骸。可以将上清液浓缩或稀释到所要求的体积或透滤到适合的缓冲液中以调节剂用于进一步纯化。hGH 多肽的纯化可以包括从完整形式分离 hGH 多肽变体的脱去酰氨基的形式和经修剪的形式。

[0326] 以下示范性程序中的任何程序可用于纯化本发明的 hGH 多肽:亲和色谱法;阴离子或阳离子交换色谱法(使用包括(但不限于)DEAE SEPHAROSE);硅石色谱法;高效液相色谱法(HPLC);逆相 HPLC;凝胶过滤(使用包括(但不限于)SEPHADEX G-75);疏水性相互作用色谱法;空间排阻色谱法;金属螯合色谱法;超滤/透滤法;乙醇沉淀;硫酸铵沉淀;色谱聚焦;置换色谱法;电泳程序(包括(但不限于)制备性等电聚焦)、差异可溶性(包括(但不限于)硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取法。

[0327] 本发明的蛋白质,包括(但不限于)包含非天然氨基酸的蛋白质、包含非天然氨基酸的蛋白质的抗体、包含非天然氨基酸的蛋白质的结合搭配物等等,可根据所属领域的技术人员所知的和所属领域的技术人员使用的标准程序,部分地或大体上纯化达到均质性。因此,本发明的多肽可通过包括(但不限于),硫酸铵或乙醇沉淀、酸或碱提取法、柱色谱法、亲和柱色谱法、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水性相互作用色谱法、羟磷灰石色谱法、外源凝集素色谱法、凝胶电泳,诸如此类的为所属领域的技术人员所知的各种方法中的任何方法加以回收和纯化。可按需要在制造正确折叠的成熟蛋白质时,使用蛋白质再折叠步骤。高效液相色谱法(HPLC)、亲和色谱法或其他适合的方法可用于其中要求高纯度的最终纯化步骤。在一个实施例中,经制造以抵抗非天然氨基酸(或包含非天然氨基酸的蛋白质)的抗体可以用作纯化试剂,包括(但不限于),包含一个或一个以上非天然氨基酸的蛋白质的基于亲和力的纯化的纯化试剂。一旦按需要被部分地纯化或达到均质性,多肽就视需要用于多种的功用,包括(但不限于)作为检定组分、治疗剂、预防剂、诊断剂、研究试剂和/或作为抗体生产的免疫原。

[0328] 除本文注明的其他参考文献之外,各种纯化/蛋白质折叠法为所属领域的技术人员所知,包括(但不限于)以下参考文献中描述的方法: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 等人 (1996)

Protein Methods, 第二版 Wiley-Liss, NY ;Walker, (1996)The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal, (1990)Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England ; Harris 和 Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England ;Scopes, (1993)Protein Purification: Principles and Practice 第三版 Springer Verlag, NY ;Janson 和 Ryden, (1998)Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, 第二版 Wiley-VCH, NY ;和 Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ ;和其中引用的参考文献。

[0329] 在真核宿主细胞或非真核宿主细胞中,产生所关注的具有非天然氨基酸的蛋白质或多肽的一个优点是,蛋白质或多肽通常被折叠成其天然构象。然而,在本发明的某些实施例中,所属领域的技术人员将认识到,在合成、表达和 / 或纯化之后,蛋白质可拥有不同于相关多肽的所要求的构象的构象。在本发明的一个方面中,所表达的蛋白质视需要被变性并且随后被复性。所述处理是利用所属领域中已知的方法完成,包括(但不限于)通过将伴侣素添加到所关注的蛋白质或多肽,通过使蛋白质溶解在诸如胍 HCl 的离液剂中,利用蛋白质二硫化物异构酶等来完成。

[0330] 一般而言,偶而需要使所表达的多肽变性和还原并且随后使多肽再折叠成优选构象。举例而言,可将胍、尿素、DTT、DTE 和 / 或伴侣素添加到所关注的转译产物。使蛋白质还原、变性和复性的方法为所属领域的技术人员所知(参见,上述参考文献,和 Debinski 等人 (1993) J. Biol. Chem., 268:14065-14070 ;Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4:581-585 ;和 Buchner 等人, (1992) Anal. Biochem., 205:263-270)。举例而言, Debinski 等人描述内含体蛋白质在胍 -DTE 中的变性和还原。蛋白质可在含有包括(但不限于)氧化型谷胱甘肽和 L-精氨酸的氧化还原性缓冲液中再折叠。可使再折叠试剂流动或否则移动以与一种或一种以上多肽或其他表达产物接触,或反之亦然。

[0331] 在原核生产 hGH 的情况下,因此产生的 hGH 可为错误折叠的并且因此缺乏生物活性或具有降低的生物活性。蛋白质的生物活性可以通过“再折叠”而恢复。一般而言,错误折叠的 hGH 是通过使用(例如)一种或一种以上离液剂(例如尿素和 / 或胍)和能够还原二硫键的还原剂(例如二硫苏糖醇、DTT 或 2-巯基乙醇、2-ME),使多肽链溶解(其中 hGH 也是不溶的)、解折叠和还原而再折叠。然后,在中等浓度的离液剂下,添加氧化剂(例如氧、胱氨酸或胱胺),其可再形成二硫键。hGH 可以使用所属领域中已知的标准方法再折叠,诸如美国专利第 4,511,502、4,511,503 和 4,512,922 号中的所述方法。

[0332] 再折叠后,可以进一步纯化 hGH。hGH 的纯化可以使用为所属领域的技术人员所知的各种技术,包括疏水性相互作用色谱法、空间排阻色谱法、离子交换色谱、逆相高效液相色谱法、亲和色谱法,诸如此类或其任何组合而完成。额外的纯化也可以包括干燥或沉淀经纯化的蛋白质的步骤。

[0333] 纯化之后,hGH 可以通过包括(但不限于)超滤、透滤法和透析的所属领域中已知的各种方法中的任何方法被交换到不同的缓冲液中和 / 或被浓缩。提供为经单一纯化的蛋白质的 hGH 可以经受聚集和沉淀。缓冲液更换或浓缩多肽的多种材料为所属领域的技术人员所知。

[0334] 经纯化的 hGH 可以是至少 90% 纯的(按通过逆相高效液相色谱法,即 RP-HPLC 或十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,即 SDS-PAGE 所测量)或至少 95% 纯的,或至少 98% 纯的,或至少 99% 或 99% 以上纯的。不管 hGH 的纯度的确切数值,对用作医药产品或用于诸如与诸如 PEG 的水溶性聚合物的结合作用的其他加工来说,hGH 是足够纯的。

[0335] 某些 hGH 分子可以在不存在其他活性成分或蛋白质(不同于赋形剂、载剂和稳定剂、血清白蛋白,诸如此类)时用作治疗剂,或其可以与另一种蛋白质或聚合物复合。

[0336] XIII. 纯化方法

[0337] 各种分离步骤中的任何步骤可以在包含 hGH 的宿主细胞、宿主细胞的细胞质或其他材料的细胞溶胞产物、提取物、培养基、内含体、细胞周质间隙上执行,或在由任何分离步骤得到的任何 hGH 混合物上执行,分离步骤包括(但不限于)以下步骤:亲和色谱法、离子交换色谱、疏水性相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法、高效液相色谱法(“HPLC”)、逆相 HPLC(“RP-HPLC”)、膨胀床吸附或其任何组合和/或重复并且以任何适当的顺序。

[0338] 在执行本文中描述的技术中所使用的设备和其他必要材料可市售获得。泵、馏分收集器、监测器、记录器和全部系统可购自(例如)Applied Biosystems (Foster City, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules CA) 和 GE Healthcare, Inc. (Piscataway, NJ)。包括(但不限于)交换基质材料、培养基和缓冲液的色谱材料也可购自所述公司。

[0339] 诸如洗涤和洗提的本文中描述的柱色谱法方法中的平衡和其他步骤,可使用诸如泵的专用设备更快速地完成。市售的泵包括(但不限于)HILOAD[®] 泵 P-50、蠕动泵 P-1、泵 P-901 和泵 P-903 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0340] 馏分收集器的实例包括 RediFrac 馏分收集器、FRAC-100 和 FRAC-200 馏分收集器、和 SUPERFRAC[®] 馏分收集器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。混合器也可用以形成 pH 和线性浓度梯度。市售的混合器包括梯度混合器 GM-1 和线上混合器 (In-Line Mixer) (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0341] 色谱过程可以使用任何市售的监测器来监测。所述监测器可用以搜集如 UV、pH 值和电导率的信息。检测器的实例包括监测器 UV-1、UVICORD[®] S II、监测器 UV-M II、监测器 UV-900、监测器 UPC-900、监测器 pH/C-900 和电导率监测器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。实际上,包括来自 GE Healthcare (Piscataway, NJ) 的各种 AKTA[®] 系统的全部系统可市售获得。

[0342] 按本文中所述,第一 hGH 混合物的 pH 值可以在执行任何后续分离步骤之前调节。另外,第一 hGH 混合物或其任何后续混合物可以使用所属领域中已知的技术浓缩。此外,可以使用为所属领域的技术人员所知的技术把包含第一 hGH 混合物或其任何后续混合物的洗提缓冲液换成适于下一个分离步骤的缓冲液。

[0343] 离子交换色谱

[0344] 在一个实施例中并且作为可选的、额外的步骤,离子交换色谱可在第一 hGH 混合物上执行。通常参见 ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (目录号 18-1114-21, GE Healthcare (Piscataway, NJ))。市售离子交换柱包括 HITRAP[®]、HIPREP[®] 和 HILOAD[®] 柱 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。所述管柱利用诸如 Q SEPHAROSE[®] Fast Flow、Q SEPHAROSE[®] High Performance 和 Q SEPHAROSE[®]

XL 的强阴离子交换剂；诸如 **SP SEPHAROSE[®] High Performance**、**SP SEPHAROSE[®] Fast Flow** 和 **SP SEPHAROSE[®] XL** 的强阳离子交换剂；诸如 **DEAE SEPHAROSE[®] Fast Flow** 的弱阴离子交换剂；和诸如 **CM SEPHAROSE[®] Fast Flow** 的弱阳离子交换剂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。阴离子或阳离子交换柱色谱法可以在纯化方法的任何阶段在 hGH 上执行,以分离大体上纯化的 hGH。Source30Q 和 Source30S 是离子交换培养基(GE Healthcare)。

[0345] 阳离子交换色谱步骤可以使用任何适合的阳离子交换基质执行。有效的阳离子交换基质包括(但不限于),纤维的、多孔的、无孔的、微晶粒状的、珠状的或交联的阳离子交换基质材料。所述阳离子交换基质材料包括(但不限于),纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚苯乙烯、硅石、聚醚或任何前述材料的复合材料。

[0346] 阳离子交换基质可以是包括强阳离子交换剂和弱阳离子交换剂的任何适合的阳离子交换剂。强阳离子交换剂可以在宽的 pH 值范围内保留为离子化的并且因此,可以在宽的 pH 值范围内能够结合 hGH。然而,弱阳离子交换剂可以随 pH 值的变化失去离子化作用。举例而言,当 pH 降低到约 pH4 或 pH5 以下时,弱阳离子交换剂可以失去电荷。适合的强阳离子交换剂包括(但不限于)诸如磺丙基(SP)、磺酸甲酯(S)或磺乙基(SE)的带电官能团。阳离子交换基质可以是具有约 2.5 到约 6.0 的 hGH 结合 pH 值范围的强阳离子交换剂。或者,强阳离子交换剂可以具有约 pH2.5 到约 pH5.5 的 hGH 结合 pH 值范围。阳离子交换基质可以是具有约 3.0 的 hGH 结合 pH 值的强阳离子交换剂。或者,阳离子交换基质可以是具有约 6.0 到约 8.0 的 hGH 结合 pH 值范围的强阳离子交换剂。阳离子交换基质可以是具有约 8.0 到约 12.5 的 hGH 结合 pH 值范围的强阳离子交换剂。或者,强阳离子交换剂可以具有约 pH8.0 到约 pH12.0 的 hGH 结合 pH 值范围。

[0347] 加载 hGH 之前,阳离子交换基质可以(例如)使用若干柱体积的稀释的弱酸,例如 4 个柱体积的 pH3 的 20mM 乙酸来平衡。平衡后,可以添加 hGH 并且在洗提大体上纯化的 hGH 之前,又使用诸如弱乙酸或磷酸溶液的弱酸溶液,将管柱洗涤 1 到若干次。举例而言,大致 2-4 个柱体积的 pH3 的 20mM 乙酸可用以洗涤管柱。也可使用,使用(例如) 2-4 个柱体积的 pH5.5 的 0.05M 乙酸钠,或与 pH5.5 的 0.1M 氯化钠混合的 0.05M 乙酸钠的额外的洗涤。或者,使用所属领域中已知的方法,阳离子交换基质可以使用若干柱体积的稀释的弱碱来平衡。

[0348] 或者,大体上纯化的 hGH 可以通过使阳离子交换剂基质与具有足够低 pH 值或离子强度的缓冲液接触来洗提以将 hGH 从基质置换。洗提缓冲液的 pH 值可以在约 pH2.5 到约 pH6.0 的范围内。更明确地说,洗提缓冲液的 pH 值可以在约 pH2.5 到约 pH5.5、约 pH2.5 到约 pH5.0 的范围内。洗提缓冲液可具有约 3.0 的 pH 值。另外,洗提缓冲液的量可以广泛地变化并且将通常在约 2 到约 10 柱体积的范围内。此外,本文中可使用为所属领域的技术人员所知的适合的缓冲液,包括(但不限于),浓度在至少约 5mM 到至少约 100mM 的范围内的柠檬酸盐、磷酸盐、甲酸盐、HEPES 和 MES 缓冲液。

[0349] 在 hGH 吸附于阳离子交换剂基质后,大体上纯化的 hGH 可以通过使基质与具有足够高 pH 值或离子强度的缓冲液接触来洗提以将 hGH 从基质置换。洗提缓冲液的 pH 值可以在约 pH8.0 到约 pH12.5 的范围内。更明确地说,洗提缓冲液可以在约 pH8.0 到约 pH12.0

的范围内。适用于高 pH 值洗提大体上纯化的 hGH 的适合的缓冲液包括(但不限于),浓度在至少约 5mM 到至少约 100mM 的范围内的柠檬酸盐、磷酸盐、甲酸盐、乙酸盐、HEPES 和 MES 缓冲液。另外,可以使用 pH8.7 的具有 0.1M 硼酸钾、0.6M 氯化钾、0.1mM EDTA 的缓冲液。大体上纯化的 hGH 也可以使用标准缓冲液,诸如包括 pH7.5 的约 50 到 100mM 的 N-二甘氨酸,约 75mM 的 N-二甘氨酸;25 到约 100mM 的氯化钠,特别为约 50mM 的氯化钠;和约 0.05 到约 0.5 的 EDTA,更明确地说约 0.1mM 的 EDTA 的 N-二甘氨酸缓冲液来洗提。

[0350] 逆相色谱法

[0351] 可以按照为所属领域的技术人员所知的适合的方案,执行 RP-HPLC 来纯化蛋白质。参见(例如),Pearson 等人,ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230(1982);Rivier 等人,J. CHROM. (1983) 268:112-119;Kunitani 等人,J. CHROM. (1986) 359:391-402。可以在 hGH 上执行 RP-HPLC 来分离大体上纯化的 hGH。在这点上,可以使用具有多种长度的烷基官能基的经硅石衍生的树脂,包括(但不限于)至少约 C₃ 到至少约 C₃₀、至少约 C₃ 到至少约 C₂₀,或至少约 C₃ 到至少约 C₁₈ 树脂。或者,可以使用聚合树脂。举例而言,可以使用为苯乙烯聚合物树脂的 TosohHaas Amberchrome CG1000sd 树脂。也可以使用具有多种烷基链长度的氰基或聚合树脂。此外,RP-HPLC 柱可以用诸如乙醇的溶剂洗涤。Source RP 柱是 RP-HPLC 柱另一个实例。

[0352] 含有离子配对剂和诸如甲醇、异丙醇、四氢呋喃、乙腈或乙醇的有机改性剂的适合洗提缓冲液可用以从 RP-HPLC 柱洗提 hGH。最常用的离子配对剂包括(但不限于),乙酸、甲酸、高氯酸、磷酸、三氟乙酸、七氟丁酸、三乙胺、四甲铵、四丁铵、乙酸三乙铵。可以使用一种或一种以上梯度或平等条件执行洗提,其中梯度条件经优选以减少分离时间和减小峰宽度。通常,梯度可以是于水中的约 5% 到约 80% (v/v)、约 5% 到约 75% (v/v)、约 5% 到约 70% (v/v)、约 5% 到约 65% (v/v)、约 5% 到约 60% (v/v)、约 5% 到约 55% (v/v) 或约 10% 到约 50% (v/v) 溶剂。另一种方法涉及具有不同溶剂浓度范围的两种梯度的使用。适用于本文中的洗提缓冲液的实例可以包括(但不限于)乙酸铵和乙腈溶液。

[0353] 由重组大肠杆菌宿主得到的 hGH 可以另外通过逆相色谱法分离或纯化。可以(例如)使用具有约 10% 到约 60% 乙腈的乙腈梯度的 SOURCE RP 柱分离 hGH。

[0354] 疏水性相互作用色谱法纯化技术

[0355] 可以在 hGH 上执行疏水性相互作用色谱法(HIC)。通常参见,HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK:PRINCIPLES AND METHODS(目录号 18-1020-90,GE Healthcare(Piscataway, NJ)),其是以引用的方式并入本文。适合的 HIC 基质可以(但不限于)经烷基或芳基取代的基质,诸如经丁基、己基、辛基或苯基取代的基质,包括琼脂糖、交联琼脂糖、琼脂糖凝胶、纤维素、硅石、葡聚糖、聚苯乙烯、聚(甲基丙烯酸酯)基质和包括(但不限于)聚乙烯胺树脂或经丁基或苯基取代的聚(甲基丙烯酸酯)基质的混合型树脂。用于疏水性相互作用柱色谱法的市售来源包括(但不限于) HITRAP[®]、HIPREP[®]和 HILOAD[®] 柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ)和 TSKgel Phenyl-650S 和 Phenyl-5PW (30um) 树脂(Tosoh Bioscience)。

[0356] 简单来说,在加载之前,HIC 管柱可以使用为所属领域的技术人员所知的标准缓冲液,诸如乙酸/氯化钠溶液或含有硫酸铵的 HEPES,或于 pH6.5 的磷酸钠溶液中的硫酸铵,或于 pH7-8 的 TRIS solution 中的硫酸钠来平衡。硫酸铵可以用作加载 HIC 管柱的缓冲液。

在加载 hGH 后,可以随后使用标准缓冲液并且在诸如本文中描述的所述条件的条件下洗涤管柱,以除去不需要的材料但使 hGH 保留在 HIC 管柱上。可以用约 3 到约 10 柱体积的标准缓冲液,尤其诸如含有 EDTA 和比平衡缓冲液更低浓度硫酸铵的 HEPES 缓冲液,或乙酸 / 氯化钠缓冲液来洗提 hGH。使用(例如)磷酸钾的梯度的递减线性盐梯度也可用以洗提 hGH 分子。也可以将包括(但不限于)乙二醇、甘油或尿素(0.5-1.5M)的洗提增强剂添加到洗提缓冲液。然后,(例如)通过诸如透滤法或超滤的过滤作用将洗提液浓缩。可以利用透滤法来除去用以洗提 hGH 的盐。

[0357] 其他纯化技术

[0358] 使用(例如)凝胶过滤(GEL FILTRATION:PRINCIPLES AND METHODS(目录号 18-1022-18, GE Healthcare, Piscataway, NJ),其是以引用的方式并入本文,羟磷灰石色谱法(适合的基质包括(但不限于)HA-Ultrogel、High Resolution (Calbiochem)、CHT 陶瓷羟磷灰石(BioRad)、Bio-Gel HTP 羟磷灰石(BioRad)), HPLC, 膨胀床吸附,超滤,透滤法,冷冻干燥,诸如此类的另一个分离步骤,可以在第一 hGH 混合物或其任何后续混合物上执行,以除去任何过量的盐并且用适合的缓冲液置换缓冲液,以用于下一个分离步骤或甚至最终药物产品的配方。

[0359] 存在于 hGH 分子中的非天然编码的氨基酸也可以用以提供从不含有非天然编码的氨基酸的其他细胞蛋白质的分离。因为非天然编码的氨基酸可以包含独特的化学官能团,所以独特的官能团与另一个分子的偶合可以提供大体上的纯化步骤。举例而言,非天然编码的氨基酸可以与促进从其他蛋白质分离的另一个分子偶合。用于与非天然的氨基酸偶合的所述分子包括(但不限于)PEG 和其他聚合物。

[0360] 可以使用为所属领域的技术人员所知的技术,在本文中描述的各个步骤监测包括大体上纯化的 hGH 的 hGH 的产率。所述技术也可以用以评估最后一次分离步骤后大体上纯化的 hGH 的产率。举例而言,可以使用具有各种烷基链长度的若干逆相高压液相色谱柱中的任何管柱,诸如使用氰基 RP-HPLC、C₁₈RP-HPLC;以及阳离子交换 HPLC 和凝胶过滤 HPLC 监测 hGH 的产率。

[0361] 在本发明的特定实施例中,各个纯化步骤后的 hGH 的产率可以是各个纯化步骤的起始物质中的 hGH 的至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、至少约 99.9% 或至少约 99.99%。

[0362] 纯度可以使用诸如 SDS-PAGE 的标准技术或通过使用西方墨点和 ELISA 检定测量 hGH 而测定。举例而言,可以产生多克隆抗体抵抗从负性对照酵母发酵和阳离子交换回收分离的蛋白质。抗体也可以用于探测染色宿主细胞蛋白质的存在。

[0363] RP-HPLC 材料 Vydac C4 (Vydac) 由硅胶粒子组成,其表面带有 C4- 烷基链。使多肽与蛋白质杂质分离是基于疏水性相互作用强度的差异。洗提是使用在稀三氟乙酸中的乙腈梯度执行。制备性 HPLC 是使用不锈钢柱(填有 2.8 到 3.2 升的 Vydac C4 硅胶)执行。羟磷灰石 Ultrogel 洗提液是通过添加三氟乙酸而酸化并且被加载到 Vydac C4 柱上。为进行洗涤和洗提,使用在稀三氟乙酸中的乙腈梯度。收集馏分并且立即用磷酸盐缓冲液中和。汇集在 IPC 限度内的多肽馏分。

[0364] DEAE 琼脂糖凝胶 (GE Healthcare) 材料由共价地结合于琼脂糖凝胶珠粒表面的二乙氨基乙基 (DEAE) 组成。所选多肽与 DEAE 基团的结合是通过离子相互作用介导。乙腈和三氟乙酸通过管柱而不保留。在所述物质已经被洗涤出来后, 通过用低 pH 值的乙酸盐缓冲液洗涤管柱来除去痕量杂质。然后, 用中性磷酸盐缓冲液洗涤管柱并且用具有增加的离子强度的缓冲液洗提多肽。管柱被 DEAE 琼脂糖凝胶快速流填满。调节柱体积以保证在 3-10mg 多肽 /ml 凝胶的范围中的多肽填料。用水和平衡缓冲液 (磷酸钠 / 磷酸钾) 洗涤管柱。加载 HPLC 洗提液的经汇集的馏分并且用平衡缓冲液洗涤管柱。然后, 用洗涤缓冲液 (乙酸钠缓冲液) 洗涤, 接着用平衡缓冲液洗涤。随后, 用洗提缓冲液 (氯化钠、磷酸钠 / 磷酸钾) 从管柱洗提多肽并且根据标准的洗提概况以单一馏分收集。将 DEAE 琼脂糖凝胶管柱的洗提液调节到规定的电导率。使所得的药物无菌过滤到特氟隆瓶 (Teflon bottle) 中并且在 -70°C 下储存。

[0365] 可用以评估 hGH 的产率和纯度的方法和程序包括 (但不限于), Bradford 检定、SDS-PAGE、银染色 SDS-PAGE、考马斯亮蓝 (coomassie) 染色 SDS-PAGE、质谱分析法 (包括 (但不限于) MALDI-TOF) 和为所属领域的技术人员所知的用于表征蛋白质的其他方法。额外的方法包括 (但不限于): 与蛋白质染色法联用的 SDS-PAGE、免疫墨点法 (immunoblotting)、基质辅助激光解吸作用 / 离子化作用 - 质谱分析法 (MALDI-MS)、液体色谱法 / 质谱分析法、等电聚焦、分析性阴离子交换、色谱聚焦和圆二色性。

[0366] 可以使用的额外方法包括除去内毒素的步骤。内毒素是位于诸如大肠埃希氏菌的革兰氏阴性宿主细胞的外部膜上的脂多糖物质。降低内毒素水平的方法为所属领域的技术人员所知并且包括 (但不限于) 使用硅石支撑物、玻璃粉或羟磷灰石、逆相色谱、亲和色谱、尺寸排阻色谱、阴离子交换色谱、疏水性相互作用色谱法、过滤、所述方法的组合诸如此类的纯化技术。可以需要修改或额外的方法来除去诸如来自所关注的多肽的共同迁移的蛋白质的污染物。测量内毒素水平的方法为所属领域的技术人员所知并且包括 (但不限于) 鲎阿米巴样细胞溶胞产物 (Limulus Amebocyte Lysate) (LAL) 检定。

