

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 963 062**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61P 15/14** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 11/16** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2009 E 17161531 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3225248**

(54) Título: **Polipéptidos G-CSF bovinos modificados y sus usos**

(30) Prioridad:

**23.07.2008 US 83132 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.03.2024**

(73) Titular/es:

**AMBRX, INC. (50.0%)  
10975 North Torrey Pines Road, Suite 100  
La Jolla, CA 92037, US y  
ELANCO US INC. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**HAYS PUTNAM, ANA-MARIA A;  
KNUDSEN, NICK;  
NORMAN, THEA;  
KODER, ALAN;  
KRAYNOV, VADIM;  
HO, LILLIAN y  
CANNING, PETER C**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 963 062 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos G-CSF bovinos modificados y sus usos

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polipéptidos del factor estimulante de colonias de granulocitos bovino (bG-CSF) modificados con al menos un aminoácido no codificado de forma natural.

**Antecedentes de la invención**

El impacto económico de las enfermedades infecciosas en la producción de alimentos para animales está bien documentado. Las enfermedades infecciosas reducen las ganancias, aumentan los costes de producción y ponen en peligro los productos alimentarios, además de afectar al rendimiento, a la salud y al bienestar del animal. Las enfermedades pueden reducir el rendimiento y la calidad de la leche, dando lugar a grandes pérdidas económicas para los productores lácteos y cárnicos, en particular, cuando, en algunos casos, las enfermedades microbianas infecciosas causan la morbilidad y mortalidad de los animales recién nacidos, jóvenes (por ejemplo, de reemplazo) o adultos. Dos de dichas enfermedades, la mastitis y la enfermedad respiratoria bovina (BRD), pueden tener efectos devastadores en la producción de animales para la alimentación.

La mastitis se define como una inflamación de la glándula mamaria. Puede afectar a cualquier mamífero, por ejemplo, a vacas, ovejas y cabras. La mastitis bovina es una infección de la ubre de los rumiantes, tales como las vacas, causada principalmente por bacterias gram positivas y gram negativas, y, en especial, en las vacas en unidades productoras intensivas de leche. La infección bacteriana produce la inflamación de la glándula mamaria (es decir, los pezones y la ubre). Los animales pueden volverse más susceptibles a la mastitis debido al deterioro de la función microbicida de los neutrófilos durante el período periparturiente. La enfermedad es particularmente problemática y de considerable importancia económica, porque el patógeno se transfiere fácilmente de un animal a otro durante el procedimiento de ordeño. Se suele desarrollar en las primeras semanas en torno al parto, y puede reaparecer con cada lactancia. Algunos de los principales microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Véase también "Bovine Mastitis", editado por Glenys Bloomfield, V & O Publications 1987. Estos microorganismos invaden la ubre a través del canal del pezón y producen inflamación del tejido productor de leche, causando la formación de tejido cicatricial que, una vez formado, puede causar una reducción permanente en la producción de leche de vaca. Una infección también puede alterar la composición, la cantidad, el aspecto y la calidad de la leche. Los patógenos causantes de la mastitis se dividen en dos categorías, en concreto, contagiosos y ambientales. Las bacterias contagiosas, tales como el *Streptococcus agalactiae* y el *Staphylococcus aureus*, colonizan principalmente los sitios tisulares del huésped, tales como las glándulas mamarias, los canales de los pezones y las lesiones cutáneas de los pezones; y se transmiten de una vaca infectada a otra durante el procedimiento de ordeño. Las bacterias ambientales, a menudo estreptococos, enterococos y organismos coliformes, están comúnmente presentes en el entorno de la vaca a partir de fuentes como las heces de las vacas, el suelo, el material vegetal, los lechos o el agua; y realizan la infección mediante el contacto oportunista casual con un animal. La distinción entre los patógenos contagiosos y los ambientales, aunque no exclusiva, es importante en la práctica, porque se necesitan diferentes medidas de mantenimiento de rebaños lecheros para los diferentes grupos de microorganismos. En todos los casos de mastitis bovina, cualquiera que sea el microorganismo causal, la vía de transmisión del patógeno invasor en la glándula interna de la ubre es a través del orificio del pezón y el canal de la tetilla. Las fuentes comunes de microorganismos nocivos incluyen el equipo de ordeño insalubre, el ordeñador, otros animales masticulados, un entorno estable insalubre y los propios procesos de eliminación (defecación/micción) de los animales.

Hay una variedad de formas o tipos de mastitis bovina, con gravedad y sintomatología variables, que incluyen los siguientes: (1) Infección de la ubre: la invasión de la cavidad de la ubre por microorganismos que se multiplican dentro de la glándula y causan inflamación; (2) mastitis no clínica o subclínica: una forma de mastitis en la que no hay inflamación de la glándula o ninguna anomalía observable de la leche, aunque hay cambios en la leche que pueden detectarse mediante pruebas específicas. Este tipo de mastitis es, con mucho, el más prevalente, y causa la mayor pérdida general en la mayoría de los rebaños. Se suele denominar mastitis "oculta"; (3) mastitis clínica: una forma de mastitis en la que se observan condiciones anómalas de la ubre y secreción. La mastitis clínica leve implica cambios en la leche tales como escamas, coágulos y un aspecto acuoso o inusual. El calor y la sensibilidad de la ubre son leves o están ausentes, pero puede haber signos de inflamación. La mastitis clínica grave implica un inicio repentino con una inflamación del cuero infectado que es caliente, dura y sensible. El aspecto de la leche es anormal y la producción de leche es baja. A veces, además de los efectos locales en la ubre, la vaca se enferma. Hay signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida del apetito. La combinación de estas afecciones se suele conocer como mastitis sistémica aguda, porque no solo se ve afectada la ubre, sino todo el animal; y (4) mastitis crónica: una forma de mastitis causada por una infección persistente de la ubre que se da, la mayor parte del tiempo, en la forma no clínica, pero que, en ocasiones, se puede convertir en una forma clínica activa. Despues de estos "brotes", la forma no clínica, en general, regresa temporalmente. (Véase, en general, "Current Concepts of Bovine Mastitis", publicado por The National Mastitis Council, Inc., 2º Ed. 1978 en la pág. 5).

La mastitis sigue causando grandes pérdidas económicas a la industria láctea. La mastitis afecta a la rentabilidad de un rebaño de varias maneras, tanto directa como indirectamente, entre las que se incluyen: (1) pérdida de producción de leche; (2) mayores tasas de sacrificio de vacas infectadas; (3) reducción del valor de la leche; (4) leche descartada después del tratamiento con antibióticos; (5) costes veterinarios (antibióticos y visitas veterinarias); y (6) muertes. ("Bovine Mastitis", Glenys Bloomfield, *supra*, en la pág. 33).

Otra enfermedad común que afecta a la industria ganadera es la fiebre del transporte (enfermedad respiratoria bovina o BRD). La BRD ha sido denominada por algunos como una "enfermedad compleja" por dos razones: por lo general, está causada por una variedad de patógenos, tanto víricos como bacterianos, que interactúan entre sí para producir una enfermedad en toda regla, y porque el comportamiento de los patógenos puede seguir un procedimiento secuencial que, etapa a etapa, da lugar a animales enfermos. Los patógenos bacterianos son una de las causas más conocidas del síndrome agudo. Los patógenos bacterianos pueden invadir el tracto respiratorio bovino tras verse comprometido por una infección vírica y otros factores tales como el estrés del destete, el transporte, un cambio de alimento y una variación en la temperatura y humedad ambiental, que pueden preceder y contribuir a la infección. En muchos casos, a esto se le añade la exposición del ganado a patógenos durante el transporte cuando se mezclan con el ganado de otro origen en camiones, corrales y graneros de subastas, dando lugar a la alta incidencia de la enfermedad en el ganado transportado al cebadero.

Se han aislado y asociado varias especies de bacterias con BRD, y algunas de las más comunes son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y (o) *Histophilus somni*. *Haemophilus somnus* es un agente patógeno virulento que causa septicemia en el ganado y, algunas veces, las manifestaciones resultantes se conocen como "complejo *Haemophilus somnus*", del que una forma es la enfermedad respiratoria, el virus tal como la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), diarrea vírica bovina (BVD) y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) también pueden participar en el inicio de un complejo de BRD, a menudo abriendo la puerta a infecciones bacterianas secundarias.

Debido a que es prácticamente imposible eliminar estos organismos del medio ambiente, el complejo de BRD se debe abordar desde el punto de vista de evitar que estos agentes causantes de enfermedades se arraiguen, y la exploración y el tratamiento de los casos clínicos de la manera más rápida y efectiva posible. Las enfermedades respiratorias son una causa importante de la pérdida por enfermedad de ganado cárnico. En general, se reconoce que la causa principal de mortalidad en la mayoría de los casos de la fiebre del transporte es una neumonía bacteriana (en general, por *Pasteurella*). *Pasteurella haemolytica*, en particular, el tipo 1A, es la bacteria más común aislada de los casos de enfermedad respiratoria en América del Norte. La vacunación contra algunos de los agentes infecciosos implicados en la fiebre del transporte a veces es útil, pero las vacunas están disponibles y son eficaces solo para algunos de los agentes que se sabe que participan en la enfermedad compleja.

La terapia con antibióticos ha sido un componente principal de la estrategia de control de la mastitis y la BRD. La patente de EE.UU. n.º 7.182.948, indica que los baños antimicrobianos de los pezones que contienen yodo han demostrado ser eficaces contra las infecciones mamarias y las bacterias que causan mastitis (Pankey, J. W. y col., (1983) *J. Dairy Sci.* 66 (1), 161-167). En general, estas composiciones se administran en el pezón sumergiendo o pulverizando el pezón antes del ordeño, así como después de la extracción de la copa de ordeño. Para reducir la mastitis, se han desarrollado baños comerciales de los pezones que contienen una variedad de agentes antimicrobianos que incluyen yodóforos, compuestos de amonio cuaternario, compuestos de liberación de cloro (por ejemplo, hipocloritos alcalinos), compuestos oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, perácidos), ácidos carboxílicos protonados (por ejemplo, ácido heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, undecanoico), ácidos aniónicos (por ejemplo, ácidos alquilarilsulfónicos), dióxido de cloro (de clorito) y bisbiguanidas tales como clorhexidina. Estos agentes, que tienen diversos grados de efectividad, limitan la transmisión de la mastitis al reducir las poblaciones de patógenos en el pezón. Sin embargo, hay problemas asociados con el uso de agentes antimicrobianos. Los más frecuentes son la irritación de los pezones y las grietas de los pezones. Para aliviar estos problemas, se han incluido aditivos emolientes tales como glicerina y lanolina en dichas composiciones. Sin embargo, incluso con el uso de estos emolientes, todavía se puede producir la irritación de la piel.

La patente de EE.UU. n.º 6.790.867 indica que las inyecciones subcutáneas de formulaciones que combinan un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) tal como flunixina, con un antibiótico derivado de tiamfenicol o cloranfenicol fluorado tal como florenfénico, se pueden usar para tratar la BRD. La publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20070155799 desvela nuevos compuestos de fenicol que se pueden usar como profármacos antibióticos y en combinación con AINE u otros antibióticos.

El NMC (anteriormente el Consejo Nacional sobre la Mastitis), una organización sin fines de lucro dedicada a reducir la mastitis y a mejorar la calidad de la leche, enfatiza la importancia de una higiene adecuada de los pezones, pero también un cuidado apropiado de los mismos para la prevención de la mastitis. El daño económico causado por la mastitis ha dado lugar a mucha investigación en su control. Se ha informado que las tensiones físicas, así como las condiciones ambientales contribuyen en gran medida a la infección por mastitis. Véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20020051789. Dado que se documentó que la mastitis subclínica estaba directamente relacionada con la mala condición del pezón (Neijenhuis, P. y col., (2001) *J. Dairy Sci.* (84) 2664-2672), se han desarrollado varias soluciones comerciales para los baños de los pezones que incorporan agentes acondicionadores (National Mastitis Council, "Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since 1980"; enero de 2002). Se ha demostrado que la callosidad y la rugosidad del extremo del pezón

tienen una relación directa con la mastitis clínica (Neijenhuis, F. y col., (2001) *J. Dairy Sci.* (84) 2664-2672). La reducción del agrietamiento y de la irritación de los pezones, así como el mantenimiento de la flexibilidad del pezón son muy importantes para controlar las infecciones mamarias. La glicerina también se ha usado como un acondicionador de los pezones en soluciones de baño de los pezones. Sin embargo, los estudios indican que no hay una reducción significativa de las bacterias causantes de la mastitis tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* o coliformes cuando el contenido de glicerina aumenta del 2 % al 10 % en una solución de baño para los pezones de yodo al 1 % (National Mastitis Council, "Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since 1980"; enero de 2002). Por lo tanto, aunque hay productos disponibles tales como soluciones para el baño de los pezones, todavía existe una necesidad sin cubrir de modular la incidencia, la recurrencia y/o la gravedad de la mastitis.

La patente de EE.UU. n.º 5.849.883 desvela una serie de antibióticos usados en el tratamiento de la mastitis que incluyen, pero sin limitación, antibióticos beta-lactámicos tales como penicilinas (ampicilina, cloxacilina, hetacilina, nafcilina, penicilina G, (bencil-penicilina), procaína-penicilina) y cefalosporinas (cefoperazona, cefuroxima, cefalonio, cefapirina, cefoxazol, cefracetril); antibióticos aminoglucósidos (framicetina, neomicina, novobiocina, estreptomicina); antibióticos macrólidos (eritromicina); tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina); y antibióticos polipeptídicos (polimixina B). El tratamiento con antibiótico para la mastitis, en general, se administra por medio de infusiones intramamarias, bien en vacas en lactancia cuando se detecta la mastitis clínica o en el secado (terapia de vacas en período seco). (*Mastitis bovina, supra*, en pág. 69) En los casos en los que la enfermedad clínica es grave, los antibióticos deben administrarse por vía parenteral, ya que las infusiones intramamarias no son eficaces debido a la obstrucción de los conductos. El documento US2008/0146781 describe G-CSF que contiene aminoácidos no naturales.

Las primeras esperanzas de que los antibióticos permitieran el control completo de la enfermedad no se han hecho realidad. Ninguno de los antibióticos mencionados anteriormente usados hasta la fecha ha sido completamente satisfactorio. Además, se ha encontrado que es muy deseable reemplazar el tratamiento con antibiótico por el tratamiento con compuestos quimioterapéuticos no antibióticos, por las siguientes razones: (1) los antibióticos efficaces en medicina humana no deben usarse en medicina veterinaria, para no aumentar la resistencia a las cepas de bacterias que aparecen en las enfermedades humanas; (2) Los antibióticos deben reservarse para aquellas enfermedades para las que no estaría disponible ningún compuesto de fármaco quimioterápico, ya que se ha demostrado que las cepas bacterianas acumulan resistencia a un antibiótico después del uso prolongado de dicho antibiótico; y (3) *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos mencionados anteriormente, ya ha acumulado una resistencia contra la mayoría de los antibióticos usados en el tratamiento de la mastitis bovina.