[0367] 尽管已经参考具体的实施例、方法、建构和用途而描述本发明, 但是对所属领域的技术人员来说显而易见的是, 能在不脱离本发明的情况下进行各种改变和修改。对所指示的试剂、材料和纯化条件进行改变对所属领域的技术人员来说是显而易见的。举例而言, 更高容量的树脂, 如果所述容量是所要求的, 那么可以在色谱法步骤中替代。

[0368] XIV. 替代系统中的表达

[0369] 已经使用若干策略以在非重组宿主细胞、经突变的宿主细胞中或在无细胞系统中, 将非天然氨基酸引入蛋白质中。所述系统也适用于制造本发明的 hGH 多肽。衍生化具有反应性侧链诸如 Lys、Cys 和 Tyr 的氨基酸会造成赖氨酸向 N²-乙酰基-赖氨酸的转化。化学合成也提供并入非天然氨基酸的直接方法。随着肽片段的酶促连接和天然化学连接的近期发展, 有可能制造较大的蛋白质。参见 (例如), P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* 69:923 (2000)。化学肽连接和天然化学连接描述于美国专利第 6, 184, 344 号、美国专利公开案第 2004/0138412 号、美国专利公开案第 2003/0208046 号、W002/098902 和 W003/042235 中, 所述专利是以引用的方式并入本文。将经所要求的非天然氨基酸化学酰化的抑制 tRNA 添加到能够支撑蛋白质生物合成的活体外提取物的一般活体外生物合成方法, 已经用以将超过 100 种以上的非天然氨基酸部位特异地并入具有任何实际尺

寸的各种蛋白质中。参见(例如), V. W. Cornish, D. Mendel 和 P. G. Schultz, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34:621 (1995); C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, Science 244:182-188 (1989); 和, J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, J. Am. Chem. Soc. 111:8013-8014 (1989)。已经将广泛范围的官能团引入蛋白质中以用于研究蛋白质稳定性、蛋白质折叠、酶机制和信号转导。

[0370] 开发称为选择性压力并入的活体内方法以利用野生型合成酶的杂乱性。参见(例如), N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, FASEB J., 13:41 (1999)。供给细胞具体的天然氨基酸的相关代谢路径被切断的营养缺陷菌株是在含有有限浓度的天然氨基酸的最小培养基中生长,而目标基因的转录被抑制。在静止生长期开始时,天然氨基酸被耗尽并且经非天然氨基酸类似物置换。诱导重组蛋白质的表达造成含有非天然类似物的蛋白质的累积。举例而言,使用所述策略,邻位、间位和对位氟苯丙氨酸已经被并入蛋白质中并且在可容易被识别的 UV 光谱中显示两个特征肩形突起,参见(例如), C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, Anal. Biochem., 284:29 (2000); 三氟甲硫氨酸已经用以置换噬菌体 T4 溶菌酶中的甲硫氨酸以通过 ^{19}F NMR 研究其与壳寡糖配位体的相互作用,参见(例如), H. Dewel, E. Daub, V. Robinson 和 J. F. Honek, Biochemistry, 36:3404 (1997); 并且, 三氟白氨酸已经被并入代替白氨酸, 导致白氨酸-拉链蛋白质的热稳定性和化学稳定性增加。参见(例如), Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado 和 D. A. Tirrell, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 40:1494 (2001)。此外, 硒代甲硫氨酸和碲代甲硫氨酸被并入各种重组蛋白质中以在 X 射线结晶学中促进相解。参见(例如), W. A. Hendrickson, J. R. Horton 和 D. M. Lemaster, EMBO J., 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda 和 M. Hatada, Nat. Struct. Biol. 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann 和 R. Huber, Eur. J. Biochem., 230:788 (1995); 和 N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder 和 R. Huber, J. Mol. Biol., 270:616 (1997)。具有烯炔或炔炔官能基的甲硫氨酸类似物也已被有效地并入, 允许通过化学手段额外修饰蛋白质。参见(例如), J. C. van Hest 和 D. A. Tirrell, FEBS Lett., 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick 和 D. A. Tirrell, J. Am. Chem. Soc. 122:1282 (2000); 和 K. L. Kiick 和 D. A. Tirrell, Tetrahedron, 56:9487 (2000); 美国专利第 6, 586, 207 号; 美国专利公开案 2002/0042097, 其是以引用的方式并入本文。

[0371] 所述方法的成功取决于通过氨酰基-tRNA 合成酶辨别非天然氨基酸类似物, 一般而言, 其需要高的选择性以保证蛋白质转译的保真度。扩展所述方法的范畴的一种方式放宽氨酰基-tRNA 合成酶的底物特异性, 其已经在有限的情况下达成。举例而言, 通过在大肠埃希氏菌苯丙氨酰基-tRNA 合成酶(PheRS) 中用 Gly 置换 Ala²⁹⁴ 会增加底物结合袋的尺寸, 并且导致对氯苯丙氨酸(p-Cl-Phe) 酰化 tRNAPhe。参见, M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, Biochemistry, 33:7107 (1994)。怀有所述突变体 PheRS 的大肠埃希氏菌菌株容许并入对氯苯丙氨酸或对溴苯丙氨酸代替苯丙氨酸。参见(例如),

M. Ibba 和 H. Hennecke, FEBS Lett. 364:272 (1995) ; 和, N. Sharma, R. Furter, P. Kast 和 D. A. Tirrell, FEBS Lett. 467:37 (2000)。同样地,展示了靠近大肠埃希氏菌酪氨酰 tRNA 合成酶的氨基酸结合部位的点突变 Phe130Ser 容许重氮酪氨酸比酪氨酸更有效地并入。参见, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll 和 S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000)。

[0372] 在活体内将非天然氨基酸并入蛋白质的另一个策略是修饰具有校对机制的合成酶。所述合成酶不能区别结构上相似于同源天然氨基酸的氨基酸并且因此不能活化所述氨基酸。所述误差在分离部位被校正,所述分离部位将来自 tRNA 的经错误装填(mischarged)的氨基酸去酰化以维持蛋白质转译的保真度。如果丧失合成酶的校对活性,那么经错误活化的结构类似物可以避免编辑功能并且被并入。近期已经用缬氨酰基-tRNA 合成酶(VaIRS)证明了所述方法。参见, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel 和 P. Marliere, Science, 292:501 (2001)。VaIRS 可用 Cys、Thr 或氨基丁酸盐(Abu)将 tRNA^{Val} 错误氨基酰化;然后,通过编辑域使所述非同源氨基酸水解。在大肠埃希氏菌染色体的随机突变后,选择在 VaIRS 的编辑部位具有突变的突变大肠埃希氏菌菌株。所述缺少编辑的 VaIRS 不正确地用 Cys 装填 tRNA^{Val}。因为 Abu 空间上类似于 Cys (Cys 的 -SH 基团经 Abu 中的 -CH₃ 置换),所以当所述突变大肠埃希氏菌菌株在 Abu 存在下生长时,突变 VaIRS 也将 Abu 并入蛋白质中。质谱分析展示,在原生蛋白质中,约 24% 的缬氨酸在各个缬氨酸位置经 Abu 置换。

[0373] 固相合成和半合成方法也允许含有新颖氨基酸的大量蛋白质的合成。举例而言,参见以下公开案和其中引用的参考文献,所述公开案如下: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, Ace Chem Res, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E. T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, J Am Chem Soc. 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides:backbone-engineered HIV protease, Science, 256 (5054):221-225 (1992); Chaiken, I. M. Semisynthetic peptides and proteins, CRC Crit Rev Biochem. 11 (3):255-301 (1981); Offord, R. E. Protein engineering by chemical means? Protein Eng. 1 (3):151-157 (1987); 和 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)。

[0374] 化学修饰已经用以将包括辅因子、自旋标记物和寡核苷酸的各种非天然侧链活体外引入蛋白质中。参见(例如), 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); 和 Pollack, S. J., Nakayama, G. Schultz, P. G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, Science, 242(4881):1038-1040(1988)。

[0375] 或者,使用经化学修饰的氨酰基-tRNA的生物合成方法已经用以将若干生物物理学探针活体外并入所合成的蛋白质中。参见以下公开案和其中引用的参考文献:Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, Annu. Rev Biochem, 62:483-514(1993); 和, 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)。

[0376] 以前已经展示,可通过将经化学氨基酰化的抑制 tRNA 添加到用含有所要求的琥珀无义突变的基因程序化的蛋白质合成反应,而在活体外将非天然氨基酸部位特异性地并入蛋白质中。使用所述方法,所属领域的技术人员可用封闭结构的同系物取代大量常见的 20 种氨基酸,例如,氟苯丙氨酸取代苯丙氨酸,使用营养缺陷菌株取代具体的氨基酸。参见(例如), 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, 等人, 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 等人, FASEB J. 13:41-51(1999); Ellman, J. A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C. J., Schultz, P. G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. Methods in Enz., vol. 202, 301-336(1992); 和 Mendel, D., Cornish, V. W. & Schultz, P. G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24, 435-62(1995)。

[0377] 举例而言,制备辨别终止密码子 UAG 的抑制 tRNA 并且用非天然氨基酸将其化学氨基酰化。惯用的定位突变用以在蛋白质基因中的所关注的部位引入终止密码子 TAG。参见(例如), Sayers, J. R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802(1988)。当经酰化的抑制 tRNA 和突变基因在活体外转录/转译系统中组合时,将非天然氨基酸并入以响应 UAG 密码子,得到在规定位置含有那个氨基酸的蛋白质。使用 [³H]-Phe 的实验和用 α -羧酸的实验证明,仅仅所要求的氨基酸在规定的位通过 UAG 密码子并入,并且所述氨基酸未在蛋白质中的任何其他部位并入。参见(例如), Noren, 等人, 同上; Kobayashi 等人, (2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432;

和 Ellman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041):197-200 (1992)。

[0378] 可以通过包括(但不限于)化学氨基酰化或酶促氨基酰化的任何方法或技术,用所要求的氨基酸氨基酰化 tRNA。

[0379] 氨基酰化可以通过氨酰基 tRNA 合成酶或通过包括(但不限于)核糖酶的其他酶促分子完成。术语“核糖酶”可与“催化性 RNA”互换。Cech 和同事(Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539;McCorkle 等人, 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226)证明了可充当催化剂(核糖酶)的天然产生的 RNA 的存在。然而,尽管已经展示所述天然 RNA 催化剂仅对用于裂解和剪接的核糖核酸底物起作用,但是核糖酶的人为进化的近期发展已经将催化作用的清单扩展到各种化学反应。研究已经识别出可在其自身(2')3'-末端上催化氨酰-RNA 键的 RNA 分子(ILLangakekare 等人, 1995 *Science* 267:643-647)和可将氨基酸从一个 RNA 分子转移到另一个的 RNA 分子(Lohse 等人, 1996, *Nature* 381:442-444)。

[0380] 以引用的方式并入本文的美国专利申请公开案 2003/0228593,描述建构核糖酶的方法和其在用天然编码的和非天然编码的氨基酸氨基酰化 tRNA 中的用途。包括(但不限于)核糖酶的可氨基酰化 tRNA 的酶促分子的底物固定形式,可以促成经氨基酰化的产物的有效亲和力和纯化。适合的底物的实例包括琼脂糖、琼脂糖凝胶和磁性珠粒。用于氨基酰化的核糖酶的底物固定形式的生产和用途描述于 *Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084 和美国专利申请公开案 2003/0228593 中,其以引用的方式并入本文。

[0381] 化学氨基酰化方法包括(但不限于),由 Hecht 和同事(Hecht, S. M. *Ace. 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) 和 由 Schultz、Chamberlin、Dougherty 和其他人(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. 等人 *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti 等人 *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. 等人 *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. 等人 *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. 等人 *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34) 提出的避免在氨基酰化作用中使用合成酶的所述方法,其以引用的方式并入本文。所述方法或其他化学氨基酰化方法可用以氨基酰化 tRNA 分子。

[0382] 用于产生催化性 RNA 的方法可以涉及产生随机化的核糖酶序列的分离池、在池上执行定向进化、为所需氨基酰化活性而筛选池和选择显示所要求的氨基酰化活性的所述核糖酶的序列。

[0383] 核糖酶可包含有利于酰化活性的基元和/或区域,诸如 GGU 基元和 U 富集区域。举例而言,已经报道 U 富集区域可促进氨基酸底物的辨别,并且 GGU-基元可与 tRNA 的 3' 末端形成碱基对。在组合时,GGU 和基元和 U 富集区域同时促进氨基酸和 tRNA 的同时辨别,并且进而促进 tRNA 的 3' 末端的氨基酰化。

[0384] 核糖酶可通过使用与 tRNA^{Asn}_{ccc} 结合的部分随机化的 r24mini 进行活体外选择,接

着通过见于活性无性系中的一致序列的系统工程化而产生。通过所述方法获得的示范性核糖酶被称为“Fx3 核糖酶”并且描述于美国公开申请案第 2003/0228593 号中,所述专利的内容是以引用的方式并入本文,所述核糖酶担当多用途催化剂用于合成经同源非天然氨基酸加载的各种氨酰基-tRNA。

[0385] 底物上的固定可用以促成经氨酰化的 tRNA 的有效亲和力纯化。适合的底物的实例包括(但不限于)琼脂糖、琼脂糖凝胶和磁性珠粒。核糖酶可通过利用 RNA 的化学结构固定于树脂上,诸如 RNA 的核糖上的 3'-顺式二醇可经高碘酸盐氧化以产生对应的二醛以促进 RNA 在树脂上的固定。可使用包括廉价酰肼树脂的各种类型的树脂,其中还原性胺化作用使树脂与核糖酶之间的相互作用成为不可逆的键。氨酰基-tRNA 的合成可通过所述管柱上氨酰化技术而显著地促进。Kourouklis 等人 *Methods*2005;36:239-4 描述基于管柱的氨酰化系统。

[0386] 经氨酰化的 tRNA 的分离可以各种方式完成。一种适合的方法是,从具有诸如含有 10mM EDTA 的乙酸钠溶液的缓冲液、含有 50mM N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-[3-(丙烷磺酸)]、pH7.0 的 12.5mM KCl、10mM EDTA 的缓冲液或仅为经 EDTA 缓冲的水(pH7.0)的管柱洗提经氨酰化的 tRNA。

[0387] 可将经氨酰化的 tRNA 添加到转译反应,以便并入氨基酸,在通过转译反应制得的多肽中的特别位置上,tRNA 被所述氨基酸氨酰化。可以使用本发明的经氨酰化的 tRNA 的转译系统的实例,包括(但不限于)细胞溶胞产物。细胞溶胞产物提供为从输入 mRNA 活体外转译多肽所必需的反应组分。所述反应组分的实例包括(但不限于)核糖体蛋白、rRNA、氨基酸、tRNA、GTP、ATP、转译起始因子和延伸因子和与转译相关的其他因子。另外,转译系统可以是分批转译或隔开转译。分批转译系统在单一隔室中组合反应组分,而隔开转译系统使转译反应组分与可抑制转译功效的反应产物分离。所述转译系统是市售的。

[0388] 另外,可以使用偶合转录/转译系统。偶合转录/转译系统允许将输入的 DNA 转录成对应的 mRNA,而 mRNA 又被反应组分转译。市售偶合转录/转译的实例是 Rapid Translation System (RTS, Roche Inc.)。系统包括含有用于提供诸如核糖体的转译组分的大肠杆菌溶胞产物和转译因子的混合物。另外,包括 RNA 聚合酶用于将输入 DNA 转录成适用于转译的 mRNA 模板。RTS 可使用通过插入反应隔室(包括供应/消耗隔室与转录/转译隔室)之间的膜使反应组分隔开。

[0389] tRNA 的氨酰化可以通过包括(但不限于)移转酶、聚合酶、催化性抗体、多官能蛋白质,诸如此类的其他试剂执行。

[0390] Lu 等人在 *Mol Cell*. 2001Oct;8(4):759-69 中描述将蛋白质与含有非天然氨基酸的合成肽化学接合的方法(经表达的蛋白质连接)。

[0391] 显微注射技术也已用于将非天然氨基酸并入蛋白质中。参见(例如),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 和 H. A. Lester, *Science*. 268:439(1995); 和 D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645(2000)。爪蟾卵母细胞(*Xenopus oocyte*)是与以下活体外制得的两种 RNA 物质共同注射:编码在所关注的氨基酸位置具有 UAG 终止密码子的目标蛋白质的 mRNA,和经所要求的非天然氨基酸氨酰化的琥珀抑制基因 tRNA。然后,卵母细胞的转译机器在规定的位点上,通过

UAG 将非天然氨基酸插入。所述方法已使得可进行内在膜蛋白的活体内结构 - 功能研究, 所述内在膜蛋白通常不服从活体外表达系统。实例包括将荧光氨基酸并入速激肽神经激肽-2 受体中以通过荧光共振能量传递测量距离, 参见(例如), G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel 和 A. Chollet, J. Biol. Chem., 271:19991(1996); 并入生物素化氨基酸以识别离子通道中的表面暴露残基, 参见(例如), J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739(1997); 使用笼式酪氨酸类似物以实时监测离子通道中的构象改变, 参见(例如), J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty 和 H. A. Lester, Neuron, 20:619(1998); 和使用 α 羟基氨基酸以改变离子通道构架用于探测其门控机制。参见(例如), P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty 和 H. A. Lester, Cell, 96:89(1999); 和 T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239(2001)。

[0392] 直接将非天然氨基酸活体内并入蛋白质中的能力提供包括(但不限于)以下优点的多种优点: 突变蛋白质的高产率、技术简易性、可能在细胞中或可能在活生物体中研究突变蛋白质, 和在治疗性治疗和诊断用途中使用所述突变蛋白质。使具有各种尺寸、酸性、亲核性、疏水性和其他性质的非天然氨基酸包括在蛋白质中的能力可大大地扩展我们合理地 and 系统地操纵蛋白质的结构的能力, 以探测蛋白质功能并产生具有新颖性质的新颖蛋白质或生物体。然而, 因为在蛋白质转译中, 达到高程度的保真度所需要的 tRNA- 合成酶相互作用的复杂性质, 所以所述方法是困难的。

[0393] 在部位特异性地并入对 F-Phe 的一次尝试中, 将酵母琥珀抑制基因 tRNAPheCUA/ 苯丙氨酰基-tRNA 合成酶对用于抗对 F-Phe、Phe 营养缺陷型大肠埃希氏菌菌株中。参见(例如) R. Furter, Protein Sci., 7:419(1998)。

[0394] 也可能使用无细胞(活体外)转译系统获得本发明的 hGH 多核苷酸的表达。转译系统可以是细胞的或无细胞的, 并且可以是原核的或真核的。细胞转译系统包括(但不限于)诸如透性化细胞的全细胞制剂或细胞培养物, 其中可将所要求的核酸序列转录成 mRNA 并且将 mRNA 转译。无细胞转译系统是市售的并且许多不同类型和系统是熟知的。无细胞系统的实例包括(但不限于), 诸如大肠埃希氏菌溶胞产物的原核溶胞产物, 和诸如小麦胚芽提取物、昆虫细胞溶胞产物、兔网状细胞溶胞产物、兔卵母细胞溶胞产物和人类细胞溶胞产物的真核溶胞产物。当所得蛋白质经糖基化、磷酸化或否则经修饰时, 真核提取物或溶胞产物可为优选的, 因为许多所述修饰仅在真核系统中为可能的。一些所述提取物和溶胞产物是市售的(Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N. Y.)。诸如含有微粒体膜的犬胰腺提取物的膜质提取物也是可用的, 其适用于转译分泌性蛋白质。在可包括 mRNA 作为模板(活体外转译)或者 DNA 作为模板(经组合的活体外转录和转译)所述系统中, 活体外合成是通过核糖体引导。已经对开发无细胞蛋白质表达系统进行相当大的努力。参见(例如), Kim, D. M. 和 J. R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74:309-316(2001); Kim, D. M. 和 J. R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D. M. 和 J. R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D. M. 和 J. R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); 和 Patnaik, R. 和 J. R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); 美国专利第 6, 337, 191 号; 美国专利公开

案第 2002/0081660 号 ;WO 00/55353 ;WO 90/05785,其是以引用的方式并入本文。可以应用于表达包含非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的另一种方法包括 mRNA- 肽融合技术。参见(例如), R. Roberts 和 J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302(1997) ; A. Frankel 等人, Chemistry & Biology 10:1043-1050(2003)。在所述方法中,与嘌呤霉素连接的 mRNA 模板在核糖体上被转译成肽。如果已经修饰一个或一个以上 tRNA 分子,那么也可将非天然的氨基酸并入肽中。在已经阅读出上一次的 mRNA 密码子后,嘌呤霉素俘获肽的 C- 末端。如果在活体外检定中发现所得 mRNA- 肽结合物具有所关注的性质,那么其同一性可容易地从 mRNA 序列揭示。因此,所属领域的技术人员可以筛选包含一个或一个以上非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽的库,以识别具有所要求的性质的多肽。近期,已经报道,用纯化的组分进行活体外核糖体转译使得可合成经非天然编码的氨基酸取代的肽。参见(例如), A. Forster 等人, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353(2003)。

[0395] 也可以使用重构转译系统。经纯化的转译因子的混合物以及由诸如起始因子 -1 (IF-1)、IF-2、IF-3 (α 或 β)、延伸因子 T (EF-Tu) 或终止因子的经纯化的转译因子补充的溶胞产物的组合或溶胞产物也已经成功用以将 mRNA 转译到蛋白质中。无细胞系统也可以是经偶合的转录 / 转译系统,其中如 Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel 等编者, Wiley Interscience, 1993) 中所述将 DNA 引入系统、转录成 mRNA 并且转译 mRNA,其在此特别以引用的方式并入。在真核转录系统中转录的 RNA 可以呈异核 RNA (hnRNA) 或 5' - 末端帽(7- 甲基鸟嘌呤核苷)和 3' - 末端多聚 A 有尾成熟 mRNA 形式,其可为某些转译系统中的优点。举例而言,加帽 mRNA 以高效率在网状细胞溶胞产物系统中被转译。

[0396] XV. 与 hGH 多肽偶合的大分子聚合物

[0397] 本文中描述的对非天然的氨基酸多肽的各种修饰可使用本文中描述的组合物、方法、技术和策略实现。所述修饰包括将包括(但不限于)以下物质的另一官能基并入多肽的非天然的氨基酸组分上:标记;染料;聚合物;水溶性聚合物;聚乙二醇的衍生物;光致交联剂;放射性核素;细胞毒素化合物;药物;亲和标记;光亲和标记;反应性化合物;树脂;第二蛋白质或多肽或多肽类似物;抗体或抗体片段;金属螯合剂;辅因子;脂肪酸;碳水化合物;多核苷酸;DNA;RNA;反义多核苷酸;糖类;水溶性的树枝状聚合物;环糊精;抑制性核糖核酸;生物材料;纳米粒子;自旋标记物;荧光团、含金属的部分;放射性部分;新颖的官能团;共价地或非共价地与其他分子相互作用的基团;光致笼罩部分;可光化辐射激发的部分;可光致异构化的部分;生物素;生物素的衍生物;生物素类似物;并入重原子的部分;可化学裂解的基团;可光致裂解的基团;伸长的侧链;经碳连接的糖;氧化还原作用活性剂;氨基硫代酸;毒性部分;同位素标记的部分;生物物理学探针;发磷光的基团;化学发光的基团;电子密基团;磁性基团;插入基团;发色团;能量转移剂;生物活性剂;可检测的标记;小分子;量子点;纳米导体;放射性核苷酸;放射性导体;中子俘获剂;或上述物质的任何组合,或任何其他所需的化合物或物质。作为本文中描述的组合物、方法、技术和策略的说明性的、非限制性的实例,以下描述将集中在将大分子聚合物添加到非天然的氨基酸多肽,条件是其中描述的组合物、方法、技术和策略(如有必要并且所属领域的技术人员能用本文中的揭示内容进行时,那么其可经适当的修改)也适用于添加包括(但不限于)上文列出的所述功能性物质的其他功能性物质。

[0398] 多种大分子聚合物和其他分子可与本发明的 hGH 多肽连接以调节 hGH 多肽的生物性质, 和 / 或为 hGH 分子提供新颖生物性质。所述大分子聚合物可通过天然编码的氨基酸, 通过非天然编码的氨基酸或天然或非天然的氨基酸的任何官能取代基, 或添加到天然或非天然的氨基酸的任何取代基或官能团来与 hGH 多肽连接。聚合物的分子量可以具有包括 (但不限于) 在约 100Da 与约 100,000Da 或 100,000Da 以上之间的宽范围。聚合物的分子量可以在约 100Da 与约 100,000Da 之间, 包括 (但不限于), 100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da 和 100Da。在一些实施例中, 聚合物的分子量在约 100Da 与 50,000Da 之间。在一些实施例中, 聚合物的分子量在约 100Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中, 聚合物的分子量在约 1,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中, 聚合物的分子量在约 5,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中, 聚合物的分子量在约 10,000Da 与 40,000Da 之间。

[0399] 本发明提供聚合物: 蛋白质结合物的大体上均质的制剂。按本文中所使用, “大体上均质的” 意思是观察到聚合物: 蛋白质结合物分子大于总蛋白质的一半。聚合物: 蛋白质结合物具有生物活性并且本文中提供的本发明 “大体上均质的” 经聚乙二醇化的 hGH 多肽制剂是为足够均质以显示均质制剂的优点的所述制剂, 例如在临床应用中易于预测批量间的药物动力学。

[0400] 所属领域的技术人员也可以选择制备聚合物: 蛋白质结合物分子的混合物, 并且本文中提供的优点是, 所属领域的技术人员可以选择单聚合物: 蛋白质结合物包括于混合物内的比例。因此, 如果需要, 那么所属领域的技术人员可以制备各种蛋白质与所连接的各种数量的聚合物部分 (也就是说, 二聚、三聚、四聚等) 的混合物, 并且将所述结合物与使用本发明的方法制备的单聚合物: 蛋白质结合物组合, 并且得到具有预定比例的单聚合物: 蛋白质结合物的混合物。

[0401] 所选择的聚合物可以是水溶性的以便与其连接的蛋白质在诸如生理环境的水相环境中不沉淀。聚合物可以是分支的或未分支的。对终点产物制剂的治疗性用途来说, 聚合物将为医药学上可接受的。

[0402] 聚合物的实例包括 (但不限于) 聚烷基醚和其烷氧基加帽类似物 (例如, 聚氧乙烯二醇 (polyoxyethylene glycol)、聚氧乙烯 / 丙烯二醇, 和其甲氧基或乙氧基加帽类似物, 尤其为聚氧乙烯二醇, 后者也称为聚乙二醇或 PEG); 聚乙烯吡咯烷酮; 聚乙烯基烷基醚; 聚恶唑啉、聚烷基恶唑啉和聚羟烷基恶唑啉; 聚丙烯酰胺、聚烷基丙烯酰胺和聚羟烷基丙烯酰胺 (例如, 聚羟丙基甲基丙烯酰胺和其衍生物); 聚羟烷基丙烯酸酯; 聚唾液酸和其类似物; 亲水性肽序列; 包括葡聚糖和葡聚糖衍生物的多糖和其衍生物, 例如, 羧甲基葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、氨基葡聚糖; 纤维素和其衍生物, 例如, 羧甲基纤维素、羟烷基纤维素; 壳多糖和其衍生物, 例如脱乙酰壳多糖、丁二酰脱乙酰壳多糖、羧甲基壳多糖、羧甲基脱乙酰壳多糖; 透明质酸和其衍生物; 淀粉; 海藻酸盐; 硫酸软骨素; 白蛋白; 支链淀粉和羧甲基支链淀粉; 聚氨基酸和其衍生物, 例如, 聚谷氨酸、聚赖氨酸、聚天门冬氨酸、聚天门冬酰胺; 顺丁烯二酸酐共聚物, 诸如: 苯乙烯顺丁烯二酸酐共聚物、二乙烯基乙基醚顺丁烯二酸酐共聚物; 聚

乙烯醇 ; 其共聚物 ; 其三聚物 ; 其混合物和前述聚合物的衍生物。

[0403] 如其浓度将在反应混合物中变化一样, 聚乙二醇分子与蛋白质分子的比例将变化。一般而言, 最佳比率(就存在最小过量的未反应的蛋白质或聚合物的反应的功效而言)可由所选择的聚乙二醇的分子量和可用反应性基团的可用数量来确定。当涉及分子量时, 通常聚合物的分子量越高, 可以与蛋白质连接的聚合物分子的数量就越少。同样地, 当优化所述参数时, 应考虑聚合物的分支。通常, 分子量越高(或分支越多), 聚合物: 蛋白质比率就越高。

[0404] 按本文中所使用并且当涵盖 PEG:hGH 多肽结合物时, 术语“治疗有效量”指的是对患者产生所要求的利益的量。量将在个体与个体之间变化并且将视包括患者的总身体状况和待治疗的病状的潜在病因的大量因素而定。用于疗法的 hGH 多肽的量产生可接受的改变率并且将所要求的反应维持在有益水平下。本发明组合物的治疗有效量可以容易地通过所属领域的技术人员, 使用公开可用的材料和程序确定。

[0405] 水溶性聚合物可以是包括(但不限于)直链、分叉或分支的任何结构形式。通常, 水溶性聚合物是诸如聚(乙二醇)(PEG)的聚(烷撑二醇), 但也可使用其他水溶性聚合物。举例而言, PEG 是用以描述本发明的某些实施例。

[0406] PEG 是熟知的、水溶性聚合物, 其为市售的或可根据为所属领域的技术人员所知的的方法, 通过乙二醇的开环聚合制备(Sandler 和 Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, 第 3 卷, 第 138-161 页)。术语“PEG”广泛用以涵盖任何聚乙二醇分子, 不考虑 PEG 的尺寸或末端的修饰, 并且可通过下式表示为与 hGH 多肽连接: $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$, 其中 n 是 2 到 10,000 并且 X 是 H 或包括(但不限于) C_{1-4} 烷基、保护基或末端修饰基团的末端修饰。

[0407] 在一些情况下, 用于本发明的 PEG 在一个末端由羟基或甲氧基终止, 也就是说, X 是 H 或 CH_3 (“甲氧基 PEG”)。或者, PEG 可由反应性基团终止, 进而形成双官能聚合物。典型的反应性基团可包括常用以与可见于 20 种常见氨基酸中的官能团反应的所述反应性基团(包括(但不限于), 马来酰亚胺基团、经活化的碳酸酯(包括(但不限于)对硝基苯基酯)、经活化的酯(包括(但不限于), N-羟基丁二酰亚胺、对硝基苯基酯)和醛), 以及对 20 种常见氨基酸为惰性但与存在于非天然编码的氨基酸中的互补官能团特异性反应的官能团。应了解, 在上式中由 Y 展示的 PEG 的另一末端将直接地或间接地通过天然存在的或者非天然编码的氨基酸连接于 hGH 多肽。在一些实施例中, 强的亲核物质(包括(但不限于), 肼、酰肼、羟胺、氨基脲)可在适当时与存在于非天然编码的氨基酸中的醛或酮基反应以形成脎、肟或缩氨基脲, 在一些情况下, 其可进一步通过由适当还原剂的处理而还原。或者, 强的亲核物质可通过非天然编码的氨基酸而并入 hGH 多肽中, 并且用以优先地与存在于水溶性聚合物中的酮或醛基反应。

[0408] PEG 的任何分子量可按实际要求来使用, 其包括(但不限于)约 100 道尔顿(Da)到 100,000Da 或按要求为更多的(包括(但不限于), 有时为 0.1-50kDa 或 10-40kDa)。PEG 的分子量可以具有包括(但不限于)在约 100Da 与约 100,000Da 或 100,000Da 以上之间的宽范围。PEG 的分子量可以在约 100Da 与约 100,000Da 之间, 包括(但不限于), 100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、

15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da 和 100Da。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 100Da 与 50,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 100Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 1,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 5,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 10,000Da 与 40,000Da 之间。也可使用支链 PEG,其包括(但不限于),带有具有在 1-100kDa (包括(但不限于),1-50kDa 或 5-20kDa) 范围变化的 MW 的各链的 PEG 分子。支链 PEG 的分子量可以(包括(但不限于))在约 1,000Da 与约 100,000Da 或 100,000Da 以上之间。支链 PEG 的分子量可以在约 1,000Da 与约 100,000Da 之间,包括(但不限于),100,000Da,95,000Da,90,000Da,85,000Da,80,000Da,75,000Da,70,000Da,65,000Da,60,000Da,55,000Da,50,000Da,45,000Da,40,000Da,35,000Da,30,000Da,25,000Da,20,000Da,15,000Da,10,000Da,9,000Da,8,000Da,7,000Da,6,000Da,5,000Da,4,000Da,3,000Da,2,000Da 和 1,000Da。在一些实施例中,支链 PEG 的分子量在约 1,000Da 与 50,000Da 之间。在一些实施例中,支链 PEG 的分子量在约 1,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,支链 PEG 的分子量在约 5,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,支链 PEG 的分子量在约 5,000Da 与 20,000Da 之间。广泛范围的 PEG 分子描述于包括(但不限于)the Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog 中,其以引用的方式并入本文。

[0409] 通常,PEG 分子的至少一个末端可用于与非天然编码的氨基酸反应。在一些实施例中,具有 PEG 衍生物的 hGH 多肽变体含有可与存在于非天然编码的氨基酸的侧链上的化学官能基反应的化学官能基。

[0410] 水溶性聚合物的聚合物主链可为聚(乙二醇)。然而,应了解包括(但不限于)聚(乙二醇)和包括聚(葡聚糖)和聚(丙二醇)的其他相关聚合物的多种水溶性聚合物也适用于本发明的实践并且术语 PEG 或聚(乙二醇)的使用是用来涵盖和包括所有所述分子。术语 PEG 包括(但不限于)呈其任何形式的聚(乙二醇),包括双官能 PEG、多臂 PEG、衍生化的 PEG、分叉 PEG、分支 PEG、侧接 PEG (也就是说,PEG 或具有一个或一个以上侧接于聚合物主链的官能团的相关聚合物),或其中具有可降解的键的 PEG。

[0411] PEG 通常是透明的、无色的、无味的、可溶于水的、对加热稳定的、对许多化学试剂惰性的,不水解或退化,并且通常是无毒的。聚(乙二醇)被认为是可生物相容的,也就是说,PEG 能够与活组织或生物体共存而不会造成危害。更明确地说,PEG 是大体上非免疫原性的,也就是说,PEG 不趋向于在体内产生免疫反应。当在体内连接于诸如生物活性剂的具有一些所需功能的分子时,PEG 趋向于遮蔽药剂并且可降低或消除任何免疫反应以便生物体可容许药剂的存在。PEG 结合物不会趋向于产生实质的免疫反应或引起凝血或其他不良效应。具有式 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 的 PEG 适用于本发明,其中 n 是约 3 到约 4000,通常为约 20 到约 2000。在本发明的一些实施例中,具有约 800Da 到约 100,000Da 的分子量的 PEG 尤其适于用作聚合物主链。PEG 的分子量可以具有包括(但不限于)在约 100Da 与约 100,000Da 或 100,000Da 以上之间的宽范围。PEG 的分子量可以在约 100Da 与约 100,000Da 之间,包括(但不限于),100,000Da,95,000Da,90,000Da,85,000Da,80,000Da,75,000Da,70,000Da,65,000Da,60,000Da,55,000Da,50,000Da,45,000Da,40,000Da,35,000Da,

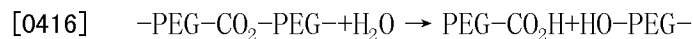
30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da 和 100Da。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 100Da 与 50,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 100Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 1,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 5,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,PEG 的分子量在约 10,000Da 与 40,000Da 之间。

[0412] 聚合物主链可为直链的或分支的。分支聚合物主链通常在所属领域中为已知的。通常,分支聚合物具有中心分支核心部分和与中心分支核心连接的多个直链聚合物链。PEG 通常是以分支形式使用,其可通过将环氧乙烷添加到诸如甘油、甘油寡聚体、季戊四醇和山梨糖醇的各种多元醇而制备。中心分支部分也可由诸如赖氨酸的若干氨基酸得到。分支的聚(乙二醇)可以由通式 $R(-PEG-OH)_m$ 表示,其中 R 是衍生自诸如甘油、甘油寡聚体或季戊四醇的核心部分,并且 m 表示臂的数量。诸如美国专利第 5,932,462,575 ;5,229,490 ;4,289,872 号 ;美国专利申请案 2003/0143596 ;WO 96/21469 ;和 WO93/21259 中描述的所述 PEG 分子的多臂 PEG 分子也可用作聚合物主链,所述各个专利是以引用的方式全部并入本文。

[0413] 分支 PEG 也可呈通过 $PEG(-YCH_2)_n$ 表示的分叉 PEG 形式,其中 Y 是连接基团并且 Z 是通过一串的具有规定长度的原子与 CH 连接的经活化的末端基。

[0414] 另一种分支形式,即侧接 PEG,具有沿 PEG 主链而不是在 PEG 链的末端处的诸如羧基的反应性基团。

[0415] 除所述的 PEG 的形式之外,聚合物也可经制备而在主链中具有弱或可降解的键。举例而言,PEG 可经制备而在聚合物主链中具有易受水解作用的酯键。如下所示,所述水解作用会造成聚合物裂解成具有较低分子量的片段:



[0417] 所属领域的技术人员应了解,术语聚(乙二醇)或 PEG 表示或包括所属领域中已知的包括(但不限于)本文中所示的所述形式的所有形式。

[0418] 许多其他聚合物也适用于本发明。在一些实施例中,具有 2 到约 300 个末端的水溶性的聚合物主链尤其适用于本发明。适合的聚合物的实例包括(但不限于)诸如聚(丙二醇) (“PPG”) 的其他聚(烷撑二醇),其共聚物(包括(但不限于)乙二醇和丙二醇的共聚物)、其三聚物、其混合物,诸如此类。尽管聚合物主链的各个链的分子量可变化,但是其通常是在约 800Da 到约 100,000Da 的范围内,常常在约 6,000Da 到约 80,000Da 的范围内。聚合物主链的各个链的分子量可以在约 100Da 和约 100,000Da 之间,包括(但不限于),100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da 和 100Da。在一些实施例中,聚合物主链的各个链的分子量在约 100Da 与 50,000Da 之间。在一些实施例中,聚合物主链的各个链的分子量在约 100Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,聚合物主链的各个链的分子量在约 1,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,聚合物主链的各个链的分子量在约 5,000Da 与 40,000Da 之间。在一些实施例中,聚合物主链的各个链的分子量

在约 10,000Da 与 40,000Da 之间。

[0419] 所属领域的技术人员将认识到,大体上水溶性主链的前述清单不是完全的并且仅仅是说明性的,并且具有上述性质所有聚合材料因为适用于本发明而被涵盖。

[0420] 在本发明的一些实施例中,聚合物衍生物是“多官能的”,意思是聚合物主链具有至少两个经官能团官能化的或活化的末端,并且可能多至约 300 个末端。多官能聚合物衍生物包括(但不限于)具有两个末端的直链聚合物,各个末端键合于可以为相同的或不同的官能团。

[0421] 水溶性聚合物可与本发明的 hGH 多肽连接。水溶性聚合物可以通过并入 hGH 多肽中的非天然编码的氨基酸,或非天然编码的或天然编码的氨基酸的任何官能团或取代基,或添加到非天然编码的或天然编码的氨基酸的任何官能团或取代基来连接。或者,水溶性聚合物是通过天然存在的氨基酸(包括(但不限于)半胱氨酸、赖氨酸或 N-末端残基的氨基)与并入非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽连接。在一些情况下,本发明的 hGH 多肽包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 种非天然的氨基酸,其中一个或一个以上非天然编码的氨基酸连接于水溶性聚合物(包括(但不限于) PEG 和 / 或寡糖)。在一些情况下,本发明的 hGH 多肽另外包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或 10 种以上的与水溶性聚合物连接的天然编码的氨基酸。在一些情况下,本发明的 hGH 多肽包含一个或一个以上与水溶性聚合物连接的非天然编码的氨基酸,和一个或一个以上与水溶性聚合物连接的天然存在的氨基酸。在一些实施例中,相对于非结合形式,用于本发明的水溶性聚合物增强 hGH 多肽的血清半衰期。

[0422] 与本发明的 hGH 多肽连接的水溶性聚合物的数量(也就是说,聚乙二醇化或糖基化的程度)可经调节以提供改变的(包括(但不限于)增加的或降低的)诸如活体内半衰期的药理学的、药物动力学的或药效的特性。在一些实施例中,hGH 的半衰期较非修饰多肽增加至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2 倍、5 倍、10 倍、50 倍或至少约 100 倍。

[0423] 水溶性聚合物与 hGH 多肽连接的程度和部位可调节 hGH 多肽与部位 1 处的 hGH 多肽受体或结合搭配物的结合。在一些实施例中,键经排列以便 hGH 多肽以约 400nM 或 400nM 以下的 K_d ,以 150nM 或 150nM 以下的 K_d ,和在一些情况下,以 100nM 或 100nM 以下的 K_d 结合部位 1 处的 hGH 多肽受体, K_d 按照诸如 Spencer 等人, J. Biol. Chem., 263:7862-7867(1988) 中所述的平衡结合检定所测量。

[0424] 用于活化聚合物以及用于结合肽的方法和化学作用描述于文献中并且在所属领域中为已知的。用于活化聚合物的常用方法包括(但不限于),用溴化氰、高碘酸盐、戊二醛、双环氧化物、表氯醇、二乙烯砜、碳化二亚胺、磺酰基卤化物、三氯三嗪等来活化官能团。(参见, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N. Y. ;S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton ;G. T. Hermanson 等人, (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N. Y. ;Dunn, R. L. 等人, 编. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series 第 469 卷, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991)。

[0425] 若干对 PEG 的官能化和结合作用的评论和专题论文是可用的。参见(例如), Harris, Macromol. Chem. Phys. C25:325-373(1985) ;Scouten, Methods in Enzymology135:30-65(1987) ;Wong 等人, Enzyme Microb. Technol. 14:866-874(1992) ;

Delgado 等人, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249-304(1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6:150-165(1995)。

[0426] 用于活化聚合物的方法也可见于 W094/17039、美国专利第 5,324,844 号、W094/18247、W094/04193、美国专利第 5,219,564 号、美国专利第 5,122,614 号、W090/13540、美国专利第 5,281,698 号和 W093/15189, 并且可找到用于经活化的聚合物与包括(但不限于)以下酶的酶之间的结合作用的方法:凝血因子 VIII (W094/15625)、血红蛋白 (W094/09027)、带有氧的分子(第 4,412,989 号美国专利)、核糖核酸酶和超氧化物歧化酶 (Veronese 等人, *App. Biochem. Biotech.* 11:141-52(1985))。所有引用的参考文献和专利是以引用的方式并入本文。

[0427] 反应产物随后经受疏水性相互作用色谱以使经聚乙二醇化的 hGH 多肽变体与游离 PEG 分离。适合的条件视交联复合物相对所要求的结合物的相对尺寸而变化,并且容易地通过所属领域的技术人员确定。含有所要求的结合物的洗提液可以通过超滤浓缩并且通过透滤法脱盐。

[0428] 必要时,从疏水性色谱获得的经聚乙二醇化的 hGH 多肽,可另外通过包括(但不限于)以下程序的为所属领域的技术人员所知的一种或一种以上程序而纯化:亲和色谱法;阴离子或阳离子交换色谱法(使用包括(但不限于) DEAE SEPHAROSE);硅石色谱法;逆相 HPLC;凝胶过滤(使用包括(但不限于) SEPHADEX G-75);疏水性相互作用色谱法;尺寸-排阻色谱法;金属螯合色谱法;超滤/透滤法;乙醇沉淀;硫酸铵沉淀;色谱聚焦;置换色谱法;电泳程序(包括(但不限于)制备性等电聚焦)、差异可溶性(包括(但不限于)硫酸铵沉淀)或提取法。表观分子量可以通过将 GPC 与球状蛋白质标准相比而估算 (Preneta, AZ in *PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH* (Harris&Angal, 编) IRL Press 1989, 293-306)。hGH-PEG 结合物的纯度可通过解蛋白降解(包括(但不限于)胰蛋白酶裂解),接着质谱分析来评估。PepinskyRB. 等人, *J. Pharmacol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66(2001)。

[0429] 与本发明的 hGH 多肽的氨基酸连接的水溶性聚合物可无限制地另外经衍生或取代。

[0430] 其他 PEG 衍生物和通用聚乙二醇化技术

[0431] 可与 hGH 多肽连接的其他示范性 PEG 分子,以及聚乙二醇化方法包括描述于(例如)以下专利中的所述 PEG 分子和聚乙二醇化方法:美国专利公开案第 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 号; 美国专利第 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564; 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 5,382,657; 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461; 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339; 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860; 5,980,948; 6,004,573;

6, 129, 912 号 ;WO97/32607、EP229, 108、EP402, 378、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/14758、WO 94/17039、WO 94/18247、WO 94/28024、WO 95/00162、WO 95/11924、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 439508、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 和 EP 154316, 所述专利是以引用的方式并入本文。本文中描述的任何 PEG 分子的可以包括(但不限于)单链、支链、多臂链、单官能的、双官能的、多官能形式或其任何组合的任何形式来使用。

[0432] 增强对血清白蛋白的亲合力

[0433] 也可将各种分子融合到本发明的 hGH 多肽以调节 hGH 多肽在血清中的半衰期。在一些实施例中, 分子连接于或融合到本发明的 hGH 多肽以增强对动物的内源性血清白蛋白的亲合力。

[0434] 举例而言, 在一些情况下, 产生 hGH 多肽和白蛋白结合序列的重组融合体。示范性白蛋白结合序列包括(但不限于)来自链球菌性蛋白质 G 的白蛋白结合域(参见(例如), Makrides 等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542(1996) 和 Sjolander 等人, *J. Immunol. Methods* 201:115-123(1997)), 或白蛋白-结合肽, 诸如描述于(例如) Dennis 等人, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043(2002) 中的所述白蛋白-结合肽。

[0435] 在其他实施例中, 本发明的 hGH 多肽是经脂肪酸酰化。在一些情况下, 脂肪酸促进与血清白蛋白的结合。参见(例如), Kurtzhals 等人, *Biochem. J.* 312:725-731(1995)。

[0436] 在其他实施例中, 本发明的 hGH 多肽是直接与血清白蛋白(包括(但不限于)人血清白蛋白)融合。所属领域的技术人员将认识到, 多种其他分子也可与本发明的 hGH 连接以调节对血清白蛋白或其他血清成分的结合。

[0437] XVI. hGH 多肽的糖基化

[0438] 本发明包括并入一个或一个以上带有糖类残基的非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽。糖类残基可以是天然的(包括(但不限于)N-乙酰氨基葡萄糖)或者非天然的(包括(但不限于)3-氟半乳糖)。糖类可以通过 N-连接的或 O-连接的配糖键(包括(但不限于)N-乙酰基半乳糖-L-丝氨酸)或非天然的键(包括(但不限于)肟或对应的 C-连接的或 S-连接的糖苷)与非天然编码的氨基酸连接。

[0439] 糖类(包括(但不限于)糖基)部分可在活体内或在活体外添加到 hGH 多肽。在本发明的一些实施例中, 包含含有羰基的非天然编码的氨基酸的 hGH 多肽是经用氨基氧基基团衍生的糖类修饰以产生通过肟键连接的对应的经糖基化的多肽。一旦与非天然编码的氨基酸连接, 糖类就可以另外通过用糖基转移酶和其他酶的处理来精制以产生结合于 hGH 多肽的寡糖。参见(例如), H. Liu 等人 *J. Am. Chem. Soc.* 125:1702-1703(2003)。

[0440] XVII. GH 超基因家族成员二聚体和多聚体

[0441] 本发明也提供 GH 超基因家族成员组合(包括(但不限于)hGH 和 hGH 类似物), 诸如同源二聚体、异源二聚体、同源多聚体或异源多聚体(也就是说, 三聚体、四聚体等), 其中诸如含有一个或一个以上非天然编码的氨基酸的 hGH 的 GH 超基因家族成员多肽结合于另一个 GH 超基因家族成员或其变体或为非 GH 超基因家族成员或其变体的任何其他多肽, 其是直接结合于多肽主链或通过连接子结合。由于其与单体相比增加的分子量, 所以诸如 hGH、

二聚体或多聚体结合物的 GH 超基因家族成员可以显示新颖的或所需的性质,包括(但不限于)相对于单体 GH 超基因家族成员的不同的药理学、药物动力学、药效、经调节的治疗半衰期或经调节的血浆半衰期。在一些实施例中,诸如本发明的 hGH、二聚体的 GH 超基因家族成员将调节 GH 超基因家族成员受体的二聚化。在其他实施例中,本发明的 GH 超基因家族成员二聚体或多聚体将充当 GH 超基因家族成员受体拮抗剂、促效剂或调制剂。