Uno de dichos procedimientos para el tratamiento con un compuesto farmacológico quimioterápico no antibiótico se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.610.993, que reivindica un procedimiento de tratamiento de animales para la mastitis bovina con una cantidad eficaz de al menos un compuesto disulfuro de N-óxido de piridina. Otro procedimiento de los mismos inventores se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.401.666, que reivindica un procedimiento de tratamiento de animales con mastitis bovina con una cantidad eficaz de al menos una sal metálica de 2-tiona-N-óxido de piridina. A pesar de estos varios procedimientos publicados, sigue siendo muy importante encontrar procedimientos rentables que utilicen compuestos no antibióticos que superen sustancialmente los inconvenientes de los antibióticos usados hasta la fecha y que, sin embargo, sean efficaces para tratar y prevenir la mastitis.

Otra enfermedad común que afecta a la industria ganadera es la fiebre del transporte (enfermedad respiratoria bovina). Las enfermedades respiratorias son una causa importante de la pérdida por enfermedad de ganado cárnico. La expresión "fiebre del transporte" se usa para describir el complejo de enfermedad respiratoria observado en el ganado de 6 meses de vida o más tras el transporte ya sea a corrales de engorde o a pastos. El estrés provocado por el destete, la castración, el descornado, el ayuno, la superpoblación, la exposición a agentes infecciosos, los cambios en la dieta, el transporte, las temperaturas ambientales extremas y otros factores estresantes combinados con infecciones víricas, bacterianas, micoplasmáticas y/o por clamidia contribuyen al complejo de fiebre del transporte. La mezcla de terneros de diferentes granjas y/o barracas de venta facilita enormemente la exposición a agentes infecciosos. La patente de EE.UU. n.º 6.497.869 describe algunos de los agentes infecciosos iniciales que pueden afectar al ganado. La mezcla de poblaciones puede ser un factor de predisposición más importante para la fiebre del transporte que los factores de estrés, aunque las enfermedades pueden ocurrir sin mezclarse y los factores estresantes en general empeoran drásticamente las enfermedades respiratorias. Los intentos de reducir el estrés por destete, castración, descornado, etc. y la aclimatación del ganado a nuevas dietas días o semanas antes del transporte a veces son satisfactorios (aunque pueden no ser rentables) para reducir la incidencia de la fiebre del transporte. La vacunación contra algunos de los agentes infecciosos implicados en la fiebre del transporte a veces son útiles, pero las vacunas están disponibles y son efficaces solo para algunos de los agentes que se sabe que participan en la enfermedad compleja.

En general, se reconoce que la causa final de mortalidad en la mayoría de los casos de la fiebre del transporte es una neumonía bacteriana (en general, por *Pasteurella*). *Pasteurella haemolytica*, en particular, el tipo 1A, es la bacteria más común aislada de los casos de enfermedad respiratoria en América del Norte. Los intentos de reproducir experimentalmente la neumonía bacteriana en el ganado, en general, no tienen éxito sin un estrés grave y un daño de predisposición en el tracto respiratorio. En general, se cree que durante los momentos de estrés, los virus, el micoplasma y/o la clamidia dañan con mayor frecuencia inicialmente el tracto respiratorio, lo que predispone a una

infección y enfermedad bacteriana grave.

En general, un brote típico de enfermedad respiratoria clínica comienza a las pocas horas o días de la llegada del ganado al cebadero. El ganado recién transportado en el intervalo de peso de aproximadamente 180 a 230 kg comúnmente tiene del 10 al 80 % de morbilidad y del 1 al 10 % de mortalidad, o más, ante la enfermedad del tracto respiratorio. Cuando se analiza el suero del ganado vacuno para determinar un aumento de anticuerpos de cuatro veces (seroconversión) y el tracto respiratorio y sus secreciones sometidas a aislamientos microbiológicos, se puede identificar una gran cantidad de agentes etiológicos. Muchos animales, los enfermos y los aparentemente sanos pueden mostrar haber sido infectados por uno o más agentes (la enfermedad del tracto respiratorio probablemente rara vez se debe a un solo agente infeccioso). Aunque el complejo de la enfermedad respiratoria bovina se reconoce clínicamente en el cebadero tras la llegada, las infecciones que dan origen a la enfermedad clínica probablemente comiencen en las barracas de venta, donde el ganado se reúne por primera vez de diferentes granjas. Véase también "Bovine Respiratory Disease", Loan, R. W. Texas A & M University Press, 1984.

La administración de un compuesto de tratamiento o modulación de la incidencia, recurrencia, duración y/o gravedad de la mastitis o enfermedad respiratoria en el ganado u otras infecciones en animales no humanos, incluyendo, pero sin limitación, ganado, aves de corral, cerdos, caballos, perros y gatos sería útil en medicina veterinaria. Los ejemplos de dichas infecciones incluyen, pero sin limitación, septicemia neonatal en caballos, pieeuropneumonia en cerdos y neumonía en animales no humanos. Dichos compuestos pueden restablecer o modular la función de los neutrófilos en el animal.

La familia supergénica de la hormona del crecimiento (GH) (Bazan, F. *Immunology Today* 11: 350-354 (1991); Mott, H. R. y Campbell, I. D. *Current Opinion in Structural Biology* 5: 114-121 (1995); Silvennoinen, O. y Ihle, J. N. (1996) "SIGNALING BY THE HEMATOPOIETIC CYTOKINE RECEPTORS") representa un conjunto de proteínas con características estructurales similares. Cada miembro de esta familia de proteínas comprende un paquete de cuatro hélices. Aunque todavía hay más miembros de la familia que aún no se han identificado, algunos miembros de la familia incluyen los siguientes: hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, eritropoyetina (EPO), trombopoietina (TPO), interleucina-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (subunidad p35), IL-13, IL-15, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de la leucemia, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, interferón épsilon, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y cardiotrofina-1 (CT-1) ("la familia de supergenes GH"). Los miembros de la familia de supergenes GH tienen estructuras secundarias y terciarias similares, a pesar de que, en general, tienen una identidad de secuencia de aminoácidos o ADN limitada. Las características estructurales compartidas permiten identificar fácilmente a los nuevos miembros de la familia de genes. Se describen cuatro polipéptidos de paquete helicoidal en el documento WO 2005/074650 titulado "Modified Human Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses".

Un miembro de la familia supergénica de GH es el factor estimulante de colonias de granulocitos. (G-CSF). El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es uno de los varios factores de crecimiento de glicoproteínas conocidos como factores estimulantes de colonias (CSF), porque favorecen la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas. El G-CSF estimula la proliferación de células precursoras de médula ósea específicas y su diferenciación en granulocitos. Se distingue de otros CSF por su capacidad tanto para estimular la formación de colonias de granulocitos neutrófilos en agar semisólido como para inducir la diferenciación terminal de células leucémicas mielomonocíticas murinas *in vitro*. El factor estimulante de colonias de granulocitos es un potente estímulo para la proliferación y maduración de neutrófilos *in vivo* (Cohen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987; 84: 2484-2488; véase también Heidari y col., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 81:45-57). El G-CSF también es capaz de inducir la activación funcional o "cebado" o neutrófilos maduros *in vitro* (Weisbart, R. H., Gasson, C. G. y D. W. Golde. "Annals of Internal Medicine", 1989; 110:297-303). Se ha demostrado que el G-CSF ceba los granulocitos humanos y mejora la liberación de superóxido estimulada por el péptido quimiotáctico, *N*-formil-metionil-leucil-fenalanina (S. Kitagawa, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 144:1143-1146, y C. F. Nathan, *Blood* 1989; 74:301-306), y activan la fagocitosis mediada por IgA de neutrófilos humanos (Weisbart, R. H., y col., *Nature* 1988; 332: 647-649).