[0442] 在一些实施例中,一个或一个以上存在于含有二聚体或多聚体的 hGH 中的 hGH 分子包含与存在于部位 II 结合区域内的水溶性聚合物连接的非天然编码的氨基酸。因而,二聚体或多聚体的 hGH 分子的每一个分子易于通过部位 I 界面结合于 hGH 多肽受体,但不可通过部位 II 界面结合于第二 hGH 多肽受体。因此,hGH 多肽二聚体或多聚体可接合两种相异的 hGH 多肽受体中的每一种受体的部位 I 结合部位,但是因为 hGH 分子具有连接于存在于部位 II 区域中的非遗传编码的氨基酸的水溶性聚合物,所以 hGH 多肽受体不能接合 hGH 多肽配位体的部位 II 区域并且二聚体或多聚体充当 hGH 多肽拮抗剂。在一些实施例中,一个或一个以上存在于含有二聚体或多聚体的 hGH 多肽中的 hGH 分子包含与存在于部位 I 结合区域内的水溶性聚合物连接的非天然编码的氨基酸,使得能够结合于部位 II 区域。或者,在一些实施例中,一个或一个以上存在于含有二聚体或多聚体的 hGH 多肽中的 hGH 分子包含与存在于不是在部位 I 或部位 II 结合区域内的部位处的水溶性聚合物连接的非天然编码的氨基酸,以便两者都可用于结合。在一些实施例中,使用 hGH 分子的组合以使部位 I、部位 II 或两者都可用于结合。至少一种具有可用于结合的部位 I 并且至少一种具有可用于结合的部位 II 的 hGH 分子的组合可以提供具有所要求的活性或性质的分子。另外,具有可用于结合的部位 I 和部位 II 的 hGH 分子的组合可以产生超促效剂 hGH 分子。

[0443] 在一些实施例中,GH 超基因家族成员多肽是直接(包括但不限于)通过 Asn-Lys 酰胺键或 Cys-Cys 二硫键连接。在一些实施例中,经连接的 GH 超基因家族成员多肽和 / 或经连接的非 GH 超基因家族成员将包含不同的非天然编码的氨基酸以促进二聚化。

[0444] 或者,两种 GH 超基因家族成员多肽和 / 或经连接的非 GH 超基因家族成员是通过连接子连接。任何异源或同源双官能连接子可用以连接两种 GH 超基因家族成员和 / 或经连接的非 GH 超基因家族成员,多肽,其可具有相同的或不同的初级序列。在一些情况下,用以将 GH 超基因家族成员和 / 或经连接的非 GH 超基因家族成员,多肽束缚在一起的连接子可为双官能 PEG 试剂。连接子可以具有广泛范围的分子量或分子长度。较大或较小分子量的连接子可用以在 hGH 与经连接的实体之间提供所要求的空间关系或构象。

[0445] 在一些实施例中,本发明提供具有哑铃结构的水溶性双官能连接子,其包括 :a) 至少在聚合物主链的第一末端上的第一官能团 ;和 b) 在聚合物主链的第二末端上的至少一个第二官能团。第二官能团可与第一官能团相同或不同。在一些实施例中,第二官能团是不可与第一官能团反应的。在一些实施例中,本发明提供包含分支分子结构的至少一个臂的水溶性化合物。举例而言,分支分子结构可为树枝状的。在一些实施例中,本发明提供通过与水溶性活化聚合物反应而形成的多聚体,其包含一种或一种以上诸如 hGH 的 GH 超基因家族成员。

[0446] XVIII. 投药和医药组合物

[0447] 本发明的多肽或蛋白质(包括但不限于)hGH、合成酶、包含一个或一个以上非天然氨基酸的蛋白质等)视需要(包括但不限于)与适合的医药载剂组合以用于治疗用途。

举例而言,所述组合物包含治疗有效量的化合物和医药学上可接受的载剂或赋形剂。所述载剂或赋形剂包括(但不限于)盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇和/或其组合。使配方适宜于投药模式。一般而言,投与蛋白质的方法为所属领域的技术人员所知并且可适用于本发明的多肽的投药。

[0448] (视需要)根据为所属领域的技术人员所知的方法,在一种或一种以上适当的活体外和/或活体内动物疾病模型中,测试包含一种或一种以上本发明的多肽的治疗性组合物以确认功效、组织新陈代谢并且估算剂量。具体来说,剂量可最初通过本文中的非天然氨基酸相对于天然氨基酸同系物(包括(但不限于),经修饰以包括一个或一个以上非天然氨基酸的hGH多肽与天然氨基酸hGH多肽的比较)的活性、稳定性或其他适合量度,也就是说在相关检定中加以确定。

[0449] 投药是通过常用于将分子引入与血液或组织细胞的最终接触的任何路线来投药。本发明的非天然氨基酸多肽视需要与一种或一种以上医药学上可接受的载剂一起,以任何适合的方式投与。向患者投与本发明的上下文中的所述多肽的适合的方法是可用的,并且,尽管可使用一种以上的路线来投与具体的组合物,但是具体的路线可常提供比另一种路线更即时和更有效的作用或反应。

[0450] 医药学上可接受的载剂是部分地通过所投与的具体的组合物以及通过用以投与组合物的具体的方法而确定。因此,存在本发明的医药组合物的多种适合的配方。

[0451] 本发明的hGH多肽,可以通过适合于蛋白质或肽的包括(但不限于)非经肠的路线的任何惯用路线投与,例如通过包括(但不限于)皮下或静脉内的注射或任何其他形式的注射或输液来投与。多肽组合物可通过包括(但不限于)经口、静脉内、腹膜内、肌肉内、经皮、皮下、局部、舌下或直肠方式的多种路线投与。包含经修饰或未经修饰的非天然的氨基酸多肽的组合物也能通过脂质体投与。所述投药路线和适当配方通常为所属领域的技术人员所知。包含非天然编码的氨基酸的hGH多肽可以单独使用或与诸如医药载剂的其他适合的组分组合使用。

[0452] 也可将单独的或与其他适合的组分组合的包含非天然的氨基酸的hGH多肽制成待通过吸入投与的气溶胶配方(也就是说,其可为“雾化的”)。可将气溶胶配方放置在诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮,诸如此类的经加压的可接受的推进剂中。

[0453] 适于(诸如)通过关节内(在关节中)、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内和皮下路线方式非经肠投药的配方,包括可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配方与预期接受者的血液等张的溶质的水性和非水性、等张无菌注射溶液,和可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。hGH的配方可存在于诸如安瓿和小瓶的单位剂量或多剂量密封容器中。

[0454] 非经肠投药和静脉内投药是优选的投药方法。具体来说,已用于天然氨基酸同系物治疗剂的投药路线(包括(但不限于),通常用于EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFN、白细胞间介素、抗体和/或任何其他医药学上传递的蛋白质的所述投药路线),连同当前使用的配方提供用于本发明的多肽的优选的投药路线和配方。

[0455] 在本发明的上下文中,投与患者的剂量视应用而定,足以在患者中具有随时间的有益治疗反应,或其他适当的活性。剂量是通过具体的载体或配方的功效,和所使用的非天然氨基酸多肽的活性、稳定性或血清半衰期和患者的病状,以及待治疗的患者的体重或体

表面积加以确定。剂量的大小也通过在具体的患者中的伴随具体的载体、配方等等的投药的任何相反副作用的存在、性质和程度而确定。

[0456] 在确定疾病(包括但不限于)癌症、遗传性疾病、糖尿病、AIDS 等等)的治疗或预防中的待投药的载体或配方的有效量时,医师评定循环血浆水平、配方毒性、疾病的进程和/或(在相关时)抗非天然氨基酸多肽抗体的生产。

[0457] (例如)投与 70 公斤患者的剂量通常在相当于目前所使用的治疗蛋白质的剂量的范围内,其经调整以改变相关组合物的活性或血清半衰期。本发明的载体或医药配方可通过任何已知的惯用疗法,包括抗体投药、疫苗投药、细胞毒素剂、天然氨基酸多肽、核酸、核苷酸类似物、生物反应修饰剂的投药,诸如此类来补充治疗条件。

[0458] 为投药,本发明的配方是以由相关配方的 LD-50 或 ED-50 和/或在各种浓度下,(包括但不限于)当适用于患者的质量和总体健康时,非天然氨基酸多肽的任何副作用的观察所确定的施用率投与。投药可通过单一剂量或分开剂量完成。

[0459] 如果经历注入配方的患者感染发烧、受寒或肌肉疼痛,那么他/她可接受适当剂量的阿斯匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、乙酰胺苯酚或其他疼痛/发烧控制药物。经历诸如发烧、肌肉疼痛和受寒的对输液的反应的患者,在未来输液之前,用阿斯匹林、乙酰胺苯酚或(包括但不限于)苯海拉明(diphenhydramine)先驱用药 30 分钟。派替啶(Meperidine)是用于不能对退热剂和抗组胺快速作出反应的更严重的受寒和肌肉疼痛。视反应的严重性而减慢或中断细胞注入。

[0460] 本发明的人类 hGH 多肽可直接地投与哺乳动物受检者。投药是通过通常用于将 hGH 多肽引入受检者的任何路线进行。尽管在任何给定情况下,最适合的路线将视所治疗的病状的性质和严重性而定,但是根据本发明的实施例的 hGH 多肽组合物包括适于以下投药的所述组合物:经口、直肠、局部、吸入(包括但不限于)通过气溶胶)、面颊(包括但不限于)舌下)、阴道、非经肠(包括但不限于)皮下、肌肉内、皮内、关节内、胸膜内、腹膜内、脑内、动脉内或静脉内)、局部(也就是说,皮肤和粘膜表面,包括气道表面)和经皮投药。投药可为局部的或全身的。化合物的配方可存在于诸如安瓿和小瓶的单位剂量或多剂量密封容器中。本发明的 hGH 多肽可制备于呈单位剂量可注射形式(包括但不限于)溶液、悬浮液或乳液)的与医药学上可接受的载剂的混合物中。本发明的 hGH 多肽也可通过连续注入(使用(包括但不限于)诸如渗透泵的小型真空泵)、快速灌注方式或缓慢释放储存配方来投与。

[0461] 适于投药的配方包括可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配方等张的溶质的水性和非水性溶液、等张无菌溶液,和可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。溶液和悬浮液可从前文描述的种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0462] 冷冻干燥是用于呈现蛋白质的常用技术,其用来从所关注的蛋白质制剂除去水。冷冻干燥或冻干法是待干燥的材料通过其先被冷冻然后通过真空环境中的升华以除去冰或冷冻溶剂的方法。赋形剂可以包括在预先冻干的配方中,以增强在冷冻干燥过程期间的稳定性和/或改善冻干产品存储后的稳定性。Pikal, M. Biopharm. 3(9) 26-30 (1990) 和 Arakawa 等人 Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)。

[0463] 医药品的喷雾干燥也为所属领域的技术人员所知。举例而言,参见 Broadhead, J. 等人, "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm, 18(11&12), 1169-1206 (1992)。除小分子医药品之外,已经将各种生物材料喷雾干燥

并且所述生物材料包括：酶、血清、血浆、微生物和酵母。喷雾干燥是一项有效的技术，因为其可在单步骤方法中将液体药物制剂转化成精细的、无尘的或成团粉末。基本技术包含以下四个步骤：a) 将进料溶液雾化喷雾；b) 喷雾-空气接触；c) 干燥喷雾；和 d) 将干燥产物与干燥空气分离。以引用的方式并入本文的美国专利第 6, 235, 710 和 6, 001, 800 号描述通过喷雾干燥制备重组促红细胞生成素。

[0464] 本发明的医药组合物和配方可以包含医药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。医药学上可接受的载剂是部分地通过所投与的具体的组合物以及通过用以投与组合物的具体的方法而确定。因此，存在本发明的医药组合物(包括可选的医药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂)的多种适合的配方(参见(例如)Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, 1985))。

[0465] 适合的载剂包括(但不限于), 含有琥珀酸盐、磷酸盐、硼酸盐、HEPES、柠檬酸盐、组氨酸或组氨酸衍生物、咪唑、乙酸盐、碳酸氢盐和其他有机酸的缓冲液；包括(但不限于) 抗坏血酸的抗氧化剂；低分子量多肽, 包括(但不限于) 小于约 10 个残基的所述多肽；蛋白质, 包括(但不限于) 血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；包括(但不限于) 聚乙烯吡咯烷酮的亲水聚合物；氨基酸, 包括(但不限于) 甘氨酸、谷胺酰胺、组氨酸或组氨酸衍生物、甲硫氨酸、天门冬酰胺、精氨酸、谷氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物类, 包括(但不限于) 海藻糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；包括(但不限于) EDTA 的螯合剂；二价金属离子, 包括(但不限于) 锌、钴或铜；包括(但不限于) 甘露糖醇或山梨糖醇的糖醇；包括(但不限于) 钠的成盐反离子；和 / 或非离子型表面活性剂, 包括(但不限于) TweenTM (包括(但不限于) Tween80 (聚山梨酸酯 80) 和 Tween20 (聚山梨酸酯 20 ;PS20))、PluronicTM 和其他普卢兰尼克酸(pluronic acid), 包括(但不限于) 普卢兰尼克酸 F68 (泊洛沙姆(poloxamer)188) 或 PEG。适合的表面活性剂(例如) 包括(但不限于) 基于聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷), 也就是说, (PEO-PPO-PEO) 的聚醚, 或基于聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷), 也就是说, (PPO-PEO-PPO) 的聚醚, 或其组合。PEO-PPO-PEO 和 PPO-PEO-PPO 是以商标名 PluronicTM、R-PluronicTM、TetronicsTM 和 R-TetronicsTM (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich) 市售, 并且另外描述于以引用的方式全部并入本文的美国专利第 4, 820, 352 号中。其他乙烯 / 聚丙烯嵌段聚合物可以是适合的表面活性剂。表面活性剂或表面活性剂的组合可以用于稳定经聚乙二醇化的 hGH, 抵抗包括(但不限于) 由搅动产生的应力的一种或一种以上应力。一些上述表面活性剂可以称为“填充剂”。一些也可以称为“张力改质剂”。

[0466] 包括与诸如 PEG 的水溶性聚合物连接的所述多肽的本发明的 hGH 多肽也可通过持续释放系统或作为持续释放系统的部分投与。持续释放组合物包括, (包括(但不限于)) 呈包括(但不限于) 膜或微胶囊的成形物品形式的半渗透的聚合物基质。持续释放基质包括生物相容材料, 诸如聚(甲基丙烯酸 2-羟乙酯) (Langer 等人, J. Biomed. Mater. Res., 15:267-277(1981) ;Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))、乙烯乙酸乙酯(Langer 等人, 同上) 或聚-D-(-)-3-羟丁酸(EP133, 988)、聚丙交酯(聚乳酸) (美国专利第 3, 773, 919 号 ;EP58, 481)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共聚乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物) 聚酐、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman 等人, Biopolymers, 22, 547-556(1983))、聚(原酸)酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨

素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸, 诸如苯丙氨酸、酪氨酸、异白氨酸, 多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅酮。持续释放组合物也包括脂质体诱捕化合物。含脂质体的化合物是通过本身已知的方法制备: DE3, 218, 121; Eppstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:3688-3692(1985); Hwang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77:4030-4034(1980); EP52, 322; EP36, 676; 美国专利第 4, 619, 794 号; EP143, 949; 美国专利第 5, 021, 234 号; 日本专利申请案 83-118008; 美国专利第 4, 485, 045 和 4, 544, 545 号; 和 EP102, 324。所有引用的参考文献和专利是以引用的方式并入本文。

[0467] 经脂质体诱捕的 hGH 多肽可通过描述于(例如) DE3, 218, 121; Eppstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:3688-3692(1985); Hwang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77:4030-4034(1980); EP52, 322; EP36, 676; 美国专利第 4, 619, 794 号; EP143, 949; 美国专利第 5, 021, 234 号; 日本专利申请案 83-118008; 美国专利第 4, 485, 045 和 4, 544, 545 号; 和 EP102, 324 中的方法制备。脂质体的组合物和尺寸是熟知的或能够容易地由所属领域的技术人员根据经验确定。脂质体的一些实例如(例如) Park JW 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA92:1327-1331(1995); Lasic D 和 Papahadjopoulos D(编): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES(1998); Drummond DC 等人, Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B(编): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT(2002); Park JW 等人, Clin. Cancer Res. 8:1172-1181(2002); Nielsen UB 等人, Biochim. Biophys. Acta1591(1-3):109-118(2002); Mamot C 等人, Cancer Res. 63:3154-3161(2003) 中所述。所有引用的参考文献和专利是以引用的方式并入本文。

[0468] 在本发明的上下文中, 给与患者的剂量应足以在受检者中引起随时间的有益反应。通常, 尽管所述有效量易于受治疗判断的控制, 但是每个剂量的非经肠给与的本发明的 hGH 多肽的总医药学有效量是在每天每公斤患者体重的约 0.01 μ g 到约 100 μ g, 或每公斤患者体重约 0.05mg 到约 1mg 的范围内。给药的频率也易受治疗判断的控制, 并且可以具有比批准用于人类的市售 hGH 多肽产品频率更快或更慢的频率。通常, 本发明的经聚乙二醇化的 hGH 多肽可通过上述任何投药路线给与。

[0469] 人们相信, 使用先前的描述所属领域的技术人员可以最大程度利用本发明。以下实例仅为说明性的, 并且无论如何不以任何方式限制权利要求书或本揭示案。

[0470] 实例

[0471] 提供以下实例来说明, 而不是限制所主张的发明。

[0472] 实例 1

[0473] 8 升发酵

[0474] 所述实例描述用于包含非天然的氨基酸的 hGH 多肽的表达方法。宿主细胞是经用于正交 tRNA、正交氨酰基 tRNA 合成酶和编码包含选择密码子的 hGH 多肽的多核苷酸的构筑体来转形。

[0475] 制备

[0476] 制备无菌的碱, 即 5.5M 碳酸钾(0.5L) 并且通过蒸汽或过滤杀菌。制备诸如 Struktol J673(0.1L) 的无菌的 25%v/v 聚亚烷基消泡剂并且通过蒸汽杀菌。不需要酸。制备浓缩进料培养基(4L, 规定的) 并且过滤杀菌到无菌的进料槽或生物处理袋中。

[0477] 设定发酵罐。用 3.91L 碱盐溶液将其杀菌。使发酵罐达到以下条件: 温度 =37°C、

pH=6.9、1VVM 空气。将 0.092L 浓缩进料培养基添加到发酵罐。添加 4mL 的 50mg/mL 卡那霉素(kanamycin)。

[0478] 制备甘油和阿拉伯糖(视需要酵母提取物)以及以下试剂的溶液:

[0479] 痕量金属(经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)

	组分	g/l
[0480]	柠檬酸钠	74
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	27
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
	MnSO ₄ ·nH ₂ O	2
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.3
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
	H ₃ BO ₃	0.5

[0481] 维生素(经过滤杀菌)

	组分	g/l
[0482]	烟酸	6.1
	泛酸	5.4
	吡哆醇.HCl	1.4
	硫胺素.HCl	1
	核黄素	0.42
	生物素	0.06
	叶酸	0.04

[0483] 葡萄糖(经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)

	组分	g/l	l
[0484]	葡萄糖	600	1.8-2

[0485] 1M MgSO₄ (经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)

	组分	g/l
[0486]	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246

[0487] 硫酸铵, 400g/l (经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)

	组分	g/l
[0488]	硫酸铵	400

[0489] 5.5M K₂CO₃ (经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)

	组分	g/l 或 l/l
[0490]	K ₂ CO ₃	760
	H ₂ O	0.76

[0491] 1M L- 白氨酸(经过滤杀菌)

		组分	g/l 或 l/l
[0492]		L-白氨酸	131
		浓 HCl	0.1
[0493]	1M L- 异白氨酸 (经过滤杀菌)		
		组分	g/l 或 l/l
[0494]		L-异白氨酸	131
		浓 HCl	0.1
[0495]	碱盐, 1X (经蒸汽杀菌或经过滤杀菌)		
		组分	g/l 或 l/l
[0496]		Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	15.4
		KH ₂ PO ₄	6.8
		NH ₄ Cl	4
[0497]	浓缩进料		
		组分	l/l
		硫酸铵溶液	0.194
		葡萄糖溶液	0.537
[0498]		镁溶液	0.029
		痕量金属浓溶液	0.045
		维生素浓溶液	0.045
		L-异白氨酸	0.054
		L-白氨酸	0.096
[0499]	分批培养基		
		组分	g/l 或 l/l
[0500]		碱盐溶液, IX	0.977
		浓缩进料培养基	0.023
[0501]	工艺		
[0502]	按表 2 所指示描述所执行的工艺。		
[0503]			

天	计时	时间 (hr)	操作
-2	0800	-46	2 mL 起子培养物是由 1 μ L 甘油储料开始。在 37°C、250 rpm 下，摇动培养物直到 $OD_{600} = 2-6$ 。
-1	0800	-22	将 150 μ L 的起子培养物转移到摇瓶中的 150 mL 的合成培养基。在 28-37°C 与通风下，将培养物培养直到 $OD_{600} = 2-5$ 。
1	0600	0	将 100 mL 的种子培养物转移到发酵罐。
1	1400	8	启动进料泵。所述泵的准确定时是通过培养物耗尽分批养分的时间来规定。通过 19.5 小时，使用预设的进料时间表，将大致 2.6 L 的浓缩进料培养基供应给培养物。最小进料速率是 0.31 毫升/分钟并且最大进料速率是 6 毫升/分钟。如果需要，那么用搅动和 O_2 补充的串联来控制 DO (溶解氧)。
2	0830	26.5	将 200 mL 丸状的 80%甘油添加到培养物，同时维持浓缩进料的进料时间表。
2	0930	27.5	断开浓缩进料。将进料改变成 40%甘油溶液，并且净化进料管。停止进料。添加非天然的氨基酸 pAF 达到 4 mM 的最终浓度。用 8 mL 丸状的 20%阿拉伯糖诱导培养物。
2	1130	29.5	接通 40%甘油进料。
2	1930	37.5	收集细胞。紧密湿细胞密度是 0.2-0.3 kg/L。在 -80°C 下冷冻细胞团。

[0504]

[0505] 进料时间表按表 3 中所指示，并且发酵进料流动速率如图 1 所示。也参见图 2。

[0506]

近似时间 (h)	流动速率 (ml/min)	注释
0	0	指示的时间是培养后。
8	0	
8	0.31	流动速率从一个设定点线性增加到下一个设定点。
10	0.42	
12	0.57	
14	0.77	
16	1.04	
18	1.40	
20	1.90	
22	2.57	
24	3.47	
26	4.69	
27.5	6.00	用 40%甘油净化管线后, 在 27.5 小时断开流动。
27.5	0.00	
29.5	0	
29.5	1.90	在 29.5 小时接通 40%甘油进料。
37.5	1.90	
37.5	0	收集发酵。

[0507] 对所述方案的修改已经在诱导步骤(步骤 IV)和收集步骤(步骤 V)完成。在培养物达到约 100 到约 120 的 OD_{600} 后, a) 在诱导前 1.5 小时传递甘油丸剂; b) 添加 pAF 并且在诱导前 1 小时转换成酵母提取物 / 甘油进料; c) 在诱导前 0 小时添加阿拉伯糖; d) 完成诱导历时 8 小时。

[0508] 实例 2

[0509] hGH 纯化、聚乙二醇化和 hGH-PEG 纯化方法

[0510] 来自大肠杆菌的细胞质制剂

[0511] 1. 细胞溶解作用 & hGH 氧化

[0512] 使 850 克细菌细胞小球再悬浮于 2550ml (3 体积) 的 20mM TRIS、pH8.5 溶解缓冲液中以获得为 25% 固体的混合物。大致 4 升的发酵液中的培养物将产生所述 850 克细菌小球。在室温下将混合物搅拌 30-60 分钟, 并且使悬浮液两次通过微流化床处理器, 同时在 15,000psi 下冷却。在 4°C 下, 在 JA10 旋转器中以 $13,500 \times g$ 将溶解产物离心, 并且收集上层清液。添加新鲜制备的 0.1M GSSG (FW612.6) 以便 GSSG 与 hGH 的摩尔比率大致为 16。将组合搅拌达到充分混合, 并且用 1M NaOH 将 pH 值调节到 7.2-7.4。在 4°C 下将混合物搅拌整夜后, 用水将其稀释直到其电导率是 1.6-1.9mS/cm。将样品指定为带有批号的 GHQFF 填料。

[0513] 2. 管柱 1-Q 琼脂糖凝胶 FF 色谱法

[0514] 柱尺寸如下所示: INDEX100/500, 100mm I.D. \times 21.5cm=1688ml。GHQFF 缓冲液 A 由 pH6.5 具有 0.5mS/cm 的电导率的 10mM Bis-TRIS 组成, 并且 GHQFF 缓冲液 B 由 pH6.5 具有 90mS/cm 的电导率的 1M NaCl 组成。对处理样品来说, 流动速率是 90ml/min, 并且对清洗来说, 流动速率是 40ml/min。

[0515] 使 AKTA 系统去热源。为使 QFF 管柱去热源并且平衡,使用“QFF 去热源平衡”程序:用 2 个柱体积的 MilliQ 水、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤管柱,培养 30 分钟,用 3 个柱体积的 GHQFF 缓冲液 B 洗涤,然后用 4 个柱体积的 GHQFF 缓冲液 A 平衡。

[0516] 将样品 GHQFF 填料加载到阴离子交换柱上。用 5 个柱体积的 GHQFF 缓冲液 A 洗涤管柱,并且用 4 个柱体积的在 A 中的 6%GHQFF 缓冲液 B 洗提。收集主峰。以大致 0.85mS/cm 和 166mAU 开始样品收集并且以大致 220mAU 结束。将经收集的洗提液指定为带有批号的 GHQFF 池,并且其颜色是褐橙色。在 4℃ 下将池存储整夜。3 个批次的平均步骤产率是 84.7%。