Los neutrófilos son un componente fundamental de los mecanismos de defensa del huésped contra las infecciones bacterianas y fúngicas. El G-CSF es capaz de inducir un aumento en el número absoluto de neutrófilos circulantes y mejora la función de los neutrófilos.

Se ha descrito la clonación de ADNc y la expresión de G-CSF humano recombinante (hG-CSF), y se ha confirmado que el hG-CSF recombinante presenta la mayoría, si no todas, de las propiedades biológicas de la molécula nativa (Souza, L. y col. *Science* 232, 61-65 (1986)). El análisis de secuencia de los clones de ADNc y ADN genómico ha permitido la deducción de la secuencia de aminoácidos, y revela que la proteína tiene 204 aminoácidos de longitud con una secuencia señal de 30 aminoácidos. La proteína madura tiene una longitud de 174 aminoácidos y no posee sitios potenciales de glicosilación ligada a N, sino varios sitios posibles para la glucosilación ligada a O.

La clonación y expresión de ADNc que codifica el G-CSF humano se ha descrita por dos grupos (Nagata, S. y col *Nature* 319, 415-418 (1986); Souza, L. M. y col., *Science* 232, 61-65 (1986)). El primer informe de un clon de ADNc de G-CSF sugirió que la proteína madura tenía 177 aminoácidos de longitud. Los autores informaron que también habían identificado un clon de ADNc para G-CSF que codificaba una proteína que carecía de un tramo de tres

aminoácidos. Este ADNc de G-CSF más corto expresa la actividad esperada de G-CSF. El segundo informe describe una secuencia de ADNc idéntica a esta forma corta y no menciona otras variantes. Dado que estos autores confirmaron que el ADNc corto expresa G-CSF con el perfil esperado de actividad biológica, es probable que esta sea la forma importante de G-CSF y que la forma más larga sea una variante menor de corte y empalme o el resultado de una aberración de la clonación.

Matsumoto y col., en "Infection and Immunity", Vol. 55, n.º 11, pág. 2715 (1987) analiza el efecto protector del G-CSF humano sobre la infección microbiana en ratones neutropénicos.

Las siguientes publicaciones de patente se refieren al G-CSF: el documento WO 8703689 describe hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos de G-CSF humano y su uso en la purificación de G-CSF; el documento WO 8702060 desvela polipéptidos de tipo G-CSF humano y procedimientos para producirlos; la patente de EE.UU. n.º 4.810.643 desvela polipéptidos similares a G-CSF humano, secuencias que los codifican y procedimientos para su producción; y los documentos WO 8604605 y WO 8604506 desvelan un gen que codifica G-CSF humano e inhibidores de la infección que contienen G-CSF humano. El aislamiento de h-GCSF y la producción de G-CSF en células huésped tales como *E. coli* se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.810.643; 4,999,291; 5.580.755; y 6.716.606.

G-CSF es una proteína farmacéuticamente activa que regula la proliferación, la diferenciación y la activación funcional de los granulocitos neutrófilos (Metcalf, *Blood* 67:257 (1986); Yan, y col. *Blood* 84(3): 795-799 (1994); Bensinger, y col. *Blood* 81(11): 3158-3163 (1993); Roberts, y col., *Expt'l Hematology* 22: 1156-1163 (1994); Neben, y col. *Blood* 81(7): 1960-1967 (1993); Welte y col. *PNAS-USA* 82: 1526-1530 (1985); Souza y col. *Science* 232: 61-65 (1986) y Gabrilove, J. *Seminars in Hematology* 26:2 1-14 (1989). El G-CSF se purificó hasta la homogeneidad a partir de los sobrenadantes del cultivo celular de la línea celular 5637 de carcinoma de vejiga humana (Welte y col., *Proc. Natl. Acad. Sci* (1985) 82:1526-30). La secuencia del ADNc que codifica el hG-CSF nativo se conoce gracias a Souza y col., *Science* (1986) 232:61-65. Como consecuencia del corte y empalme alternativo en el segundo intrón, existen dos formas naturales de hG-CSF con 204 o 207 aminoácidos, de las que los primeros 30 representan un péptido señal ((Lymphokines, IRL Press, Oxford, Washington D. C., Editores D. Male y C. Rickwood). Se demostró que la proteína madura tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa y tiene 5 restos de cisteína que pueden formar puentes disulfuro intermoleculares o intramoleculares. Los estudios de unión han demostrado que hG-CSF se une a los granulocitos neutrófilos. Se observa poca o ninguna unión con las estirpes celulares eosinófilas linfoides y eritroides, así como con los macrófagos.

En los humanos, el G-CSF endógeno se detecta en el plasma sanguíneo (Jones y col. "Bailliere's Clinical Hematology" 2:1 83-111 (1989)). El hG-CSF es producido por fibroblastos, macrófagos, linfocitos T, trofoblastos, células endoteliales y células epiteliales, y es el producto de expresión de un gen de copia única compuesto por cuatro exones y cinco intrones ubicados en el cromosoma diecisiete. La transcripción de este locus produce una especie de ARNm que se procesa diferencialmente, produciendo dos formas de ARNm de hG-CSF, una versión que codifica una proteína de 177 aminoácidos, la otra que codifica una proteína de 174 aminoácidos (Nagata y col. *EMBO J* 5: 575-581 (1986)), y se ha encontrado que la forma compuesta por 174 aminoácidos tiene la mayor actividad biológica específica *in vivo*. El hG-CSF es una especie de reactividad cruzada, de modo que cuando el G-CSF humano se administra a otro mamífero tal como un ratón, canino o mono, se provoca leucocitosis de neutrófilos sostenida (Moore y col. *PNAS-USA* 84: 7134-7138 (1987)).

G-CSF se puede obtener y purificar a partir de una serie de fuentes. El G-CSF humano natural (nhG-CSF) se puede aislar de los sobrenadantes de líneas de células tumorales humanas cultivadas. El desarrollo de tecnología de ADN recombinante, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.810.643 (Souza) ha permitido la producción de cantidades a escala comercial de G-CSF en forma glicosilada como un producto de la expresión de células huésped eucariotas, y de G-CSF en forma no glicosilada como un producto de la expresión de la célula huésped procariotas.

Se ha encontrado que el G-CSF es útil en el tratamiento de indicaciones en las que un aumento de los neutrófilos proporcionará beneficios. El G-CSF puede movilizar células madre y precursoras de la médula ósea, y se usa para tratar pacientes cuyos granulocitos se han agotado con la quimioterapia, o como un preludio para los trasplantes de médula ósea. Por ejemplo, para los pacientes con cáncer, el G-CSF es beneficioso como un medio de estimulación selectiva de la producción de neutrófilos para compensar los déficits hematopoyéticos debidos a la quimioterapia o la radioterapia. Otras indicaciones incluyen el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas y afecciones relacionadas tales como la sepsis, que normalmente es causada por un metabolito de bacterias. El G-CSF también es útil solo, o en combinación con otros compuestos tales como otras citocina, para el crecimiento o la expansión de células en cultivo, por ejemplo, para trasplantes de médula ósea.

El receptor de G-CSF (G-CSFR) es un miembro de la familia de receptores del factor hematopoyético/citocina/de crecimiento, que incluye varios receptores de factor de crecimiento tales como los receptores de interleucina (IL)-3, -4 y -6, el receptor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), el receptor de la eritropoyetina (EPO), así como los receptores de la prolactina y de la hormona del crecimiento. Véase, Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci* EE.UU. 87: 6934-6938 (1990). Los miembros de la familia de receptores de citocina contienen cuatro restos de cisteína conservados y un motivo de triptófano-serina-X-triptófano-serina situado justo fuera de la región transmembrana. Se cree que las secuencias conservadas participan en las interacciones proteína-proteína. Véase,

por ejemplo, Chiba y col., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 184: 485-490 (1992). El receptor de G-CSF consiste en una sola cadena peptídica con un peso molecular de aproximadamente 150 kD (Nicola, *Immunol. Today* 8 (1987), 134).

El hG-CSF glicosilado se ha comparado con hG-CSF desglicosilado, preparado por digestión enzimática *in vitro* con neuraminidasa y endo- $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa, con respecto a su estabilidad en función del pH y la temperatura (Oheda y col., 1990, *J. Biol. Chem.* 265 (20): 11432-35). El hG-CSF desglicosilado, disuelto a una concentración de 1 µg/ml en tampón de fosfato 20 mM que contiene NaCl 0,2 M y Tween 20 al 0,01 %, se inactivó rápidamente dentro del intervalo de pH de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8 después de una incubación de dos días a 37 °C. Por el contrario, el hG-CSF glicosilado retuvo más del 80 % de su actividad en las mismas condiciones. Además, la evaluación de la estabilidad térmica de ambas formas de hG-CSF, medida mediante ensayo biológico y análisis calorimétrico, indicó que hG-CSF desglicosilado era menos estable térmicamente que la forma nativa de hG-CSF.

Se han adoptado varios enfoques para proporcionar composiciones de G-CSF estables y farmacéuticamente aceptables. Un enfoque para mejorar la estabilidad de la composición de G-CSF implica la síntesis de derivados de la proteína. La patente de EE.UU. n.º 5.665.863 desvela la formación de proteínas químicas recombinantes que comprenden G-CSF acoplado con albúmina, que tienen nuevas propiedades farmacocinéticas. La patente de EE.UU. n.º 5.824.784 y la patente de EE.UU. n.º 5.320.840 desvelan la unión química de polímeros hidrosolubles a proteínas para mejorar la estabilidad y proporcionar protección contra la degradación proteolítica, y más específicamente, moléculas de G-CSF modificadas terminalmente que portan polímeros unidos químicamente, que incluyen polietilenglicol.

Se han determinado estructuras de una serie de citocinas, que incluyen G-CSF (Zink y col., *FEBS Lett.* 314:435 (1992); Zink y col., *Biochemistry* 33:8453 (1994); Hill y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:5167 (1993)), GM-CSF (Diederichs, K., y col. *Science* 154: 1779-1782 (1991); Walter y col., *J. Mol. Biol.* 224:1075-1085 (1992)), IL-2 (Bazan, J. F. *Science* 257: 410-411 (1992); McKay, D. B. *Science* 257: 412 (1992)), IL-4 (Redfield y col., *Biochemistry* 30: 11029-11035 (1991); Powers y col., *Science* 256:1673-1677 (1992)) y IL-5 (Milburn y col., *Nature* 363: 172-176 (1993)) mediante estudios de difracción de rayos X y de RMN, y muestran una sorprendente conservación con la estructura de GH, a pesar de la falta de una homología de secuencia primaria significativa.

Un enfoque alternativo para aumentar la estabilidad del G-CSF en la composición implica la alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína. La patente de EE.UU. n.º 5.416.195 desvela análogos diseñados mediante ingeniería genética de G-CSF que tienen una mejor estabilidad de la composición, en los que el resto de cisteína encontrado normalmente en la posición 17 de la cadena polipeptídica madura, el resto de ácido aspártico encontrado en la posición 27 y al menos uno de los restos de prolina en tandem encontrados en las posiciones 65 y 66, todos son reemplazados por un resto de serina. La patente de EE.UU. n.º 5.773.581 desvela los análogos de G-CSF diseñados por ingeniería genética de G-CSF que se han conjugado covalentemente con un polímero hidrosoluble.

Las diversas formas de G-CSF humano, incluyendo su preparación y purificación, útiles en un procedimiento de tratamiento o prevención de la mastitis se describen en detalle en la patente de EE.UU. n.º 4.810.643. La patente de EE.UU. n.º 4.810.643 describe y reivindica nuevos segmentos de genes, plásmidos recombinantes biológicamente funcionales y vectores de ADN vírico y células huésped procariotas y eucariotas que contienen un gen de G-CSF o una variante diseñada mediante ingeniería genética de un gen de G-CSF. Las células huésped expresan G-CSF biológicamente activo o una variante diseñada mediante ingeniería genética de G-CSF. La patente de EE.UU. n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932 describen diversos estudios con G-CSF humano en ganado bovino. Los estudios se realizaron evaluando enfermedades respiratorias (*Pasteurella hemolytica*), respuestas a exposiciones bacterianas (*Klebsiella pneumonia*) o mastitis coliforme (*E. coli*) en el ganado.

La patente de EE.UU. n.º 5.849.883 presenta la secuencia polinucleotídica y polipeptídica de G-CSF bovino maduro (bG-CSF), y describe procedimientos de clonación, aislamiento y purificación del polipéptido y de sus análogos. El b-GCSF maduro tiene 174 aminoácidos de longitud (SEQ ID NO: 1) que tiene un 82 % de homología con hG-CSF. Un polipéptido bG-CSF con un resto de aminoácido de metionina inicial se muestra como SEQ ID NO: 2. La secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO: 1 se muestra como SEQ ID NO: 3. La secuencia de polinucleótidos que codifica SEQ ID NO: 2 se muestra como SEQ ID NO: 4. Heidari y col. describen la expresión, purificación y actividades biológicas de bG-CSF en "Veterinary Immunology and Immunopathology" (2001) 81:45-57.

La unión covalente del polímero hidrófilo polietilenglicol, PEG abreviado, es un procedimiento de aumento de la hidrosolubilidad, la biodisponibilidad, el aumento de la semivida en suero, el aumento de la semivida terapéutica, la modulación de la inmunogenicidad, la modulación de la actividad biológica o la prolongación del tiempo en circulación de muchas moléculas biológicamente activas, que incluyen proteínas, péptidos y, en particular, moléculas hidrófobas. El PEG se ha usado ampliamente en productos farmacéuticos, en implantes artificiales y en otras aplicaciones en las que la biocompatibilidad, la falta de toxicidad y la falta de inmunogenicidad son importantes. Para aumentar al máximo las propiedades deseadas del PEG, el peso molecular total y el estado de hidratación del polímero PEG o los polímeros unidos a la molécula biológicamente activa deben ser suficientemente altos para conferir las características ventajosas asociadas normalmente con la unión del polímero PEG, tales como el aumento de la hidrosolubilidad y la semivida en circulación, sin afectar adversamente a la bioactividad de la molécula precursora.

Los derivados de PEG se unen frecuentemente a moléculas biológicamente activas a través de funcionalidades

5        químicas reactivas tales como restos de lisina, cisteína e histidina, el extremo N-terminal y restos de hidrato de carbono. Las proteínas y otras moléculas suelen tener un número limitado de sitios reactivos disponibles para la unión del polímero. A menudo, los sitios más adecuados para la modificación a través de la unión del polímero desempeñan un papel significativo en la unión del receptor, y son necesarios para la conservación de la actividad biológica de la molécula. Como resultado de ello, la unión indiscriminada de cadenas poliméricas a dichos sitios reactivos en una molécula biológicamente activa suele conducir a una reducción significativa o incluso a la pérdida total de la actividad biológica de la molécula modificada con polímero, R. Clark y col., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:21969-21977. Para formar conjugados que tengan suficiente peso molecular del polímero para conferir las ventajas deseadas a una molécula diana, los enfoques previos han implicado normalmente la unión aleatoria de numerosos brazos poliméricos a la molécula, aumentando así el riesgo de una reducción o incluso pérdida total de la bioactividad de la molécula precursora.