[0517] 用 2-3 个柱体积的 GHQFF 缓冲液 B 洗涤管柱。用泵将 2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 吸入,并且将管柱培养 1-6 天。如果在 6 天内不使用管柱,那么用 1 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl、3 个柱体积的缓冲液 B、2 个柱体积的 MilliQ 水和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 将其冲洗。

[0518] 每 3-5 次循环进行一次管柱的大范围的清洁。在 1M NaOH/1M NaCl 培养后,执行以下步骤:用 2.5 个柱体积的 Q 管柱清洁缓冲液向上流动洗涤,培养 60-80 小时,用 1.5 个柱体积的 MilliQ 水、1 个柱体积的 0 到 70%EtOH、5 个柱体积的 70%EtOH、2.5 个柱体积的 20%EtOH 洗涤。Q 管柱清洁缓冲液由 0.5%Triton X-100、0.1M 乙酸组成。

[0519] 3. UF/DF (超滤 / 透滤) I

[0520] 以下过滤器用于所述程序:Sartorius Sartocon Slice10K Hydrosart 盒, 1000cm²。将 GHQFF 池样品浓缩缩减到约 450ml (或在保留物烧瓶中,约 200ml)。然后,用 pH6.3 的由 10mM Bis-TRIS、1mM MgCl₂ 组成的 2.7L (6- 体积) 的 GHCHT 缓冲液 A 透滤。收集保留物之后,用 300ml 的缓冲液冲洗系统并且将冲洗液与保留物组合。在 4,000rpm (2,862×g) 下将保留物离心 5 分钟,并且收集上层清液。将上层清液指定为带有批号的 GHCHT 填料。所述样品是在 2 小时内处理或在 4℃ 下存储整夜。

[0521] 4. 管柱 2- 陶瓷羟磷灰石 (CHT) 色谱法 (I 型 CHT, 40 μm)

[0522] 柱尺寸如下:INDEX100/500,100mm I.D. × 10.5cm=824ml。GHCHT 缓冲液 A 由 10mM Bis-TRIS、1mM MgCl₂ 组成, pH6.3, 具有 0.94mS/cm 的电导率。GHCHT 缓冲液 B 由 10mM Bis-TRIS、0.5M MgCl₂ 组成, pH6.3, 具有 80.5mS/cm 的电导率。对处理来说,流动速率是 90ml/min,并且对清洗来说,流动速率是 40ml/min。

[0523] 使 AKTA 系统去热源。为使 CHT 管柱去热源并且平衡,运行“CHT 去热源平衡”程序:用 2 个柱体积的 MilliQ 水、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤 CHT 管柱,培养 30 分钟,用 3 个柱体积的 0.5M NaPO₄/pH7.0 洗涤,然后用 4 个柱体积的 GHCHT 缓冲液 A 平衡。然后将 GHCHT 填料样品加载到管柱上。用 5 个柱体积的 GHCHT 缓冲液 A 洗涤管柱。

[0524] 用超过 5 个柱体积的 0-40%GHCHT 缓冲液 B 的线性梯度、超过 3 个柱体积 40%GHCHT 缓冲液 B 的步进梯度执行洗提,并且用超过 2 个柱体积的 100%GHCHT 缓冲液 B 洗涤。收集主峰。以大致 26mAU、20mS/cm、28%GHCHT 缓冲液 B 开始收集,并且以大致 86mAU、34mS/cm、40%GHCHT 缓冲液 B 结束。将所收集的洗提液指定为带有批号的 GHCHT 池。在 4℃ 下将池存储整夜。3 个批次的平均步骤产率是 96.3%。

[0525] 用 3 个柱体积的 0.5M NaPO₄/pH7.0 洗涤 CHT 管柱。使管柱留在所述磷酸盐缓冲液中,或执行以下步骤:用 2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl、3 个柱体积的 0.5M NaPO₄/pH7.0、2.5 个柱体积 MilliQ 水和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 向上流动洗涤管柱。

[0526] 5. 管柱 3- 苯基琼脂糖凝胶 HP 色谱法

[0527] 柱尺寸如下: INdEX100/500, 100mm I. D. × 9. 7cm = 761ml。GHPhe 缓冲液 A 由 20mM NaPO₄、2M NaCl 组成, pH7. 0, 具有 163mS/cm 的电导率, 并且 GHPhe 缓冲液 B 由 20mM NaPO₄ 组成, pH7. 0, 具有 3. 2mS/cm 的电导率。对处理样品来说, 流动速率是 90ml/min, 并且对清洗来说, 流动速率是 40ml/min。

[0528] 使 AKTA 系统去热源。为使 Phe 管柱去热源并且平衡, 运行“PheHP 去热源平衡”程序: 用 2 个柱体积的 MilliQ 水、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤管柱, 培养 30 分钟, 然后用 4 个柱体积的 GHPhe 缓冲液 A 平衡。

[0529] 将固体 NaCl 添加到 GHCHT 池达到 2M。在室温下将混合物搅拌 1-2 小时达到溶解, 并且使溶液升温到大致 20°C。为计算所需的 NaCl 的量(Z g): $(V+Z/4000) \times 2 \times 58. 44 = Z$, 或 $Z = 116. 88V / (1 - 116. 88/4000)$, 其中 V 是以升计的 GHCHT 池的体积。

[0530] 将 GHCHT 池 +NaCl 混合物加载到管柱上。用 3 个柱体积的 GHPhe 缓冲液 A 洗涤管柱。用以下复合梯度执行洗提: 超过 3 个柱体积的 10% 步进的 GHPhe 缓冲液 B、超过 7 个柱体积的 10-80%GHPhe 缓冲液 B 梯度、超过 2 个柱体积的 80%GHPhe 缓冲液 B 步进梯度和超过 3 个柱体积的 100%GHPhe 缓冲液 B 步进梯度。收集主峰。以大致 17. 3mAU、111mS/cm、46. 7%GHPhe 缓冲液 B 开始收集并且以大致 43mAU、54mS/cm、80%GHPhe 缓冲液 B 结束。将所收集的洗提液指定为带有批号的 GHPhe 池并且其是无色溶液。在 2 小时内执行下一个步骤, 或在 4°C 下将池存储整夜。3 个批次的平均步骤产率是 94. 6%。

[0531] 用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱, 培养 30min, 用 3 个柱体积的 GHPhe 缓冲液 A、3 个柱体积的 MilliQ 水和 2. 5 个柱体积的 20%EtOH 洗涤。3-5 次循环后, 用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱, 培养 30min, 用 3 个柱体积的 GHPhe 缓冲液 A、3 个柱体积的 MilliQ 水、超过 1 个柱体积的 0-70%EtOH、3 个柱体积的 70%EtOH 洗涤, 并且存储在 20%EtOH 中。

[0532] 6. UF/DF (超滤 / 透滤) II

[0533] 以下过滤器用于所述程序: Sartorius Sartocoon Slice10K Hydrosart 盒, 1000cm²。将 GHPhe 池浓缩缩减到约 450ml (或在保留物烧瓶中, 约 200ml)。然后用 2. 7L (6- 体积) 的 GH 配方缓冲液将其透滤, 所述 GH 配方缓冲液由 20mM 柠檬酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇组成, pH6. 0。将样品浓缩缩减到约 360ml。收集保留物。用 300ml 的 GH 配方缓冲液冲洗系统并且将冲洗液与保留物组合。在 4, 000rpm (2, 862×g) 下将保留物离心 5 分钟, 并且收集上层清液。将上层清液指定为 Y35pAF-cBx, 并且也称为“处理中的主体 (in-process bulk)”。将处理中的主体等分并且在 -80°C 下存储。

[0534] Y35pAF 的总产量是每升发酵液 435mg。基于 3 种 HPLC 方法 (RP-HPLC、SEC-HPLC、IEX-HPLC) 和 SDS-PAGE 分析, 纯度是 >90%。

[0535] 7. UF/DF (超滤 / 透滤) IIa

[0536] 以下浓缩器 / 过滤器用于所述程序: 具有 YM10 膜 (63. 5mm) 的 Amicon Stirred Cell (200ml)。反应缓冲液由 20mM 乙酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇、1mM EDTA 组成, pH4. 0。使用来自步骤 6 的一部分处理中的主体, 诸如 250mg 的 Y35pAF, 并且通过添加 10-12% (v/v) 的 10% 乙酸将 pH 值调节到大致 4。将样品浓缩缩减到 25-50ml, 并且添加反应缓冲液达到大致 180ml。重复处理直到达到总共 >500 倍的缓冲液更换。将样品浓缩到大

致 25ml。收集保留物,并且在 $2,000 \times g$ 下离心 3 分钟以除去任何沉淀物。将上层清液指定为带有日期的 Y35pAF-cBx/pH4。

[0537] Y35pAF-cBx/pH4 的蛋白质浓度是通过测量经 20 倍稀释的样品的 A_{276} , 使用 $A_{276}^{1\text{mg/ml}}=0.818$ 来确定。通过用反应缓冲液稀释将 Y35pAF-cBx/pH4 的浓度调节到 8mg/ml。

[0538] 8. 聚乙二醇化反应

[0539] 使用 PEG:Y35pAF=10 的摩尔比率来计算 30K MPEG- 羟基胺所需的量。将 PEG 粉末称重并且在室温下缓慢添加到 8mg/ml Y35pAF 溶液中,并且在各次添加后用刮勺混合。将反应混合物置于 28°C 下,同时轻轻摇动 18-48 小时。通过 SDS 凝胶法确认聚乙二醇化。反应在 hGH 与 PEG 之间形成胍键。

[0540] 9. 管柱 4- 源极 Q 色谱法 (Source Q Chromatography) ($30 \mu\text{m}$)

[0541] 柱尺寸如下: XK26/20, 26mm I. D. \times 17cm=90ml。源极 Q 缓冲液 A 由 10mM TRIS 组成, pH7.0, 具有 0.9mS/cm 的电导率。源极 Q 缓冲液 B 由 10mM TRIS、1M NaCl 组成, pH7.0, 具有 93mS/cm 的电导率。流动速率是 6ml/min。

[0542] 使 AKTA 系统去热源。为使源极 Q 管柱去热源并且平衡,运行“源极 Q 去热源平衡”程序:用 2 个柱体积的 MilliQ 水、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤源极 Q 管柱,培养 30 分钟,用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 B 洗涤,然后用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 平衡。

[0543] 将 20% (v/v) 的 0.5M TRIS 碱添加到来自步骤 8 的反应混合物。用 9- 体积的源极 Q 缓冲液 A 和 10- 体积的 MilliQ 水执行 20 倍稀释。然后将混合物加载到管柱上。用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 洗涤管柱。用超过 20 个柱体积的 0-10% 源极 Q 缓冲液 B 的线性梯度执行洗提。收集第一主峰。将所收集的洗提液指定为带有批号的源极 Q 池。在 4°C 下将池存储整夜。

[0544] 10. UF/DF (超滤 / 透滤) III

[0545] 以下浓缩器 / 过滤器用于所述程序:具有 YM10 膜 (63.5mm) 的 Amicon Stirred Cell (200ml)。WHO 缓冲液由 2.5g/L NaHCO_3 、20g/L 甘氨酸、2g/L 甘露糖醇、2g/L 乳糖组成, pH7.3。

[0546] 将源极 Q 池浓缩到 20-30ml, 并且添加 WHO 缓冲液达到大致 180ml。重复处理直到已经达到总共 >600 倍的缓冲液更换。然后将样品浓缩到 2mg/ml 或所要求的浓度。收集保留物,并且在通风橱中用 $0.2 \mu\text{m}$ 膜过滤杀菌。将无菌的样品指定为带有批号的 PEG30-cY35pAF。

[0547] PEG30-cY35pAF 的当量 hGH 浓度是通过测量经稀释的样品的 A_{276} , 通过使用 $A_{276}^{1\text{mg/ml}}=0.818$ 来确定, 进行三次稀释和测量。来自步骤 7 的总产率是大约 20%。基于 HPLC 和 SDS-PAGE 分析, PEG-Y35pAF 纯度是 $>95\%$ 。

[0548] 实例 3

[0549] hGH 纯化、聚乙二醇化和 hGH-PEG 纯化方法

[0550] 来自大肠杆菌的周质制剂

[0551] 1. hGH 的周质释放

[0552] 将从大致 4 升发酵液获得的 800 克细菌细胞小球再悬浮于 3200ml (4- 体积) 的 $4-6^{\circ}\text{C}$ PR 缓冲液 (50mM TRIS、2mM EDTA、0.07% Triton X-100, pH8.0; 电导率 = 3mS/cm) 中以获得 20% 固体。在 $4-6^{\circ}\text{C}$ 下将悬浮液搅拌 1 小时后, 添加 150ml 的 8M 尿素以获得 0.3M 的最

终尿素浓度。然后,在 4-6℃下将所述悬浮液搅拌 1 小时。在 4℃下,在 J20 旋转器(Avanti J20XP 离心机-Beckman Coulter)中,在 15,000×g 下将悬浮液离心 25 分钟。收集上层清液,测量其体积(大致 3.4L)。将样品指定为带有日期和批号的 PRS。

[0553] 2. UF/DF (超滤 / 透滤) I

[0554] 以下过滤器用于所述程序:Sartorius Sartocan Slice10K Hydrosart 盒, 1000cm²。其他参数包括:80 毫升 / 分钟的滤液流动速率和大致 14psi 的 TMP。

[0555] 用 1N NaOH 将系统去热源,并且容许循环 30-45 分钟。用大致 2 升的 MilliQ 水冲洗系统直到 pH 降到 8 以下。平衡是用 QFF 缓冲液 A (10mM Bis-TRIS, pH6.5) 历时至少 5 分钟完成。将 PRS 浓缩缩减到大致 1.6 升(或在保留物容器中,大致 1.4 升)。然后用 5- 体积(约 7 升)的 QFF 缓冲液 A 将其透滤。收集保留物之后,用 300ml 的缓冲液冲洗系统并且将冲洗液与保留物组合。将所组合的样品指定为带有批号的 QFF 填料。其是褐色的。在 2 小时内处理所述样品或将其在 4℃下存储整夜。

[0556] 用 MilliQ 水冲洗系统并且通过循环 30-45 分钟,用 1N NaOH 清洁。然后,用 MilliQ 水完成冲洗直到 pH 值小于 8。将盒存储在 0.1N NaOH 中。

[0557] 3. 管柱 1-Q 琼脂糖凝胶 FF 色谱法

[0558] 柱尺寸如下:50mm I. D. ×6.3cm=123ml (XK26/20 管柱)。流动速率是 35ml/min。QFF 缓冲液 A 由 10mM Bis-TRIS 组成,pH6.5,具有 0.6mS/cm 的电导率。高盐缓冲液由 10mM TRIS、2M NaCl 组成,pH7.0,具有 156mS/cm 的电导率。QFF 缓冲液 B 由 10mM Bis-TRIS、0.1M NaCl 组成,pH6.5,具有 11.5mS/cm 的电导率。

[0559] 使 AKTA 系统去热源。为完成所述处理,运行“AKTA 去热源”程序 3 次:在第一次运行程序时,将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中,然后第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养,并且在第三次运行时,再次将缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。运行“QFF 去热源平衡”程序以使 QFF 管柱去热源和平衡:用 2 个柱体积的 MilliQ H₂O、2 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl 洗涤 QFF 管柱,培养 30min,用 3 个柱体积的高盐缓冲液洗涤,然后用 4 个柱体积的 QFF 缓冲液 A 平衡。

[0560] 然后将 QFF 填料加载到管柱上。用 5 个柱体积的 QFF 缓冲液 A 和 5.5 个柱体积的在 A 中的 15%QFF 缓冲液 B 洗涤管柱。用 4.5 个柱体积的在 A 中的 60%QFF 缓冲液 B 执行洗提,并且收集洗提峰。将所收集的洗提液指定为带有批号的 QFF 池,并且其是淡黄色。在 4℃下将池存储整夜。

[0561] 用 3 个柱体积的高盐缓冲液洗涤管柱。然后,用泵将 3 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl 吸入,并且历时 1-6 天进行培养。如果在 6 天内不使用管柱,那么用 1 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl、3 个柱体积的高盐缓冲液、3 个柱体积的 MilliQ H₂O 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 或 10mM NaOH 将其冲洗。每 3-5 次循环进行一次管柱的大范围清洁以便在 1N NaOH/1M NaCl 培养后,用 3 个柱体积的 Q 管柱清洁缓冲液(0.5%Triton X-100、0.1M 乙酸)向上流动将其洗涤,培养 60-80 小时,用 1.5 个柱体积的 MilliQ H₂O、1 个柱体积的 0 到 70%EtOH,5 个柱体积的 70%EtOH 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 洗涤。

[0562] 4. 管柱 2- 苯基琼脂糖凝胶 HP 色谱法

[0563] 柱尺寸如下:50mm I. D. ×7.5cm=147ml(XK26/20 管柱)。流动速率是 35 毫升 / 分钟。Phe 缓冲液 A 由 10mM TRIS、2M NaCl 组成, pH7.0, 具有 156mS/cm 的电导率。Phe 缓冲

液 B 由 10mM TRIS 组成, pH7.0, 具有 0.9mS/cm 的电导率。

[0564] 使 AKTA 系统去热源。运行“AKTA 去热源”程序 3 次:在第一次运行程序时,将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中,然后第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养,然后在第三次运行时,再次将所有缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。运行“PheHP 去热源平衡”程序以使 Phe 管柱去热源和平衡:用 2 个柱体积的 MilliQH₂O、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤管柱,培养 30min,然后用 4 个柱体积的 Phe 缓冲液 A 平衡。

[0565] 将固体 NaCl 添加到 QFF 池达到 2M。在室温下将混合物搅拌 1-2 小时以溶解 NaCl,并且将溶液升温到大致 20°C。计算所需的 NaCl 的量(Z g):(V+Z/4000)×2×58.44=Z,或 Z=116.88V/(1-116.88/4000),其中 V 是以升计的 QFF 池的体积。

[0566] 将 QFF 池 +NaCl 加载到管柱上。用 5 个柱体积的 Phe 缓冲液 A 洗涤管柱。用以下复合梯度执行洗提:超过 10 个柱体积的 0-45%B 线性梯度、超过 2 个柱体积的 45%B 步进梯度和超过 3 个柱体积的 100%B 步进梯度。在梯度洗提期间收集主峰。将所收集的洗提液指定为带有批号的 Phe 池,并且其是无色溶液。执行下一步或在 4°C 将池存储。

[0567] 用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱,培养 30min,用 3 个柱体积的 Phe 缓冲液 A、3 个柱体积的 H₂O 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 或 10mM NaOH 洗涤。3-5 次循环后,用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱,培养 30min,用 3 个柱体积的 GH Phe 缓冲液 A、3 个柱体积的 H₂O、超过 1 个柱体积的 0-70%EtOH、3 个柱体积的 70%EtOH 洗涤,并且最终存储在 20%EtOH 中。

[0568] 5. UF/DF (超滤 / 透滤) II

[0569] 以下过滤器用于所述程序:Sartorius Sartocoon Slice10K Hydrosart 盒,200cm²。其他参数包括:15ml/min 的滤液流动速率和 14psi 的 TMP。初步配方缓冲液由 20mM 柠檬酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇组成, pH6.0, 具有 4.7mS/cm 的电导率。

[0570] 用 1N NaOH 将系统去热源,并且容许循环 30-45 分钟。用大致 2 升的 MilliQ 水冲洗系统直到 pH 值降到 8 以下。用初步配方缓冲液完成平衡历时至少 5 分钟。

[0571] 将 GH Phe 池浓缩缩减到约大致 350ml (或在保留物烧瓶中,大致 200ml)。用 2.1 升(6- 体积)的初步配方缓冲液完成透滤。然后,将样品浓缩缩减到大致 350ml,并且收集保留物。用 300ml 的缓冲液冲洗系统并且将冲洗液与保留物组合。在 4,000rpm (2,862×g) 下将保留物离心 5 分钟,并且收集上层清液。将上层清液指定为 Y35pAF-pBx,并且也称为“处理中的主体”。

[0572] Y35pAF-pBx 的蛋白质浓度是通过测量经稀释的样品的 A₂₇₆,使用 A₂₇₆^{1mg/ml}=0.818 来确定。可在 4°C 下存储处理中的主体。为进行长期存储,将其等分并且保持在 -80°C。

[0573] 用 MilliQ 水冲洗系统并且通过循环 30-45 分钟,用 1N NaOH 来清洁。然后,用 MilliQ 水将其冲洗直到 pH 值在 8 以下。将盒存储于 0.1N NaOH 中。

[0574] 6. UF/DF (超滤 / 透滤) IIa

[0575] 使用以下浓缩器 / 过滤器:具有 YM10 膜(76mm)的 Amicon Stirred Cell(350ml)。反应缓冲液由以下物质组成:20mM 乙酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇、1mMEDTA, pH4.0, 具有 2.6mS/cm 的电导率。

[0576] 用 Pyroclean 将系统去热源。在 Pyroclean 中将所有组分培养 30 分钟。完成使用 MilliQ 水进行的冲洗直到 A₂₀₅ 小于 0.01。

[0577] 通过添加 10–12% (v/v) 的 10% 乙酸, 将一部分处理中的主体 (诸如 300mg) 的 pH 值调节到大致 4。将所述样品浓缩缩减到 25–50ml, 并且添加反应缓冲液达到大致 350ml。重复处理直到达到总共 >500 倍的缓冲液更换。然后, 将样品浓缩到大致 30ml。收集保留物, 并且在 $2,000 \times g$ 下离心 3 分钟以除去任何沉淀物。将上层清液指定为带有日期的 Y35pAF-pBx/pH4。为进行长期存储, 将其等分并且保持在 -80°C 。

[0578] Y35pAF-pBx/pH4 的蛋白质浓度是通过测量经 20 倍稀释的样品的 A_{276} , 通过使用 $A_{276}^{1\text{mg/ml}}=0.818$ 来确定。通过用反应缓冲液进行稀释, 将 Y35pAF-pBx/pH4 的浓度调节到 8mg/ml。

[0579] 7. 聚乙二醇化反应

[0580] 使用 PEG:Y35pAF=5 的摩尔比率来计算 30K MPEG- 羟基胺所需的量。将 PEG 粉末称重并且在室温下缓慢添加到 8mg/ml Y35pAF-pBx/pH4 溶液, 同时搅拌。在 28°C 下, 在轻轻搅拌下, 将反应混合物放置 39–50 小时。通过执行 SDS-PAGE 确认聚乙二醇化。反应在 hGH 与 PEG 之间形成胍键。

[0581] 8. 管柱 3- 源极 Q 色谱法 (30 μm)

[0582] 柱尺寸如下: XK26/20, 26mm I. D. \times 17cm=90ml。流动速率是 8 毫升 / 分钟。源极 Q 缓冲液 A 由 10mM TRIS 组成, pH7.0, 具有 0.9mS/cm 的电导率。源极 Q 缓冲液 B 由 10mM TRIS、1M NaCl 组成, pH7.0, 具有 87mS/cm 的电导率。

[0583] 为将 AKTA 系统去热源, 运行“AKTA 去热源”程序 3 次: 在第一次运行程序时, 将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中, 并且在第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养, 并且在第三次运行时, 再次将所有缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。为使源极 Q 管柱去热源并且平衡, 运行“源极 Q 去热源平衡”程序: 用 2 个柱体积的 MilliQ H_2O 、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤源极 Q 管柱, 培养 30 分钟, 用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 B 洗涤, 然后用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 平衡。

[0584] 将 20% (v/v) 的 0.5M TRIS 碱添加到来自先前步骤的反应混合物。用 9- 体积的源极 Q 缓冲液 A 和 10- 体积的 MilliQ H_2O 执行 20 倍稀释。使经稀释的物质通过 0.45 μm 过滤器。然后将滤液加载到管柱上。用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 洗涤管柱。用超过 20 个柱体积的 0–10% 源极 Q 缓冲液 B 的线性梯度执行洗提。Frac-950 用于以 13 毫升 / 洗提馏分收集馏分。在第一主峰上运行 SDS-PAGE 以测定池。将所汇集的馏分指定为带有批号的源极 Q 池。在 4°C 下将池存储整夜。

[0585] 9. UF/DF (超滤 / 透滤) III

[0586] 使用以下浓缩器 / 过滤器: 具有 YM10 膜 (76mm) 的 Amicon Stirred Cell (350ml)。初步配方缓冲液由 20mM 柠檬酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇组成, pH6.0, 具有 4.7mS/cm 的电导率。

[0587] 用 Pyroclean 使系统去热源。在 Pyroclean 中将所有组分培养 30 分钟。完成使用 MilliQ 水进行的冲洗直到 $A_{205} < 0.01$ 。

[0588] 将源极 Q 池浓缩到 20–40ml, 并且添加初步配方缓冲液达到大致 350ml。重复处理直到达到总共 >600 倍的缓冲液更换。将样品浓缩到 2mg/ml 或所要求的浓度。收集保留物, 并且在通风橱中用 0.2 μm 膜过滤杀菌。将无菌的样品指定为带有批号的 PEG30-pY35pAF。

[0589] PEG30-pY35pAF 的当量 hGH 浓度是通过测量经稀释的样品的 A_{276} , 通过使用 $A_{276}^{1\text{mg/}}$