10      Los sitios reactivos que forman los locus para la unión de derivados de PEG a proteínas están dictados por la estructura de la proteína. Las proteínas, incluyendo las enzimas, se componen de diversas secuencias de alfa-aminoácidos, que tienen la estructura general  $H_2N-CHR-COOH$ . La fracción alfa amino ( $H_2N-$ ) de un aminoácido se une a la fracción carboxilo ( $-COOH$ ) de un aminoácido adyacente para formar enlaces amida, lo que se puede representar como  $-(NH-CHR-CO)_n-$ , donde el subíndice "n" puede equivaler a cientos o miles. El fragmento representado por R puede contener sitios reactivos para la actividad biológica proteica y para la unión de derivados de PEG.

15      Por ejemplo, en el caso del aminoácido lisina, existe una fracción  $-NH_2$  en la posición épsilon, así como también en la posición alfa. El épsilon  $-NH_2$  es libre para reaccionar en condiciones de pH básico. Gran parte de la técnica en el campo de la derivatización de proteínas con PEG se ha dirigido a desarrollar derivados de PEG para la unión a la fracción épsilon  $-NH_2$  de restos de lisina presentes en las proteínas. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", *Nektar Molecular Engineering Catalog*, 2003, pág. 1-17. Sin embargo, estos derivados de PEG tienen la limitación común de que no se pueden instalar selectivamente entre los numerosos restos de lisina presentes en la superficie de las proteínas. Esto puede ser una limitación significativa en los casos en los que el resto de lisina sea importante para la actividad proteica, existiendo en un sitio activo de enzima, por ejemplo, o en los casos en los que un resto de lisina desempeña un papel en la interacción de la proteína con otras moléculas biológicas, como en el caso de los sitios de unión a receptores.

20      Una segunda e igualmente importante complicación de los procedimientos existentes para la PEGilación de proteínas es que los derivados de PEG pueden sufrir reacciones secundarias no deseadas con restos distintos de los deseados. 30      La histidina contiene una fracción imino reactivo, representado estructuralmente como  $-N(H)-$ , pero muchas especies químicamente reactivas que reaccionan con épsilon  $-NH_2$  también pueden reaccionar con  $-N(H)-$ . De forma similar, la cadena lateral del aminoácido cisteína porta un grupo sulfhidrilo libre, representado estructuralmente como  $-SH$ . En algunos casos, los derivados de PEG dirigidos al grupo épsilon  $-NH_2$  de la lisina también reaccionan con cisteína, histidina u otros restos. Esto puede crear mezclas complejas y heterogéneas de moléculas bioactivas derivadas de PEG y corre el riesgo de destruir la actividad de la molécula bioactiva a la que se dirige. Sería deseable desarrollar derivados de PEG que permitieran introducir un grupo funcional químico en un único sitio dentro de la proteína que permitiera el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la molécula bioactiva en sitios específicos en la superficie de la proteína, estando ambos bien definidos y siendo predecibles.

25      Además de los restos de lisina, se ha dirigido un esfuerzo considerable en la técnica hacia el desarrollo de reactivos de PEG activados que se dirigen a otras cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo cisteína, histidina y el extremo N-terminal. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.610.281 y "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", *Nektar Molecular Engineering Catalog*, 2003, pág. 1-17. Se puede introducir un resto de cisteína selectivamente en el sitio de la estructura de las proteínas usando mutagénesis dirigida y otras técnicas conocidas en la técnica, y se puede hacer reaccionar la fracción sulfhidrilo libre resultante con derivados de PEG que porten grupos funcionales reactivos con tiol. Sin embargo, este enfoque es complicado, porque la introducción de un grupo sulfhidrilo libre puede complicar la expresión, el plegamiento y la estabilidad de la proteína resultante. Por lo tanto, sería deseable tener un medio de introducción de un grupo funcional químico en moléculas bioactivas que permitiera el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la proteína al tiempo que sea compatible (es decir, que no participe en reacciones secundarias no deseadas con) sulfhidrilos y otros grupos funcionales químicos que se encuentran normalmente en las proteínas.

30      Como se puede ver a partir de un muestreo de la técnica, muchos de estos derivados que se han desarrollado para unirse a las cadenas laterales de proteínas, en particular, a la fracción  $-NH_2$  de la cadena lateral de aminoácidos de lisina y a la fracción  $-SH$  de la cadena lateral de cisteína, han demostrado dar problemas en su síntesis y uso. Algunos forman enlaces inestables con la proteína que están sujetos a hidrólisis y, por lo tanto, se descomponen, se degradan o son inestables en ambientes acuosos, tales como en el torrente sanguíneo. Algunos forman enlaces más estables, pero se someten a hidrólisis antes de formarse el enlace, lo que significa que el grupo reactivo del derivado de PEG puede inactivarse antes de que la proteína pueda unirse. Algunos son algo tóxicos y, por lo tanto, son menos adecuados para su uso *in vivo*. Algunos son demasiado lentos para reaccionar y ser útiles en la práctica. Algunos provocan una pérdida de actividad proteica al unirse a sitios responsables de la actividad de la proteína. Algunos no son específicos de los sitios a los que se unirán, lo que también puede producir una pérdida de actividad deseable y una falta de reproducibilidad de los resultados. Para superar los desafíos asociados con la modificación de proteínas con restos de poli(etylenglicol), se han desarrollado derivados de PEG que son más estables (por ejemplo, la patente

de EE.UU. n.º 6.602.498) o que reaccionan selectivamente con restos tiol en moléculas y superficies (por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.610.281). Existe claramente una necesidad en la técnica de derivados de PEG que sean químicamente inertes en entornos fisiológicos hasta que se les solicite que reaccionen selectivamente para formar enlaces químicos estables.

- 5 Se ha desvelado el uso de conjugados de hidroxialquilalmidón y, en particular, el uso de hidroxietilalmidón (HES), unido covalentemente a un polipéptido con el fin de alterar potencialmente la inmunogenicidad y/o la alergenicidad del polipéptido. La HESilación es una tecnología alternativa que se ha desvelado en una serie de solicitudes de patente asignadas a Fresenius Kabi AB entre las que se incluyen las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20050063943, 20060121073, 20010100163, 20050234230, 20050238723, 20060019877, 20070134197, 20070087961, así como la patente de EE.UU. n.º 7.285.661. HES es un polímero natural modificado que se ha usado clínicamente como un expansor de volumen de plasma, y la HESilación representa la tecnología de acoplamiento de sustancias farmacológicas con derivados de HES para modificar las características del fármaco, tales como la farmacocinética o la hidrosolubilidad. Esto también incluye la prolongación de la circulación de proteínas en plasma a través de una mayor estabilidad de la molécula y un aclaramiento renal reducido, dando lugar a un aumento de la actividad biológica.
- 10 Además, se podrían reducir la inmunogenicidad o alergenicidad. Mediante la variación de diferentes parámetros tales como el peso molecular de HES, se puede adaptar una amplia selección de conjugados de HES. Sin embargo, el hidroxietilalmidón comparte una desventaja común con todos los demás polímeros disponibles en la actualidad: su polidispersidad. Los conjugados poliméricos son una mezcla de moléculas que tienen pesos moleculares distribuidos en torno a un valor medio. Esta falta de homogeneidad produce un bajo nivel de caracterización química y bioquímica,
- 15 y podría evitar que el componente farmacéuticamente activo alcanzara su sitio de acción (receptor, enzima, etc.). En estos casos, el fármaco que se va a activar requiere su administración en la forma no conjugada original y, por lo tanto, se requiere la escisión del polímero mediante reacciones metabólicas para su eficacia farmacéutica.

Recientemente, se ha informado de una tecnología completamente nueva en la ciencia de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones específicas de sitio de las proteínas. En concreto, 25 se han agregado nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas del organismo procariota *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, y col., (2001), *Science* 292:498-500) y del organismo eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin y col., *Science* 301:964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no codificados genéticamente a proteínas *in vivo*. Se ha incorporado una serie de nuevos aminoácidos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, que incluyen marcadores de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, aminoácidos de entrecruzamiento (véase, por ejemplo, Chin, J. W., y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 99:11020-11024; y Chin, J. W., y col., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027), cetoaminoácidos, aminoácidos que contienen átomos pesados y aminoácidos glicosilados de manera eficaz y con alta fidelidad en proteínas en *E. coli* y en levadura en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Véase, por ejemplo, J. W. Chin y col., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin y P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3(11):1135-1137; J. W. Chin, y col., (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; y L. Wang y P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Estos estudios han demostrado que es posible introducir de forma selectiva y rutinaria grupos funcionales químicos, tales como grupos cetona, grupos alquino y restos de azida, que no se encuentran en las proteínas, que son químicamente inertes para todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos genéticamente codificados comunes, y que se pueden usar para reaccionar de manera eficaz y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

40 La capacidad de incorporar aminoácidos no genéticamente codificados a las proteínas permite la introducción de grupos funcionales químicos que podrían proporcionar valiosas alternativas a los grupos funcionales naturales, tales como el epsilon -NH<sub>2</sub> de la lisina, el sulfhidrilo -SH de la cisteína, el grupo imino de histidina, etc. Se sabe que ciertos grupos funcionales químicos son inertes a los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos codificados genéticamente comunes, pero reaccionan limpia y eficazmente para formar enlaces estables. Los grupos azida y acetileno, por ejemplo, son conocidos en la técnica por someterse a una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] en condiciones acuosas en presencia de una cantidad catalítica de cobre. Véase, por ejemplo, Tornoe y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y Rostovtsev y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Al introducir una fracción azida en una estructura proteica, por ejemplo, es posible incorporar un grupo funcional que sea químicamente inerte a las aminas, los sulfhidrilos, los ácidos carboxílicos, los grupos hidroxilo encontrados en proteínas, pero que también reaccione de manera suave y eficaz con una fracción acetileno para formar un producto de cicloadición. Es importante destacar que, en ausencia de la fracción acetileno, la azida permanece químicamente inerte y no reacciona en presencia de otras cadenas laterales de proteínas ni en condiciones fisiológicas.

55 La presente invención aborda, entre otras cosas, los problemas asociados con la actividad y la producción de polipéptidos bG-CSF, y también aborda la producción de un polipéptido bG-CSF con mejores propiedades biológicas o farmacológicas y/o mejor semivida terapéutica.

### **Sumario de la invención**

60 En el presente documento se describen polipéptidos de bG-CSF que comprenden uno o más aminoácidos codificados de forma no natural. La presente invención proporciona un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido de la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2 está sustituido con el aminoácido paracetilfenilalanina

codificado de manera no natural, en el que el aminoácido codificado de manera no natural está unido a un polímero hidrosoluble que comprende una fracción poli(etilen)glicol; y el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular entre 0,1 kDa y 50 kDa. La presente invención también proporciona un polipéptido bG-CSF que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 en donde el aminoácido en la posición 133 de SEQ ID NO:1, o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO:1 NO:2, está sustituido con el aminoácido para-acetilfenilalanina codificado de forma no natural, en el que el aminoácido codificado de forma no natural está unido a un polímero soluble en agua que comprende un resto de poli(etilen)glicol; y el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa. También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido bG-CFS proporcionado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención proporciona una composición que comprende el polipéptido bG-CSF proporcionado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición proporcionada en el presente documento es para uso en el tratamiento o prevención de una infección en un animal o para tratar un animal que tiene mastitis. En otro aspecto, el polipéptido bG-CSF como se proporciona en el presente documento es para uso en terapia de un animal. Las referencias a métodos de tratamiento o vacunación en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias al uso del polipéptido, la formulación farmacéutica y la composición de la presente invención en terapia o vacunación.

Los polipéptidos bG-CSF pueden comprender una o más modificaciones postraduccionales. El polipéptido bG-CSF puede estar unido a un conector, polímero o molécula biológicamente activa. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF está unido a un polímero bifuncional, un conector bifuncional o al menos un polipéptido bG-CSF adicional.

- 20 5 En esta divulgación, el aminoácido codificado de forma no natural está unido a un polímero soluble en agua. En esta divulgación, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En esta divulgación, el aminoácido codificado de forma no natural está unido al polímero soluble en agua. En esta divulgación, la molécula de poli(etilenglicol) puede ser un polímero bifuncional. En esta divulgación, el polímero bifuncional puede estar unido a un segundo polipéptido. En esta divulgación, el segundo polipéptido puede ser un polipéptido bG-CSF.
- 25 10 En esta divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender al menos dos aminoácidos unidos a un polímero soluble en agua que comprende un resto de poli(etilenglicol). En esta divulgación, al menos un aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural.

In this disclosure, the bG-CSF polypeptide may comprise at least two amino acids linked to a water soluble polymer comprising a poly(ethylene glycol) moiety. In this disclosure, at least one amino acid is a non-naturally encoded amino acid.

- 30 15 In the present disclosure, a non-naturally encoded amino acid is incorporated at position 133 of bG-CSF (SEQ ID NO: 1 or the corresponding amino acid in SEQ ID NO: 2). In the present disclosure, the polypeptide may comprise one or more natural amino acid substitution. The polypeptide of the disclosure may comprise one or more natural amino acid additions or deletions. In some embodiments, one or more non-natural amino acids are incorporated in a leader or signal sequence that is N or C terminal to SEQ ID NO: 1, 2, or other bG-CSF sequence.

En esta divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender al menos dos aminoácidos unidos a un polímero soluble en agua que comprende una fracción de poli(etilenglicol). En esta divulgación, al menos un aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural.

- 35 20 En la presente divulgación, se incorpora un aminoácido codificado de forma no natural en la posición 133 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En la presente divulgación, el polipéptido puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos naturales. El polipéptido de la divulgación puede comprender una o más adiciones o eliminaciones de aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no naturales se incorporan en una secuencia líder o señal que es N o C terminal de SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF.

- 40 25 En la presente divulgación, el aminoácido codificado de forma no natural en la posición 133 está unido a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En realizaciones en las que un aminoácido de origen no natural está en la secuencia señal o líder N o C terminal de SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF, el aminoácido de origen no natural puede unirse a un polímero soluble.

- 45 30 En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que modula la afinidad del polipéptido bG-CSF por un receptor o pareja de unión, incluyendo, entre otros, una proteína, polipéptido, molécula pequeña o ácido nucleico. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que aumenta la estabilidad del polipéptido bG-CSF en comparación con la estabilidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. La estabilidad y/o la solubilidad se pueden medir usando varios ensayos diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Dichos ensayos incluyen, entre otros, SE-HPLC y RP-HPLC. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que module la inmunogenicidad del polipéptido bG-CSF en comparación con la inmunogenicidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o delección que modula la vida media en suero o el tiempo de circulación del

polipéptido bG-CSF en comparación con la vida media en suero o el tiempo de circulación del correspondiente bG-CSF sin sustitución, adición o eliminación.