$m^1=0.818$ 来确定,并且进行三次稀释和测量。可在 4°C 下存储 PEG30-pY35pAF。为进行长期存储,将其等分并且保持在 -80°C。

[0590] 已经用 araB 基因被剔除的 DH10B (fis) 和 W3110 的菌株完成周质释放制剂。两种菌株是经正交 tRNA、正交氨酰基 tRNA 合成酶和 hGH 构筑体转形。基于 HPLC 和 SDS-PAGE 分析,PEG-Y35pAF 纯度 >95%。

[0591] 实例 4

[0592] 比较 hGH 制剂:周质释放对比细胞质(均化作用)

[0593] 图 3,板 A 和 B 展示在大肠杆菌中生产的 hGH 的 SDS-PAGE 分析。制造周质释放批次(发酵批 050425B2 ;800 克的细胞团)和细胞质批次(通过微流化床溶解;发酵批 050414B1 ;60 克的细胞团)。在 123ml Q FF 管柱上,用由 10mM Bis-TRIS 组成,pH6.5 的 QFF 缓冲液 A 和由 10mM Bis-TRIS,pH6.5,0.1M NaCl 组成的 QFF 缓冲液 B 运行各个批次。在洗提期间执行 3 种馏分:15、60 和 100% 缓冲液 B(分别为 15mM NaCl、60mM NaCl 和 100mM NaCl)。通过 SDS-PAGE 分析来自分离的等分试样。板 A 和 B 的泳道如下:泳道 1=WHO hGH 标准;泳道 2=填料;泳道 3=BE/FT;泳道 4=15% 缓冲液 B;泳道 5=60% 缓冲液 B;和泳道 6=100% 缓冲液 B。

[0594] 实例 5

[0595] 5 升发酵方法

[0596] 所述实例描述用于包含非天然的氨基酸的 hGH 多肽的表达方法。所使用的宿主细胞的菌株是经修饰的 W3110 细胞系。宿主细胞是经用于正交 tRNA、正交氨酰基 tRNA 合成酶和编码包含选择密码子的 hGH 多肽的多核苷酸的构筑体来转形。工艺流程如图 4 所示。

[0597] 制备

[0598] 制备以下试剂:

[0599] 痕量元素(经蒸汽杀菌)

组分	g/l
柠檬酸钠	74
FeCl ₃ .6H ₂ O	27
CoCl ₂ .6H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3
MnSO ₄ .nH ₂ O	2
CuCl ₂ .2H ₂ O	1.3
CaCl ₂ .2H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	0.5

[0601] 维生素(经过滤杀菌)

组分	g/l
烟酸	6.1
泛酸	5.4
吡哆醇.HCl	1.4
硫胺素.HCl	1
核黄素	0.42
生物素	0.06
叶酸	0.04

[0603] 1M MgSO₄ (经蒸汽杀菌)

组分	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246

[0605] 用于所有的氢氧化铵, 15% 为 NH₃*

组分	l/l
15%氢氧化铵	1

[0607] 用于所有的碱盐, 1X (经蒸汽杀菌)

组分	g/l
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	15.4
KH ₂ PO ₄	6.8
NH ₄ Cl	4

[0609] 浓缩进料(无菌性混合的经杀菌的组分)

组分	每升的克数或升数
经浓缩的甘油, 100% (w/v)	0.4 l
1 M 硫酸镁溶液 *	0.05 l
维生素	0.05 l
痕量元素	0.05 l
水	0.45 l

[0611] *:在蒸汽灭菌法后添加。

[0612] 分批培养基

组分	l/l
碱盐溶液, IX	0.98
浓缩进料	0.02
卡那霉素原料 50 mg/ml	0.001

[0614] *:在蒸汽灭菌法后添加。

[0615] 消耗酵母提取物 / 甘油混合物(经蒸汽杀菌)

组分	g/l 或 l/l
酵母提取物粉末	200 g
经浓缩的甘油 100% (w/v)	0.171

[0617] 用于所有的卡那霉素原料(经过滤杀菌)

组分	mg/ml	ml
卡那霉素	50	3

[0619] 在使用当天, 制备以下试剂:

[0620] 用于所有的对乙酰基苯丙氨酸(pAF)* (经过滤杀菌)

	组分	g 或 ml
[0621]	对乙酰基苯丙氨酸	4 g
	1 M HCl	6.25 ml
	水	12.5 ml

[0622] * :最终体积变成 21.25ml。使用所有过滤后的所得溶液。

[0623] 用于所有的 L-(+)-阿拉伯糖 20% (经过滤杀菌)

	组分	g/l	ml
[0624]	L-(+)-阿拉伯糖	200	1.25

[0625] * :使用所有过滤后的所得溶液。

[0626] 对各个发酵来说,执行以下步骤。制备 25%Struktol J673 (0.1L)并且蒸汽杀菌。制备 15%NH₃*H₂O (0.3L)用于 pH 值控制和作为氮源。制备 10%H₃PO₄ (0.2L)用于 pH 值控制。在进料容器 1 中制备浓缩进料,1L。在进料容器 2 中制备 YE/ 甘油混合物,各为 2L。

[0627] 建立发酵罐。用 2.5L 碱盐溶液将其杀菌。使发酵罐达到以下条件:温度 =37℃、pH=6.9、基于 5L 工作体积的 1.0VVM 空气(气流可增加高达 2VVM)。

[0628] 将浓缩进料添加到发酵罐,并且添加 2.5ml 的 50mg/mL 卡那霉素。

[0629] 工艺流程

[0630] 第 1 天(阶段 I):

[0631] 从大肠杆菌 MCB (主细胞库,甘油原料)中挑取约 1u1,并且将 1 μ l 的甘油原料转移到培养管中的 2ml 分批培养基 + 卡那霉素中。分批培养基的组成如上所述。

[0632] 第 2 天(阶段 II 和 III):

[0633] 阶段 II :

[0634] 培养管含有约 1-6(OD₆₀₀)的细胞密度。将 0.01-2ml 的培养管培养物转移到 250ml 摇瓶中的 60ml 分批培养基 + 卡那霉素中。仅使用不易受任何碳饥饿的健康细胞。分批培养基的组成如上所述。

[0635] 阶段 III :

[0636] 接种发酵罐达到约 0.05 的初始 OD₆₀₀。所需的来自阶段 II 的细胞的量(以升计)为

$$[0637] \frac{2.5L \times 0.05}{4} = 0.031L \text{ (如果烧瓶 } OD_{600}=4)$$

[0638] 使细胞逐批生长大致 10 小时。特定时间是通过甘油经培养物的损耗而规定。甘油损耗是通过 STIRR 速度的突然降低,接着 pO₂ 信号的增大来指示。开始经浓缩的甘油进料。进料速率是基于式 I :

$$[0639] F(0) = \frac{\mu_{set}}{Y_{x/s}} \times X(0) \times V(0) \times \text{Exp}(\mu_{set} \times 0) \times \frac{1}{S_f}$$

$$[0640] \mu_{set} = 0.15h^{-1};$$

$$[0641] X(0) = Y_{x/s} * 8.0g/l$$

$$[0642] V(0) = 2.5l;$$

$$[0643] \text{Exp}(\mu_{set} * 0) = 1;$$

$$[0644] S_f = 400g/l$$

[0645] 将上述值代入方程式, $F(0)=7.5\text{ml/h}$ 。使用比例因子, 所以真实 $F(0)'$ 将为 8.6ml/h 。

[0646] $F(t)' = F(0)' * \text{Exp}(\mu_{\text{set}} * t)$ 。对 $t=13$ 小时来说, $F(t)' = 60.4$ 毫升 / 小时。

[0647] 将流动速率保持在 60.4 毫升 / 小时历时 1 小时。

[0648] 对运行来说, 在进料 2 开始时添加 pAF。阿拉伯糖诱导物是在 pAF 添加后 1 小时添加。维持最终进料 2 流动速率直到收集。

[0649] 第三天(阶段 IV 和 V)

[0650] 阶段 IV :

[0651] 培养 OD_{600} 达到约 50 到 60。在诱导之前 1 小时(进料时间 =14 小时), 1) 停止浓缩进料(在这个时间, 速率 = 60.4 毫升 / 小时)。2) 以 108.7 毫升 / 小时开始 YE/ 甘油(每升 200g YE 和 170g 甘油)进料。3) 添加含有 4.0g pAF 的 21.25ml 丸剂。在 $\text{pH}6.9$ 下, 继续控制 pH 值, 必要时使用 15% 氢氧化铵和 10% 磷酸来调节 pH 值。3a) 使进料 2 速率线性地增加历时 3 小时, 在进料时间 =17 小时时达到 141.3 毫升 / 小时。培养物 OUR 应保持在大约 250mmol/l/h 。3b) 使碳源转变继续 1 小时。3c) 保存足够量的细胞 ($OD_{600} * \text{ml} = 2$) 用于 SDS-PAGE 分析。

[0652] 在诱导时(进料时间 =15 小时), 用 1.25ml 20% (w/v 或 200g/l) L-(+)-阿拉伯糖进行诱导。在诱导后 4 小时、6 小时和 8 小时保存足够量的细胞 ($OD_{600} * \text{ml} = 2$) 用于 SDS-PAGE 分析。使诱导持续 8 小时。

[0653] 阶段 V :

[0654] 在诱导结束时, 检查培养 OD_{600} 。保存足够量的细胞 ($OD_{600} * \text{ml} = 2$) 用于 SDS-PAGE 分析。通过离心收集 2×200 毫升培养物用于通过 ELISA 的评定。在 $15,000\text{g}$ 下, 使用桶离心 22 分钟来收集细胞, 并且在 -80°C 下将细胞冷冻。

[0655] 已经将所述程序按比例扩大到 100 升培养物。

[0656] 实例 6

[0657] hGH 纯化、聚乙二醇化和 hGH-PEG 纯化方法

[0658] 来自大肠杆菌的周质制剂

[0659] 1. hGH 的周质释放

[0660] 将 1.9 公斤细菌细胞团再悬浮于大致 7.6 升(4- 体积)的 4°C PR 缓冲液(50mM TRIS、 10mM EDTA、 0.07% Triton X-100, $\text{pH}8.0$)中以获得 20% 固体。在 4°C 下将悬浮液搅拌 1 小时后, 添加 8M 尿素以获得 0.3M 的最终尿素浓度。在制备的 48 小时内, 使用 8M 尿素溶液。然后在 4°C 下将所述悬浮液搅拌 1 小时。在 4°C 下, 在固定角度 J20 旋转器(Avanti J20XP 离心机 -Beckman Coulter)中, 在 $15,000 \times \text{g}$ 下将悬浮液离心 45 分钟。收集上层清液, 并测量其体积(大致 7.7L)。将样品指定为带有日期和批号的 PRS。

[0661] 使 PRS 滤过预滤器, Sartopure GF21. $2\ \mu\text{m}$ 容器(1000cm^2)(部件 #5571303P800B)。在泵设定 1 (MasterFlex I/P7529-10 型)时, 滤液流动速率是 0.86L/min 。收集滤液并且指定为带有日期和批号的 PRSF。测量 PRSF 的体积。

[0662] 使 PRSF 滤过 Sartopore20. $8+0.45\ \mu\text{m}$ 过滤容器(500cm^2)(部件 #5441306G700B)。收集滤液并且指定为带有日期和批号的 PRSFF。测量 PRSFF 的体积。

[0663] 处理中的分析包括, 确认与参考标准相比, 呈正确形式的 hGH 的存在的非还原性

SDS-PAGE 分析, A_{276} 的测量和用于定量的 ELISA。

[0664] 2. UF/DF (超滤 / 透滤) I-QFF 的缓冲液更换

[0665] 以下过滤器用于所述程序: Sartorius Sartoclon Slice10K Hydrosart 盒, $2 \times 1000 \text{cm}^2$ 。其他参数包括: 100-160 毫升 / 分钟的滤液(渗透物)流动速率、24-26psi 的进料压力和 5-6psi 的保留物压力。

[0666] 用 1N NaOH 将系统去热源, 并且容许循环 30-45 分钟。用大致 4 升的 MilliQ 水冲洗系统直到 pH 值降到 8 以下。平衡是用 QFF 缓冲液 A (10mM Bis-TRIS, pH6.5) 历时至少 5 分钟完成。将 PRSFF 浓缩缩减到大致其体积的十分之一。然后用 8- 体积的 QFF 缓冲液 A 将其透滤。使保留物再循环 3-5 分钟。收集保留物之后, 用 300-350 毫升的 QFF 缓冲液 A 冲洗系统并且将冲洗液与保留物组合。使经组合的样品滤过 Sartopore20. $8 \pm 0.45 \mu\text{m}$ 容器 (500cm^2) (部件 #5441306G700B), 并且将所收集的滤液指定为带有日期和批号的 QFF 填料。其是褐色的。测量 QFF 填料的体积, 并且在 2 小时内处理 QFF 填料或在 4°C 下存储整夜。

[0667] 用 MilliQ 水冲洗系统并且通过循环 30-45 分钟, 用 1N NaOH 清洁。然后, 用 MilliQ 水完成冲洗直到 pH 值小于 8。将盒存储在 0.1N NaOH 中。

[0668] 处理中的分析包括定量总蛋白质和确定用于下一步的 QFF 填料的量的 A_{276} 的测量, ELISA, LAL 和非还原性 SDS-PAGE 分析。

[0669] 3. 管柱 1-Q 琼脂糖凝胶 FF 色谱法

[0670] Q 琼脂糖凝胶快速流动柱(Fast Flow) 是从 GE Healthcare 获得。柱尺寸如下: $70 \text{mm I.D.} \times 16 \text{cm} = 616 \text{ml}$ (INDEX70/500 管柱)。生产能力为每 ml QFF150mg 总蛋白质 (140-160mg, 基于 A_{276}) 或 10mg GH(基于 ELISA)。流动速率是 100ml/min(线性速度: 156cm/h)。QFF 缓冲液 A 由 10mM Bis-TRIS 组成, pH6.5, 具有 0.6mS/cm 的电导率。QFF 缓冲液 B 由 10mM Bis-TRIS、0.1M NaCl 组成, pH6.5, 具有 11.5mS/cm 的电导率。

[0671] 使 AKTA 探测器系统去热源。为完成所述去热源, 运行“AKTA 去热源”程序 3 次: 在第一次运行程序时, 将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中, 然后第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养, 并且在第三次运行时, 再次将缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。以 30cm/h 的线性速度, 运行“QFF 去热源平衡”程序以使 QFF 管柱去热源和平衡: 用 2 个柱体积的 MilliQ H_2O 、2 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl 洗涤 QFF 管柱, 培养 30min, 用 3 个柱体积的 Q 缓冲液 C (10mM TRIS、2M NaCl, pH7.0, 具有 156mS/cm 的电导率) 洗涤, 然后用 4 个柱体积的 QFF 缓冲液 A 平衡。

[0672] 然后将 QFF 填料加载到管柱上。用 4 个柱体积的 QFF 缓冲液 A 和 7 个柱体积的在 A 中的 10%QFF 缓冲液 B 洗涤管柱。用 6 个柱体积的在 A 中的 60%QFF 缓冲液 B 执行洗提。管柱可以用 3 个柱体积的 QFF 缓冲液 B 洗涤。收集洗提峰。将所收集的洗提液指定为带有日期和批号的 QFF 池。在 2 小时内处理池或在 4°C 下存储整夜。

[0673] 用 3 个柱体积的 Q 缓冲液 C 洗涤管柱。然后, 用泵将 3 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl 吸入, 并且历时 1-6 天进行培养。如果在 6 天内不使用管柱, 那么用 1 个柱体积的 1N NaOH/1M NaCl、3 个柱体积的 Q 缓冲液 C、3 个柱体积的 MilliQ H_2O 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 或 10mM NaOH 将其冲洗。每 3-5 次循环进行一次管柱的大范围清洁以便在 1N NaOH/1M NaCl 培养后, 用 3 个柱体积的 Q 管柱清洁缓冲液 (0.5% Triton X-100、0.1M 乙酸) 向上流动将其洗涤, 培养 60-80 小时, 用 1.5 个柱体积的 MilliQ H_2O 、1 个柱体积的 0 到 70%EtOH, 5 个柱体积的

70%EtOH 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 洗涤。

[0674] 将 4M NaCl 添加到 QFF 池以达到最终 0.1M 浓度。使产物滤过 Sartobind Q100X 过滤器(部件 #Q100X),用 QFF 缓冲液 B 预平衡以除去内毒素。收集滤液并且标记成为带有日期和批号的 QFF PoolQ。在 2 小时内处理滤液或在 4℃ 下存储整夜。

[0675] 使 QFF PoolQ 通过 Sartobran0.45+0.2 μm 过滤容器(300cm²) (部件 #5231307H500B) 并且收集滤液。将滤液指定为带有日期和批号的 QFF PoolQF。在 2 小时内处理 QFF PoolQF 或在 4℃ 下存储整夜。

[0676] 处理中的分析包括 A₂₇₆ 的测量、ELISA、LAL 和非还原性 SDS-PAGE 分析。

[0677] 4. 管柱 2- 苯基琼脂糖凝胶 HP 色谱法

[0678] 苯基琼脂糖凝胶高效柱是从 GE Healthcare 获得。柱尺寸如下:100mm I. D. × 9.7cm=761ml (INDEX100/500 管柱)。生产能力是每 ml 的苯基 HP4.5-9mg 总蛋白质, 优先为 6-8mg 总蛋白质(基于 A₂₇₆)。流动速率是 100 毫升/分钟(线性速度:76.4cm/h)。Phe 缓冲液 A 由 20mM TRIS、0.4M 柠檬酸钠组成, pH7.0。Phe 缓冲液 B 由 10mM TRIS 组成, pH7.0, 具有 0.9mS/cm 的电导率。

[0679] 使 AKTA 探测器系统去热源。运行“AKTA 去热源”程序 3 次:在第一次运行程序时, 将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中, 然后第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养, 然后在第三次运行时, 再次将所有缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。以 30cm/h 的线性速度, 运行“PheHP 去热源平衡”程序以使 Phe 管柱去热源和平衡:用 2 个柱体积的 MilliQ H₂O、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 将其洗涤, 培养 30minutes, 然后用 4 个柱体积的 Phe 缓冲液 A 平衡。

[0680] 将 1.4M 柠檬酸钠添加到 QFF poolQF 中达到 0.4M 的最终浓度。在室温下将混合物搅拌大致 1 小时以溶解柠檬酸钠, 并且将溶液升温到 ≥ 16℃。将 QFF PoolQF+ 柠檬酸钠加载到管柱上。用 4 个柱体积的 Phe 缓冲液 A, 然后 9-17 个柱体积的在 A 中的 27%Phe 缓冲液 B 洗涤管柱。27%Phe 缓冲液 B 洗涤的长度视加载到管柱上的总蛋白质的量而定。加载的蛋白质越多, 所需要的 27%Phe 缓冲液 B 的柱体积越少。用 8-10 个柱体积的在 A 中的 48%Phe 缓冲液 B 执行洗提。再次用 100%Phe 缓冲液 B 洗涤管柱。收集 48%B 洗提峰并且指定为带有批号的 Phe 池。在 2 小时内执行下一步, 或在 4℃ 下将池存储整夜。

[0681] 用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱, 培养 30 分钟, 用 3 个柱体积的 Phe 缓冲液 A、3 个柱体积的 H₂O 和 2.5 个柱体积的 20%EtOH 或 10mM NaOH 洗涤。3-5 次循环后, 用 2 个柱体积的 1M NaOH 向上流动洗涤 Phe 管柱, 培养 30 分钟, 用 3 个柱体积的 Phe 缓冲液 A、3 个柱体积的 H₂O、超过 1 个柱体积的 0-70%EtOH、3 个柱体积的 70%EtOH 洗涤, 并且最终存储在 20%EtOH 或 10mM NaOH 中。

[0682] 处理中的分析包括 A₂₇₆ 的测量、ELISA、LAL 和非还原性 SDS-PAGE 分析。

[0683] 5. UF/DF II- 处理中的主体 GH 的配方

[0684] 以下过滤器用于所述程序:Sartorius Sartocan Slice10K Hydrosart 盒, 1000cm²。其他参数包括:50-90ml/min 的滤液(渗透物)流动速率、20-27psi 的进料压力和 3-4psi 的保留物压力。UF/DF II 缓冲液由 10mM 磷酸钠、20g/L 甘氨酸和 5g/L 甘露糖醇组成, pH7.0。

[0685] 用 1N NaOH 将系统去热源, 并且容许循环 30-45 分钟。用大致 4 升的 MilliQ 水冲

洗系统直到 pH 值降到 8 以下。用 UF/DF II 缓冲液历时至少 5 分钟完成平衡。

[0686] 将 Phe 池浓缩缩减到大致 700-900ml (或在保留物烧瓶中,大致 500-700ml)。用 4.2-5.4 升(6- 体积)的 UF/DF II 缓冲液完成透滤。使保留物再循环 3-5 分钟,并且收集保留物。用 100-200ml 的 UF/DF II 缓冲液冲洗系统,并且将冲洗液与保留物组合。用 Sartobran0.45+0.2 μ m 容器(150cm²) (部件 #5231307H400B)过滤经组合的样品,并且将滤液指定为 Y35pAF-pBx 并且称为“处理中的主体”。

[0687] Y35pAF-pBx 的蛋白质浓度是通过测量经稀释的样品的 A_{276} , 使用 $A_{276}^{1\text{mg/ml}}=1.037$ 来确定。处理中的主体可在 4°C 下存储长达 1 周。为进行长期存储,将其等分并且保持在 -80°C。

[0688] 用 MilliQ 水冲洗系统并且通过循环 30-45 分钟,用 1N NaOH 清洁。然后,用 MilliQ 水将其冲洗直到 pH 值在 8 以下。将盒存储在 0.1N NaOH 中。

[0689] 处理中的分析包括 RP-HPLC、 A_{276} 的测量、ELISA、LAL 和非还原性 SDS-PAGE 分析。

[0690] 6. UF/DF IIa- 聚乙二醇化的浓度和缓冲液更换

[0691] 以下过滤器用于所述程序:Sartorius Sartocoon Slice10K Hydrosart 盒,200cm²。其他参数包括:12-14ml/min 的滤液(渗透物)流动速率、大致 25psi 的进料压力和 0-0.5psi 的保留物压力。反应缓冲液由 20mM 乙酸钠、20g/L 甘氨酸、5g/L 甘露糖醇、1mMEDTA 组成, pH4.0, 具有 2.6mS/cm 的电导率。

[0692] 用 1N NaOH 将系统去热源,并且容许循环 30-45 分钟。用大致 2 升的 MilliQ 水冲洗系统直到 pH 值降到 8 以下。用反应缓冲液历时至少 5 分钟执行平衡。

[0693] 通过添加 3.7% (v/v) 的 10% 乙酸,将一定量的来自步骤 5 的处理中的主体的 pH 值调节到大致 4。然后,基于所使用的起始 hGH 的量,将其浓缩缩减到具有 8mg/ml 浓度的目标体积。用 5 个体积的反应缓冲液透滤样品。使保留物再循环 3-5 分钟,然后收集保留物。用 80-120ml 的反应缓冲液冲洗系统并且与保留物组合。使经组合的保留物滤过 Sartobran0.45+0.2 μ m 容器(150cm²) (部件 #5231307H400B)。将滤液指定为带有日期的 Y35pAF-pBx/pH4。样品可在 4°C 下存储整夜。

[0694] Y35pAF-pBx/pH4 的蛋白质浓度是通过测量经 20 倍稀释的样品的 A_{276} , 使用 $A_{276}^{1\text{mg/ml}}=1.037$ 来确定。通过用反应缓冲液的稀释,将 Y35pAF-pBx/pH4 的浓度调节到 7mg/ml (5-9mg/ml)。

[0695] 7. 聚乙二醇化反应

[0696] 在位置 35 处用对乙酰基-苯丙氨酸取代酪氨酸(Y35paF)的 hGH 的分子量是 22,149Da,并且 mPEG-羟基胺的批次的分子量是 30,961Da。对野生型成熟 hGH 的序列来说,参见美国专利公开案第 2005/0170404 号的 SEQ ID NO:2。图 5 展示所使用的 PEG 的化学结构。使用 PEG:Y35pAF=5 的摩尔比率,计算所需要的 30K MPEG-羟基胺的量。将 PEG 粉末称重并且在 25-28°C 下缓慢添加到 7mg/ml Y35pAF 溶液,同时搅拌。将大块的固体 PEG 人工地打碎。在上一次添加后,在轻轻搅拌下,将反应混合物置于 28°C 历时 39-50 小时。反应在 hGH 与 PEG 之间形成酯键。

[0697] 处理中的分析包括确认聚乙二醇化的非还原性 SDS-PAGE 分析。

[0698] 8. 管柱 3-源极 30Q 色谱法

[0699] 源极 30Q 是从 GE Healthcare 获得。柱尺寸如下:70mm I.D. \times 17.5cm=673ml

(INdEX70/500 管柱)。生产能力是每 ml 源极 Q2.4mg (1-2.8mg)GH。流动速率是 80 毫升/分钟(线性速度:125cm/h)。源极 Q 缓冲液 A 由 5mM TRIS 组成, pH7.0。源极 Q 缓冲液 B 由 5mM TRIS、0.1M NaCl 组成, pH7.0。

[0700] 为使 AKTA 探测器系统去热源,运行“AKTA 去热源”程序 3 次:在第一次运行程序时,将全部缓冲液管线放置在 MilliQ 水中,并且在第二次运行时放置在 1N NaOH 中。历时 30 分钟完成培养,并且在第三次运行时,再次将所有缓冲液管线放置在 MilliQ 水中。为使源极 Q 管柱去热源并且平衡,运行“源极 Q 去热源平衡”程序:用 2 个柱体积的 MilliQ H₂O、2 个柱体积的 1M NaOH/1M NaCl 洗涤源极 Q 管柱,培养 30 分钟,用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 B 洗涤,然后用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 平衡。

[0701] 将 20% (v/v) 的 0.5M TRIS 碱添加到来自先前步骤(步骤 7)的反应混合物。然后,使样品通过 Sartobran0.45+0.2 μm 过滤容器(150cm²)(部件 #5231307H400B)。用 9- 体积的源极 Q 缓冲液 A 和 10- 体积的 MilliQ H₂O 执行 20 倍稀释。然后将经稀释的样品加载到管柱上。用 5 个柱体积的源极 Q 缓冲液 A 洗涤管柱。用超过 10 个柱体积的 0-50% 源极 Q 缓冲液 B 的线性梯度执行洗提。以大致 1/5 柱体积 / 馏分来收集馏分。在第一主峰上执行 SE-HPLC 和非还原性 SDS-PAGE 分析以测定池。将所汇集的馏分指定为带有日期和批号的源极 Q 池。在 4°C 下将池存储整夜。

[0702] 9. UF/DF (超滤 / 透滤) III- 经调配的主体的浓缩和缓冲液更换

[0703] 使用以下过滤器:Sartorius Sartocoon Slice10K Hydrosart 盒,200cm²。其他参数包括:12-14ml/min 的滤液(渗透物)流动速率、大致 25psi 的进料压力和大致 0-0.5psi 的保留物压力。

[0704] 用 1N NaOH 将系统去热源,并且容许循环 30-45 分钟。用大致 2 升的 MilliQ 水冲洗系统直到 pH 值降到 8 以下。然后,用配方缓冲液历时至少 5 分钟执行平衡。

[0705] 基于所使用的起始物质的量,将源极 Q 池(步骤 3.6)浓缩到具有 8mg/ml 浓度的目标体积。用 6 个体积的配方缓冲液执行透滤。使保留物再循环 3-5 分钟,并且收集保留物。用 50-100ml 的配方缓冲液冲洗系统并且与保留物组合。在生物安全通风厨或 100 级通风厨(Class100hood)中,使用无菌技术,用 Sartobran0.45+0.2 μm 容器(150cm²)(部件 #5231307H400B) 无菌过滤经组合的保留物。将无菌的样品指定为带有批号的 PEG30-pY35pAF。

[0706] PEG30-pY35pAF 的当量 hGH 浓度是通过测量经稀释的样品的 A₂₇₆,通过使用 A₂₇₆^{1mg/ml}=1.145 来确定,进行三次稀释和测量。PEG30-pY35pAF 可在 4°C 下存储长达 3 天。为进行长期存储,将其等分并且保持在 -80°C。

[0707] 已经使用所述方案处理了来自 W3110 的菌株的物质。所使用的菌株是经正交 tRNA、正交氨酰基 tRNA 合成酶和 hGH 构筑体转形。基于 HPLC 和 SDS-PAGE 分析,PEG-Y35pAF 纯度 >95%。

[0708] 完全释放检定包括(但不限于)评价 PEG30-pY35pAF 的属性,诸如外观、溶解时间、同一性和纯度、效力、安全性和包括(但不限于)pH 值的其他属性的检定。用于评定的测试方法包括(但不限于),还原性和非还原性 SDS-PAGE、SE-HPLC、RP-HPLC、IEX-HPLC、CEX-HPLC、宿主细胞蛋白质的测量、剩余 DNA 的测量、浓度的 A₂₇₆、细胞增殖检定、LAL、热原质、无菌性、生物负载(微生物限度)、Karl Fisher (水含量)、内含物均匀性和渗透度。

[0709] 用于 UF/DF III 的缓冲液更换的缓冲液可以是任何适当的缓冲液。在 UF/DFIII 后的额外的步骤包括(但不限于)冷冻干燥。冷冻干燥可使用为所属领域的技术人员所知的标准技术来进行。

[0710] 已经用约 2.7kg 的细菌细胞小球执行所述方法。

[0711] 实例 7

[0712] 额外的方法

[0713] 通过 SDS-PAGE 进行的纯度分析

[0714] 以下方法是用以通过 SDS-PAGE,接着通过总蛋白质染色,评定处理中的和最终的主体重组 hGH 和 PEG- 重组 hGH 结合物的纯度。当放置在电场中时,诸如蛋白质的任何带电的分子将迁移。蛋白质在电场中的迁移速度视电场强度、蛋白质上的净电荷和摩擦阻力而定。摩擦阻力为蛋白质的尺寸和形状的函数。当在过量的 SDS 存在下变性时,大多数蛋白质以恒定的重量比结合 SDS 以便其基本上具有相等的电荷密度并且根据蛋白质尺寸而在聚丙烯酰胺凝胶中迁移。通过凝胶电泳分离的蛋白质可通过考马斯亮蓝染色(Coomassie Brilliant Blue staining)检测。

[0715] 用于所述程序的设备包括以下设备和其等价物: XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen)、设定到 +70-80 °C 的加热块、电源(高达 200V)、微离心机(诸如 Beckman Coulter 微离心机 18 或 22R)和往复振荡器。试剂包括 NuPAGE MOPS SDS 运行缓冲液(20X, Invitrogen PN NP0001);NuPAGE MES SDS 运行缓冲液(20X, Invitrogen PN NP0002);NuPAGE LDS 样品缓冲液(4X, Invitrogen PN NP0007);NuPAGE 样品还原剂(10X, Invitrogen PN NP0009);12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶,1.0mm×10-孔(Invitrogen PN NP0341BOX);4-12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶,1.0mm×10-孔(Invitrogen PN NP0321BOX);预染色分子量标记物(SeeBlue Plus2, Invitrogen PN LC5925);MilliQ 品质 H₂O (MilliQ-quality H₂O) 或等价物;SimplyBlue SafeStain (Invitrogen PN LC6065) 或等价物;参考标准(WHO rhGH 标准);rhGH 的校准溶液(Y35pAF-pB2/pB3, 2mg/ml);pEG-rhGH 结合物的校准溶液(PEG30-pY35pAF-01, 2mg/mL)。标准和测试物品的蛋白质浓度是使用在所属领域中已知的标准技术测量。

[0716] 预聚乙二醇化纯化步骤样品的分析

[0717] 在非还原性条件下制备 3 μg 参考标准(RS,例如校准溶液 Y35pAF-pB2/pB3)。将 3 μg 参考标准添加到 4X LDS 和 MilliQ H₂O 中以及在 1X LDS 获得 28 μl 样品。同样地,在非还原性条件下制备 rhGH 测试物品。在 +70-80 °C 下将 rhGH 测试物品和参考标准加热 8-10 分钟并且离心然后加载到凝胶上。根据制造商的说明,用 1X MOPS SDS 运行缓冲液制备 12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶。如下加载凝胶:预染色分子量标记物、3 μg 参考标准、测试物品,并且在 200V 的最大设定下运行 50 分钟。在去离子水中培养凝胶,在摇动下使用 SimplyBlue 或等价物染色,并且用水脱色。将 rhGH 测试物品的主带位置与 3 μg 参考标准的主带位置比较。

[0718] 经纯化的处理中的主体 rhGH 的分析

[0719] 在非还原性和还原性条件下制备 20 μg 和 1 μg 的参考标准(RS,例如 WHO rhGH)。对非还原性条件来说,将 20 或 1 μg 参考标准添加到 4X LDS 和 MilliQ H₂O 中以及在 1X LDS 中获得 28 μl 样品。对还原性条件来说,将 20 或 1 μg 参考标准添加到 4X LDS、10X 还原剂和

MilliQ H₂O 中在以 1X LDS 和 1X 还原剂中获得 28 μl 样品。在 +70-80℃ 下,将 rhGH 测试物品和参考标准加热 8-10 分钟并且在加载到凝胶上之前离心。根据制造商的说明,在 1X MOPS SDS 运行缓冲液中,使用用于非还原性条件的一个单元和用于还原性条件的另一个单元运行 12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶。如下加载凝胶:预染色分子量标记物、1 μg 参考标准、20 μg 参考标准、空白泳道,接着测试物品,在 200V 最大设定下历时 50 分钟。在去离子水中培养凝胶,在摇动下使用 SimplyBlue 或等价物染色,并且用水脱色。将 rhGH 测试物品的主带位置与 20 μg 参考标准的主带位置比较。在 rhGH 测试物品的泳道中,除主带之外,不应有比 1 μg 参考标准(5%)的泳道中的主带更强烈的带。

[0720] rhGH 的聚乙二醇化和 PEG-rhGH 的纯化的分析

[0721] 在非还原性条件下制备参考标准(RS,例如校准溶液 PEG30-pY35pAF-01)。将 5 μg 的 PEG30-pY35pAF-01 添加到 4X LDS 和 MilliQ H₂O 中在以 1X LDS 中获得最终 28 μl 样品。视所分析的程序而定,将 5-20 μg 的测试物品添加到 4X LDS 和 MilliQ H₂O 中在以 1X LDS 中获得最终 28 μl 样品。对聚乙二醇化反应混合物来说,使用 15-20 μg 的测试物品。对聚乙二醇化反应混合物的分析来说,在:a)在 pH4 下添加 PEG 以允许估算保留在聚乙二醇化反应混合物中的未经聚乙二醇化的 rhGH 的相对百分比之前,连续浓度的 rhGH;b)10 μL 的反应混合物的 1/10 稀释液之间进行比较。在聚乙二醇化后纯化期间,使用来自管柱馏分的 5-20 μg 的测试物品。对 PEG-rhGH 管柱馏分的分析来说,管柱馏分是通过使用固定体积的各个管柱馏分(通常 21 μL 的各个管柱馏分)来比较。

[0722] 不加热 PEG-rhGH 测试物品或 PEG-rhGH 参考标准样品。将样品离心并且加载到根据制造商的说明,用 1X MES SDS 运行缓冲液制备的 4-12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶上。如下加载凝胶:预染色分子量标记物、5 μg 参考标准,接着测试物品并且以 200V 的最大设定运行 35 分钟。在去离子水中培养凝胶,在摇动下使用 SimplyBlue 或等价物染色,并且用水脱色。

[0723] PEG-rhGH 测试物品的电泳图谱将符合用 PEG-rhGH 参考标准获得的电泳图谱。

[0724] 最终的经聚乙二醇化的 rhGH 产物的分析

[0725] 在非还原性和还原条件下制备 10 μg 的参考标准(RS,例如校准溶液 PEG30-pY35pAF-01)。将 10 μg 的 PEG30-pY35pAF-01(2mg/mL)添加到 4X LDS 和 MilliQ H₂O 中在以 1X LDS 中获得最终 28 μl 样品。对还原性条件来说,将 10 μg 参考标准添加到 4X LDS、10X 还原剂和 MilliQ H₂O 中在以 1X LDS 和 1X 还原剂中获得 28 μl 样品。同样地,也在非还原性和还原性条件下制备 10 μg 的经聚乙二醇化的 rhGH 测试物品。不加热 PEG-rhGH 测试物品和 PEG-rhGH 参考标准,但是在加载到根据制造商的说明,用 1X MES SDS 运行缓冲液制备的 4-12%Bis-Tris NuPAGE 预制凝胶上之前,将其迅速离心。以预染色分子量标记物、10 μg 参考标准、空白泳道(推荐用以最小化可能的携带效应),接着测试物品的顺序加载凝胶,同时以 200V 的最大设定值历时 35 分钟。在去离子水中培养凝胶,在摇动下使用 SimplyBlue 或等价物染色,并且用水脱色。

[0726] PEG-rhGH 测试物品的电泳图谱应符合用 PEG-rhGH 参考标准获得的电泳图谱。PEG-rhGH 测试物品的电泳图谱应符合用 PEG-rhGH 参考标准获得的电泳图谱。不匹配参考标准的任何带可能是降解产物或聚集物。较高的分子量带可以表示聚集物,并且较低的分子量带可以表示不再与 PEG 结合的多肽。

[0727] 通过 CEX-HPLC/IEX-HPLC 进行的 rhGH 的纯度和化学降解分析

[0728] 以下方法是用以通过阳离子交换高效液相色谱法(CEX-HPLC), 评定经聚乙二醇化的重组人类生长激素(rhGH)的相对纯度和可能的化学降解(也就是说, 脱酰胺基作用)。CEX-HPLC 是依靠蛋白质与固定于树脂上的电荷之间的电荷-电荷相互作用的技术。阳离子交换色谱法利用与带负电的树脂结合的蛋白质的带正电的离子。天门冬酰胺(Asn)残基的 rhGH 脱酰胺基作用的普通结构改变和所述 CEX-HPLC 方法, 允许经聚乙二醇化的和未经聚乙二醇化的 rhGH 的经脱酰胺基作用物的和脱酰胺基作用中间物的分离。所述方法是用以支持经聚乙二醇化的 rhGH 的识别和纯度评估。使用所述技术可观察到 rhGH 的一些部分降解产物。

[0729] 用于所述程序的设备包括以下设备和其等价物: UV/Vis 分光光度计(Agilent8453 或等价物); 50 μ l 石英比色皿; 0.5mL Vivaspin 浓缩器(如果需要; Vivascience10,000MWC0、PES、VS0102 或等价物); PD-10、NAP-10 或 NAP-5 管柱(GE Healthcare, 目录号 #17-0851-01、17-0853-01、17-0854-01); HPLC 小瓶和盖子(Alltech100 μ l 螺帽聚丙烯小瓶 #12962、TFE 筛管盖 #73048、开孔螺帽 #73044 或等价物); 干净的 1L 和 2L 玻璃瓶; 管柱 -PolyCAT A4.6 \times 200mm, 5 μ , 1000 \AA (PolyLC, 204CT0510) 和 PolyCAT A 保护柱, 4.6 \times 10mm, 5 μ , 1000 \AA (PolyLC, JGCCT0510); 能够执行线性梯度的高压液相色谱器具(诸如配备真空除气器、四级梯度泵、恒温自动取样器、恒温柱室、二极管阵列检测器(DAD) 和 Chemstation 色谱软件的 Agilent1100HPLC)。

[0730] 除非另外说明, 否则用于所述程序的试剂包括水(Milli-Q 品质或等价物) 并且固体化学品是分析级的或更好的并且溶剂是 HPLC 级或更好的。除非另外指示, 否则试剂的存储和程序步骤是在室温下发生。所述化学品的实例包括乙酸铵, Spectrum A2149, HPLC 级或等价物; 乙腈, Fisher A998, HPLC 级或等价物; 碳酸氢铵, Fluka#09830, Ultra>99.5% 或等价物; 冰乙酸, Fisher#64-19-7, HPLC 级或等价物; 二水合柠檬酸钠, Spectrum S0165, USP 级或等价物; 甘氨酸, Spectrum AM125 或等价物; 甘露糖醇, Spectrum MA165 或等价物; 6N HCl, Mallinckrodt2662-46 或等价物。

[0731] 移动相 A 缓冲液是 pH4.25 的 50mM 乙酸铵、40% 乙腈(AcCN) 并且移动相 B 缓冲液是 pH4.25 的 500mM 乙酸铵、40%AcCN。所制备的额外的试剂是 10% 乙酸; 用于脱酰胺基作用的缓冲液: pH9.0 的 30mM 碳酸氢铵; 和样品稀释缓冲液: 20mM 柠檬酸钠, 20g/L 甘氨酸, 5g/L 甘露糖醇, pH6.0, 使用 0.22 μ m PES 过滤器(Corning#431098 或等价物) 将各试剂无菌过滤。

[0732] 将世界卫生组织(WHO) rhGH (目录号 #98/574) 用作未经聚乙二醇化的 hGH 标准。在 1.0ml 的水中将其复水并且使用稀释缓冲液稀释到 1.1mg/ml。添加 10% (v/v) 的 10% 乙酸以得到在 pH3.8-4.3 之间的 pH 值与 1.0mg/ml 的最终浓度(可接受的范围为 0.9-1.1mg/ml)。以相似方式制备另一个未经聚乙二醇化的 hGH 标准, 即校准溶液 Y35pAF-pB2/pB3。也以相似方式制备经聚乙二醇化的 hGH 标准, 即校准溶液 PEG30-pY35pAF-01。

[0733] 对经聚乙二醇化的分离溶液(Resolution Solution) 来说, 使用 PD-10、Nap-10 或 Nap-5 脱盐管柱将 PEG30-pY35pAF-01 校准溶液缓冲更换成 30mM 碳酸氢铵, pH9.0 缓冲液。使用 0.5mL Vivaspin 浓缩器将标准浓缩到大致 2mg/ml (可接受的范围为 1.9-2.1mg/ml), 并且在 37 $^{\circ}$ C 下将样品培养 24 小时。使用稀释缓冲液将所需的样品或样品的部分稀释

到 1.1mg/ml, 并且添加 10% (v/v) 的 10% 乙酸以得到在 pH3.8-4.3 之间的 pH 值与 1.0mg/ml 的最终浓度(可接受的范围为 0.9-1.1mg/ml)。

[0734] 使用稀释缓冲液将测试物品稀释到 1.1mg/ml, 并且添加 10% (v/v) 的 10% 乙酸以得到在 pH3.8-4.3 之间的 pH 值与 1.0mg/ml 的最终浓度(可接受的范围为 0.9-1.0mg/ml)。使用在所属领域中已知的标准技术测量标准和测试物品的蛋白质浓度。

[0735] 程序

[0736] 设立具有以下条件的器具:1) 管柱: PolyCAT A204CT0510 和 JGCCT0510; 2) 自动取样器温度: 室温; 3) 泵设定: 步进梯度: pH4.25 的 81.5-108.5mM 乙酸铵(7-13%B), 接着 pH4.25 的 108.5-500mM 乙酸铵(13-100%B); 4) 表 4;

[0737]

时间	移动相 A	移动相 B	流速 (ml/min)	压力 (巴)
0	100	0	1.0	140
10	100	0	1.0	140
11	93	7	1.0	140
91	87	13	1.0	140
102	0	100	1.0	140
118	0	100	1.0	140
119	100	0	1.0	140
151	100	10	1	140

[0738] 5) 注射器设定 -- 注射: 标准注射; 注射体积: 25 μ l; 抽吸速度: 50 μ l/min; 注射速度: 50 μ l/min; 针洗涤: 15 μ l H₂O; 停止时间: 与泵一样; 6) DAD 信号: 表 5;

[0739]

样品	Bw	参考	Bw	单位
280	4	600	100	nm
276	4	600	100	nm
214	8	600	100	nm
220	4	600	100	nm
250	8	600	100	nm

[0740]

[0741] 峰宽: >0.1 min; 缝隙: 4 nm; 停止时间: 与泵一样; 7) 管柱恒温器: 温度: 30°C; 记录温度。

[0742] 用 10-15 个柱体积的 100% 移动相 A 使管柱平衡。注射 25-50 μ l 的经聚乙二醇化的校准溶液 PEG30-pY35pAF-01。在 56.97 min (\pm 0.5 min) 的保留时间时, 洗提主要的经聚乙二醇化的峰。然后, 注射 25-50 μ l 的 WHO 或校准溶液 Y35pAF-pB2/pB3 并且运行 HPLC 程序。在 98.54 min (\pm 0.5 min) 的保留时间, 即在对主要的经聚乙二醇化的峰来说的 1.73 \pm 0.01 的相对保留时间时, 洗提主要的未经聚乙二醇化的峰。

[0743] 然后, 注射 25-50 μ l 的经聚乙二醇化的分离溶液。在所获得的色谱图中, 在 56.97min (\pm 0.5 min) 的保留时间时, 洗提主要的经聚乙二醇化的峰, 并且在相对于主峰

(45.23 ± 0.3 min ; (电流条件造成 2.3 ± 0.02 的分离度) 的 0.79 ± 0.02 的保留时间时, 洗提经聚乙二醇化的脱酰氨基峰。

[0744] 然后注射 $25\text{--}50 \mu\text{l}$ 的经聚乙二醇化的测试物品, 并且运行 HPLC 程序。将样品运行三次并且记下平均保留时间。色谱图是以吸光度 (280 nm) 产生。

[0745] 数据分析

[0746] 将经聚乙二醇化的 rhGH 测试物品的保留时间与校准溶液 PEG30-pY35pAF-01 相比。使用: (主峰的积分面积 / 所有峰的积分面积) \times 100% 计算测试物品的平均纯度。忽视由于溶剂而产生的任何峰。

[0747] 通过 SEC-HPLC 进行的 rhGH 的纯度测定

[0748] 所述程序是用以通过尺寸排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC), 评估包括处理中的物质和经聚乙二醇化的 rhGH 的重组人类生长激素 (rhGH) 的纯度。所述测试将单体从样品, 以及经聚乙二醇化的样品和未经聚乙二醇化的样品中的二聚体和具有较高分子量的其他有关物质分离。SEC-HPLC 是使用固定相作为移动相分子渗透的多孔基质的技术。足够小以进入多孔结构的样品分子被延迟, 同时较大的分子被排除并且因此快速地被运送通过管柱。因此, 尺寸排阻色谱法意思是通过尺寸分离分子并且色谱洗提时间是具体分子的特征。所述程序是用以测定单体 (经聚乙二醇化和未经聚乙二醇化) rhGH 的百分比。使用所述技术可观察到二聚体和其他高分子量蛋白质。

[0749] 所述技术的参考文献包括 European Pharmacopoeia 2002, 第 193 页; British Pharmacopoeia 2001, 第 1941 页; R.M. Riggin 等人的 “High-Performance Size-Exclusion Chromatographic Determination of the Potency of Biosynthetic Human Growth Hormone Products”. Journal of Chromatography 435 (1988), 第 307-318 页。

[0750] 用于所述程序的设备包括以下设备和其等价物: UV/Vis 分光光度计 (Agilent 8453 或等价物); $50 \mu\text{l}$ 石英比色皿; 0.5mL Vivaspin 浓缩器 (如果需要; Vivascience 10,000MWC0、PES、VS0102 或等价物); HPLC 小瓶和盖子 (Alltech $100 \mu\text{l}$ 螺帽聚丙烯小瓶 #12962、TFE 筛管盖 #73048、开孔螺帽 #73044 或等价物); 干净的 1L 和 2L 玻璃瓶; 管柱 - Tosohaas TSK Super SW300018675 和 Super SW 保护柱 18762、具有 $4.6 \times 300\text{mm}$ 的尺寸, $4 \mu\text{m}$ 的粒度和 250 \AA 的孔径的以硅石为主的尺寸排阻 HPLC 管柱连同具有 $4.6 \times 35\text{mm}$ 的尺寸和 $4 \mu\text{m}$ 粒度的保护柱; 能够执行线性梯度的高压液相色谱器具 (诸如配备真空除气器、四级梯度泵、恒温自动取样器、恒温柱室、二极管阵列检测器 (DAD)、折射指数检测器 (RID) 和 Chemstation 色谱软件的 Agilent 1100 HPLC)。

[0751] 除非另外说明, 否则用于所述程序的试剂包括水 (Milli-Q 品质或等价物) 并且固体化学品是分析级的或更好的并且溶剂是 HPLC 级或更好的。除非另外指示, 否则试剂的存储和程序步骤是在室温下发生。所述化学品的实例包括一水合磷酸二氢钠, Spectrum U. S. P. 级 S0130 或等价物; 七水合磷酸氢二钠, Spectrum U. S. P. 级 S0140 或等价物; 2-丙醇, Fisher HPLC 级 A451-4 或等价物。

[0752] 移动相缓冲液是 97% 的 pH7.0 的 63mM 磷酸钠、3% 的 2-丙醇。溶液 A 是 pH7.0 的 25mM 磷酸钠。使用 $0.22 \mu\text{m}$ PES 过滤器 (Corning #431098 或等价物) 将两种溶液无菌过滤。

[0753] 世界卫生组织 (WHO) rhGH (目录号 #98/574) 是用作未经聚乙二醇化的 hGH 标准。用

1.0ml 的水将其复水并且在 WHO 缓冲液中稀释到 1mg/ml 浓度(可接受的范围为 0.9-1.1mg/ml)。以相似方式制备另一个未经聚乙二醇化的 hGH 标准,即校准溶液 Y35pAF-pB2/pB3,并且用 20mM 柠檬酸钠、2% 甘氨酸、0.5% 甘露糖醇, pH6 来稀释。也以相似方式制备经聚乙二醇化的 hGH 标准,即校准溶液 PEG30-pY35pAF-01,并且用 20mM 柠檬酸钠、2% 甘氨酸、0.5% 甘露糖醇, pH6 来稀释。对分离溶液来说,使 PEG30-pY35pAF-02 较高分子量标准达到 1mg/ml 浓度(可接受的范围为 0.9-1.1mg/ml)。所述溶液含有大致 33%PEG-PEG-GH,66.5%PEG-GH。用溶液 A 将测试物质稀释到大致 1.0mg/ml (可接受的范围为 0.9-1.1mg/ml)。使用所属领域中已知的标准技术测量所有的样品浓度。可以用任何适当的缓冲液执行样品的稀释。

[0754] 程序

[0755] 设立具有以下条件的器具:1)管柱:TSK Super SW300018675 和保护柱 18762;2)泵设定--梯度:等浓度;流动速率:0.3ml/min;持续时间:25min;最大压力:120 巴;3)注射器设定--注射:标准注射;注射体积:10 μ l;抽吸速度:100 μ l/min;注射速度:100 μ l/min;针洗涤:100 μ l H₂O;停止时间:与泵一样;4)DAD 信号:表 6;

[0756]

表 6

样品	Bw	参考	Bw	单位
214	4	600	100	nm
276	4	600	100	nm
220	8	600	100	nm
280	4	600	100	nm
250	8	600	100	nm

[0757] 峰宽:>0.05min;缝隙:2nm;停止时间:与泵一样;5)RID 信号--温度:35°C;响应时间:>0.2min4s,标准;6)管柱恒温器:温度:23°C;记录温度。

[0758] 用 10 个柱体积(在 0.3ml/min 下,50ml=166min)的移动相使管柱平衡,并且在注射样品之前净化 RID 至少 20 分钟。在样品运行前,使 DAD 和 RI 检测器自动平衡。

[0759] 注射 20 μ l 的校准溶液 Y35pAF-pB2/pB3 (或 WHO 标准),并且运行 HPLC 程序。在所获得的色谱图中,在大致 12.96 (\pm 0.05)min 的保留时间时,洗提主要的未经聚乙二醇化的峰。在相对于主峰的 0.94 \pm 0.02 的保留时间时,洗提较高分子量的未经聚乙二醇化的 rhGH 二聚体。在 7.3-8.0min 的保留时间时,洗提较高分子量的聚集物。

[0760] 注射 20 μ l 的校准溶液 PEG30-pY35pAF-01。在大致 8.33 (\pm 0.08)min 的保留时间(对未经聚乙二醇化的 rhGH 来说 0.64 的相对保留时间)时,洗提主要的经聚乙二醇化的峰。在大于 8.0min 的时间,洗提较高分子量的经聚乙二醇化的 rhGH 聚集物。

[0761] 注射 20 μ l 的分离溶液,并且运行 HPLC 程序。在 8.28min 的保留时间时洗提主要的经聚乙二醇化的峰,并且在 7.54min,即相对于主要的经聚乙二醇化的峰的 0.9 (\pm 0.05)的相对保留时间时,洗提较高分子量的物质。

[0762] 注射 20 μ l 的测试物品,并且运行 HPLC 程序。将样品运行三次并且记下平均保留时间。将 rhGH 测试物品的保留时间与 rhGH 标准相比。

[0763] 将来自测试物品的 SEC-HPLC 数据与从参考标准获得的数据相比。为测定未经聚乙二醇化的 rhGH 的纯度,将 rhGH 测试物品的积分主峰面积与总峰面积相比,并且通过:(rhGH 样品的主峰面积/总峰面积) \times 100% 计算 rhGH 测试物品中的单体的百分比。计算 hGH

测试物品中的二聚体和 / 或较高聚集物的百分比。忽视由于溶剂存在的任何峰。为测定经聚乙二醇化的 rhGH 的纯度, 将经聚乙二醇化的 rhGH 样品的积分主峰面积与总峰面积相比, 并且通过: (PEG-rhGH 样品的主峰面积 / 总峰面积) x100% 计算 PEG-rhGH 样品中的经聚乙二醇化的单体的百分比。计算经聚乙二醇化的 hGH 测试物品中的经聚乙二醇化的二聚体、较高聚集物和未经聚乙二醇化的单体的百分比。忽视由于溶剂存在的任何峰。在主要的经聚乙二醇化的 hGH 峰之前, 在色谱图中洗提的峰表示较高分子量的物质。所述较高分子量的物质可以包括(但不限于)二聚体(诸如 PEG-PEG-hGH 和其他可能的二聚体)或可溶性聚集物。在主要的经聚乙二醇化的 hGH 峰之后洗提的峰表示较低分子量的物质。所述较低分子量的物质可以包括(但不限于)未经聚乙二醇化的单体和截断形式的经聚乙二醇化的 hGH。

[0764] 通过 RP-HPLC 进行的 rhGH 的纯度和化学降解分析

[0765] 以下方法是用以通过 C4 逆相高效液相色谱法(RP-HPLC), 评估重组人类生长激素(rhGH)的相对纯度和可能的化学降解(脱酰胺基作用和氧化)。RP-HPLC 是根据相对疏水性分离分子的技术。将样品传递到共价地与烃链键合的硅石的固定相上。通过固定相延迟所关注的分子并且用等浓度溶剂洗提。色谱洗提时间是具体分子的特性。所述方法基于疏水性和与诸如脱酰胺基作用的结构改变相关的保留行为方面的细微差异来分离 rhGH。所述方法是用以支持 rhGH 的识别和纯度评估。使用所述技术可观察到 rhGH 的一些部分降解产物。

[0766] 所述技术的参考文献包括 European Pharmacopoeia2002, 第 193 页; British Pharmacopoeia2001, 第 1938-1939 页; R. M. Riggin 等人的 A Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Characterization of Biosynthetic Human Growth Hormone "Analytical Biochemistry" 167, 199-209 (1987)。

[0767] 用于所述程序的设备包括以下设备及其等价物: UV/Vis 分光光度计 (Agilent8453 或等价物); 50 μ l 石英比色皿; PD-10、Nap-10 或 Nap5 (视样品体积而定; GE Healthcare Nap5 管柱 17-0853-02 或等价物); 0.5mL Vivaspin 浓缩器(如果需要; Vivascience10, 000MWC0、PES、VS0102 或等价物); HPLC 小瓶和盖子 (Alltech100 μ l 螺帽聚丙烯小瓶 #12962、TFE 筛管盖 #73048、开孔螺帽 #73044 或等价物); 干净的 1L 和 2L 玻璃瓶; 管柱 -Vydac C4214ATP54, 具有 4.6 \times 250mm 的尺寸、5 μ 的粒度和 300 \AA 的孔径的 C4- 硅石逆相 HPLC 管柱; 能够执行线性梯度的高压液相色谱器具(诸如配备真空除气器、四级梯度泵、恒温自动取样器、恒温柱室、二极管阵列检测器(DAD)和 Chemstation 色谱软件的 Agilent1100HPLC)。

[0768] 除非另外说明, 否则用于所述程序的试剂包括水(Milli-Q 品质或等价物) 并且固体化学品是分析级的或更好的并且溶剂是 HPLC 级或更好的。除非另外指示, 否则试剂的存储和程序步骤是在室温下发生。所述化学品的实例包括 TRIS- 缓血酸胺, U. S. P. 级, Spectrum TR149 或等价物; N- 丙醇, HPLC 级, 99.9%, Sigma Aldrich34871 或等价物; 碳酸氢铵, Ultra>99.5%, Fluka#09830 或等价物。

[0769] 用于脱酰胺基控制的缓冲液是 pH9.0 的 30mM 碳酸氢铵。用于氧化控制的缓冲液是 pH7.5 的 50mM TRIS。使用 0.22 μ m PES 过滤器(Corning#431098 或等价物) 将所述溶液中的每一种溶液无菌过滤。移动相: 710ml 50mM TRIS-HCl pH7.5; 290ml 正丙醇(或具有 71% pH7.5 的 50mM Tris-HCl 和 29% 正丙醇的其他适当体积)。将 6.05g 缓血酸胺(USP 级,

Spectrum#TR149 或等价物)溶于 0.95L Milli-Q H₂O 中。用 HCl 使溶液达到 pH7.5 并且用 Milli-Q H₂O 使体积达到 1L。将 2 种溶剂(TRIS 和丙醇)混合后,使用 0.22 μm PES 过滤器(Corning#431098 或等价物)将混合物无菌过滤。调节溶液是 50%AcCN:H₂O、0.1%TFA。

[0770] 用作标准的样品包括经 1.0ml 的水复水到 1.9-2.1mg/ml 的世界卫生组织(WHO) rhGH(目录号 #98/574)和 1.9-2.1mg/ml 浓度的 rhGH 参考标准。脱酰胺基分离溶液是通过使用 PD-10、Nap-10 或 Nap-5 脱盐管柱(视样品体积而定),将 WHO 标准缓冲更换成 pH9.0 的 30mM 碳酸氢铵缓冲液而制造。使用 0.5mL Vivaspin 浓缩器将标准浓缩到 1.9-2.1mg/ml,并且在 37°C 下将样品培养 24 小时。对氧化分离溶液来说,使用 PD-10、Nap-10 或 Nap-5 脱盐管柱(视样品体积而定),将 WHO 标准缓冲更换成 pH7.5 的 50mM TRIS 缓冲液。使用 0.5mL Vivaspin 浓缩器将标准浓缩到 1.9-2.1mg/ml 并且添加 H₂O₂ 达到 0.015% 的最终浓度。在 4°C 下将反应培养 24hrs。通过添加 0.5-1 μl (如果 20mg/ml)过氧化氢酶使反应停止。为测试样品,将测试物质稀释到 2.0mg/ml 蛋白质浓度。

[0771] 程序

[0772] 设立具有的以下条件器具:(1)管柱:Vydac C4214ATP54 管柱;2)泵设定——梯度:等浓度;流动速率:0.5ml/min;持续时间:60min;最大压力:200 巴;3)自动取样器温度:4°C;4)注射器设定——注射:标准注射;注射体积:20 μl;抽吸速度:100 μl/min;针洗涤:用水 100 μl;注射速度:100 μl/min;停止时间:与泵一样;5)DAD 信号(表 7);

[0773]

样品	Bw	参考	Bw	单位
220	4	600	100	nm
276	4	600	100	nm
214	8	600	100	nm
220	4	600	100	nm

[0774] 峰宽:>0.1min;缝隙:4nm;停止时间:60min;6)管柱恒温器:温度:45°C;记录温度;7)初步积分事件(Chemstation 软件,Agilent):斜率灵敏度:0.1;峰宽:0.5;面积截除(Area Reject):1.0;峰高截除:1.0;在 10min 时积分。

[0775] 用 300mL 的调节溶液(50%AcCN、H₂O、0.1%TFA),以介于 0.5 与 1.5ml/min 之间的流动速率将管柱预调节。应在已经使用管柱之前执行预平衡,或如果峰变宽,那么用调节溶液(200-300mL)将管柱再调节。用 10 个柱体积(在 0.5ml/min 下,41.5ml=83min)的移动相使管柱平衡。

[0776] 使用自动取样器注射 20 μl 的标准,并且运行 HPLC 程序。如果 WHO 标准的保留时间不在 32.5-35min 之间,那么调整移动相组成,使管柱再平衡并且再运行标准。建议的调整包括,如果保留时间小于 32.5min,那么每升移动相添加小于 5ml 的 pH7.5 的 50mM Tris-HCl,并且如果保留时间大于 35,那么添加小于 2ml 的正丙醇。因为可能发生丙醇的蒸发,所以在样品待测试的每一天运行标准并且因此调整缓冲液。

[0777] 注射 20 μl 的脱酰胺基分离溶液,并且运行 HPLC 程序。在相对于主要峰的约 0.88±0.03 的保留时间时,脱酰氨-hGH 表现为小峰。在对应于 hGH 与脱酰氨-hGH 的峰之间的分离度为至少 1.0(电流条件导致 1.29±0.04 的分离度)并且 hGH 峰的对称因子是 0.8

到 1.8 (电流条件导致 1.26 ± 0.06 的分离度)。

[0778] 注射 $20 \mu\text{l}$ 的氧化分离溶液, 并且运行 HPLC 程序。在相对于主要的峰的约 0.8 的保留时间时, 氧化 -hGH 表现为小峰。

[0779] 注射 $20 \mu\text{l}$ 的测试物品, 并且运行 HPLC 程序。将样品运行三次。记下平均保留时间。

[0780] 数据分析

[0781] 将测试物品的平均保留时间与 rhGH 参考标准或 WHO 标准相比。计算测试物品的平均纯度: (主峰的积分面积 / 所有峰的积分面积) $\times 100\%$ 。忽视由于溶剂存在的任何峰。色谱图展示吸光度 (220nm)。

[0782] 应了解, 本文中描述的实例和实施例是仅用于说明性的目的, 并且将对所属领域的技术人员暗示根据其作出的各种明显的修改或改变, 并且包括在本申请案的主旨和范围和附加权利要求的范畴内。本文中引用的所有公开案、专利和专利申请案在此是以引用的方式全部并入本文用于所有目的。

[0783] 表 8 : 所引用的序列。

[0784]

SEQ ID#	序列名称
1	hGH 的全长氨基酸序列
2	hGH 的成熟氨基酸序列 (同功异构型 1)
3	其中 hGH 的残基 32-46 缺失的 20-kDa hGH 变体

[0001]

序列表

<110> Buechler, Ying
 Lieu, Ricky
 Ong, Michael
 Bussell, Stuart
 Knudsen, Nick
 Cho, Ho S.

<120> 表达和纯化重组人类生长激素的方法

<130> AMBX-0078.00PCT

<150> 60/638,616

<151> 2004-12-22

<150> 60/655,744

<151> 2005-02-23

<150> 60/680,977

<151> 2005-05-13

<150> 60/727,968

<151> 2005-10-17

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80

[0002]

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

<210> 2
<211> 191
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60

[0003]

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

<210> 3

<211> 176

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn
20 25 30

Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn
35 40 45

Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser
50 55 60

[0004]

Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
65 70 75 80

Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr
85 90 95

Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg
100 105 110

Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
115 120 125

Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn
130 135 140

Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr
145 150 155 160

Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
165 170 175

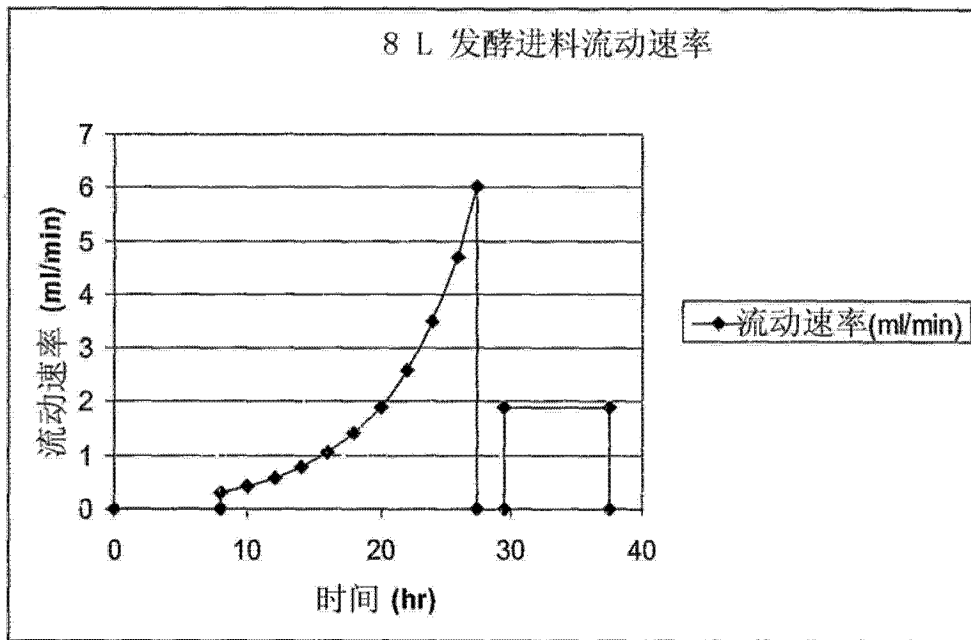


图 1

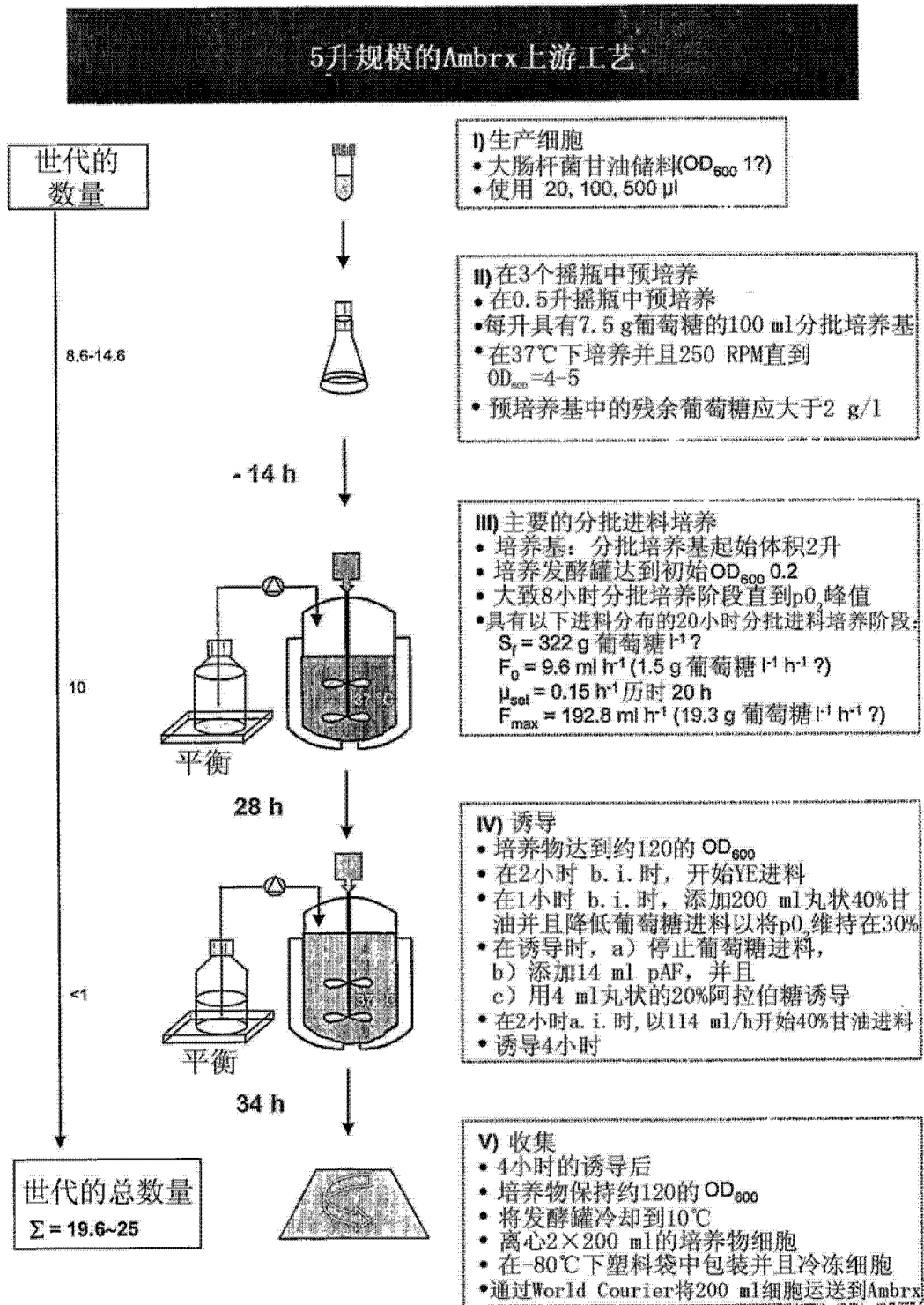
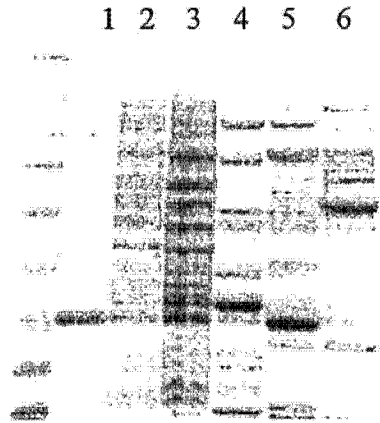


图 2

hGH周质释放对比匀化作用

A. 周质释放



B. 微流化床的溶解

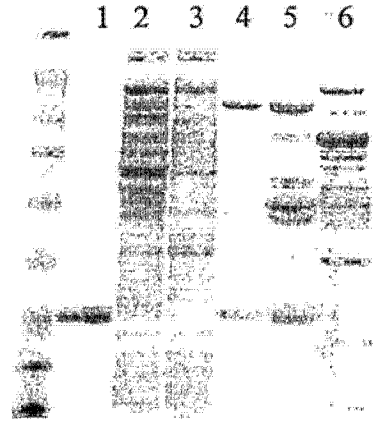


图 3

在CMC下的第三4×5升规模Ambrx上游工艺

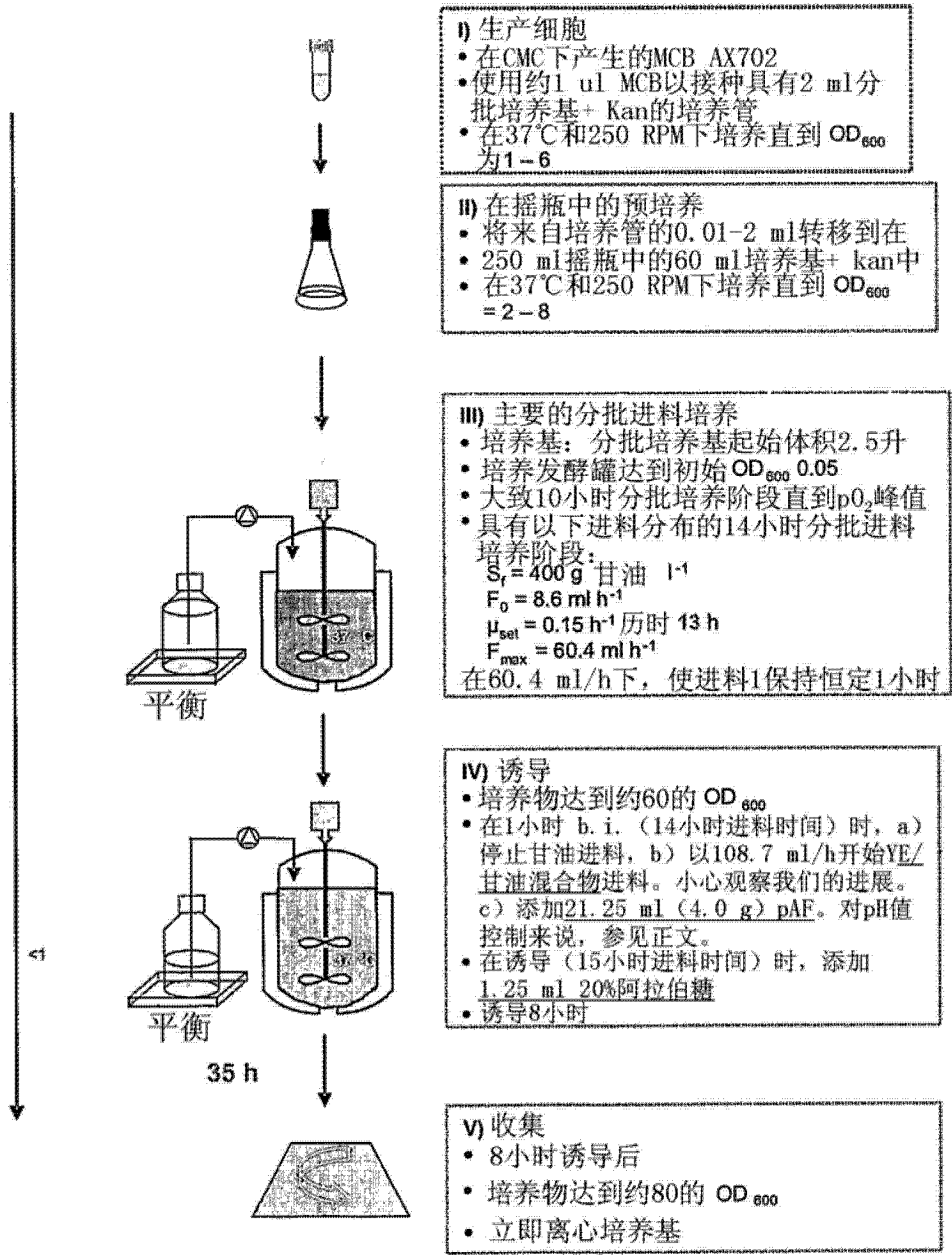
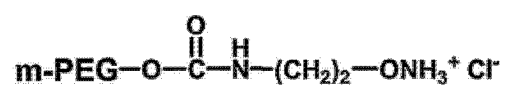


图 4



直链的、30 kDa单甲氧基-聚（乙二醇）-2-氨基乙胺氨基甲酸酯盐酸盐

图 5