En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad acuosa del polipéptido bG-CSF en comparación con la solubilidad acuosa del bG-CSF

- 5 correspondiente sin la sustitución, adición, o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad del polipéptido bG-CSF producido en una célula huésped en comparación con la solubilidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición , o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o delección que aumenta la expresión del polipéptido bG-CSF en una célula huésped o aumenta la síntesis in vitro en comparación con la expresión o síntesis del polipéptido bG-CSF correspondiente sin sustitución, adición o eliminación. El polipéptido bG-CSF que comprende esta sustitución conserva la actividad agonista y conserva o mejora los niveles de expresión en una célula huésped. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que aumenta la resistencia a la proteasa del polipéptido bG-CSF en comparación con la resistencia a la proteasa del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o delección que modula la actividad de transducción de señales del receptor en comparación con la actividad del receptor tras la interacción con el correspondiente polipéptido bG-CSF sin la sustitución, adición, o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que module su unión a otra molécula tal como un receptor en comparación con la unión del correspondiente polipéptido bG-CSF sin la sustitución, adición o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que module la hematopoyesis en comparación con la hematopoyesis del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que module la proliferación de neutrófilos en comparación con la proliferación de neutrófilos del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que module la maduración de neutrófilos en comparación con la maduración de neutrófilos del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

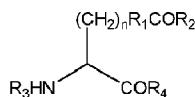
En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede comprender una sustitución, adición o eliminación que aumenta la compatibilidad del polipéptido bG-CSF con conservantes farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol, fenol, alcohol bencílico) en comparación con la compatibilidad. del bG-CSF correspondiente sin sustitución, adición o eliminación. Esta mayor compatibilidad permitiría la preparación de una formulación farmacéutica conservada que mantenga las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento.

En la presente divulgación, se pueden crear uno o más enlaces diseñados con uno o más aminoácidos no naturales. El enlace intramolecular se puede crear de muchas maneras, incluyendo, entre otras, una reacción entre dos aminoácidos en la proteína en condiciones adecuadas (uno o ambos aminoácidos pueden ser aminoácidos no naturales); una reacción con dos aminoácidos, cada uno de los cuales puede estar codificado de forma natural o no codificado de forma natural, con un conector, polímero u otra molécula en condiciones adecuadas; etc.

En la presente divulgación, las sustituciones de aminoácidos en el polipéptido bG-CSF pueden ser con aminoácidos de origen natural o de origen no natural, siempre que al menos una sustitución sea con un aminoácido codificado de forma no natural. En la presente divulgación, una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido bG-CSF pueden ser con uno o más aminoácidos de origen natural y, además, al menos una sustitución es con un aminoácido no codificado de forma natural.

En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

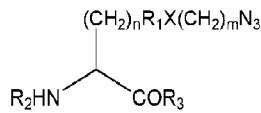
- 45 En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo carbonilo. En la presente divulgación, el aminoácido codificado de forma no natural puede tener la estructura:



en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R<sub>2</sub> es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R<sub>4</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi.

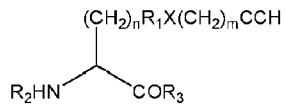
En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo aminooxi. En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo hidrazida. En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo hidrazina. En la presente divulgación, un residuo de aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo semicarbazida.

En la presente divulgación, un residuo de aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo azida. En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede tener la estructura:



- 5 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi.

En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede comprender un grupo alquino. En la presente divulgación, un aminoácido codificado de forma no natural puede tener la estructura:



- 10 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino, y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi.

En la presente divulgación, el polipéptido puede ser un agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido bG-CSF. En la presente divulgación, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido bG-CSF comprende un aminoácido codificado de forma no natural unido a un polímero soluble en agua como se define en la reivindicación 1. En la presente divulgación, el agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso El polímero soluble comprende una fracción de polí(etylenglicol).

Además, se describen, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con las SEQ ID NO: 3, 4 o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de SEQ ID NO: 1, 2. También Se describen, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que se hibrida en condiciones estrictas con las SEQ ID NO: 3, 4 o polinucleótidos que se hibridan en condiciones estrictas con polinucleótidos que codifican los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1, 2 en los que el polinucleótido comprende al menos un codón selector. 25 También se describen (pero no están cubiertos por la invención reivindicada) ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO.: 1, 2. También se describen, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO.: 1, 2 con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural. Es fácilmente evidente para los expertos en la técnica que varios polinucleótidos diferentes pueden codificar cualquier polipéptido de la presente divulgación.

También se describen, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, métodos para preparar un polipéptido bG-CSF unido a un polímero soluble en agua. El método puede comprender poner en contacto un polipéptido bG-CSF aislado que comprende un aminoácido codificado de forma no natural con un polímero soluble en agua que comprende un resto que reacciona con el aminoácido codificado de forma no natural. El aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido bG-CSF puede ser reactivo con un polímero soluble en agua que de otro modo no reaccionaría con cualquiera de los 20 aminoácidos comunes. El aminoácido no codificado de forma natural incorporado en el polipéptido bG-CSF puede ser reactivo con un conector, polímero o molécula biológicamente activa que de otro modo no reaccionaría con cualquiera de los 20 aminoácidos comunes.

40 El polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se puede preparar haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con una molécula de polí(etylenglicol) que comprende un grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida. El grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida puede estar unido a la molécula de polí(etylenglicol) a través de un enlace amida. El grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida puede estar unido a la molécula de polí(etylenglicol) a través de un enlace carbamato.

45 El polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se puede preparar haciendo reaccionar una molécula de polí(etylenglicol) que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido codificado de forma no natural que comprende un aminooxi, hidrazina, hidrazida o grupo semicarbazida.

El polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se puede preparar haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene alquino con una molécula de polí(etylenglicol) que comprende una fracción azida. En la presente divulgación, el grupo azida o alquino puede estar unido a la molécula de polí(etylenglicol) a través de un enlace amida.

El polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se puede preparar haciendo reaccionar un polipéptido bG-

CSF que comprende un aminoácido que contiene azida con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende una fracción alquino. El grupo azida o alquino puede estar unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En la presente divulgación, la molécula de poli(etilenglicol) puede tener un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.

5 En la presente divulgación, la molécula de poli(etilenglicol) puede ser un polímero ramificado.

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido bG-CSF como se proporciona en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente divulgación también proporciona métodos para tratar a un paciente que necesita dicho tratamiento con una cantidad eficaz de una molécula de bG-CSF de la presente divulgación. En la presente divulgación, los métodos pueden comprender administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la presente divulgación, el aminoácido codificado de forma no natural puede estar unido a un polímero soluble en agua. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede estar glicosilado. En la presente divulgación, el polipéptido bG-CSF puede no estar glicosilado.

15 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido bG-CSF de la invención reivindicada.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, un polipéptido bG-CSF que comprende un HES enlazado mediante un enlace covalente al polipéptido bG-CSF está enlazado a un solo aminoácido. En la presente divulgación, el único aminoácido enlazado covalentemente al HES es un aminoácido no codificado de manera natural presente en el polipéptido. En algunas realizaciones de la presente divulgación, un polipéptido bG-CSF comprende múltiples aminoácidos no codificados de manera natural que pueden unirse a múltiples moléculas de HES y/o PEG.

20 Un polipéptido bG-CSF puede comprender al menos un engarce, un polímero o una molécula biológicamente activa, estando dicho engarce, polímero o molécula biológicamente activa unido al polipéptido a través de un grupo funcional de un aminoácido no codificado de forma natural incorporado ribosómicamente al polipéptido. En algunas realizaciones 25 de la divulgación, el polipéptido está monoPEGilado. Un polipéptido bG-CSF que comprende un engarce, un polímero o una molécula biológicamente activa puede estar enlazado a uno o más aminoácidos no codificados de forma natural, estando dicho aminoácido no codificado de forma natural incorporado ribosómicamente al polipéptido en sitios seleccionados previamente.

30 Incluido dentro del ámbito de esta divulgación, está la secuencia líder o señal de bG-CSF unida a una región codificante de bG-CSF, así como una secuencia señal heteróloga unida a una región codificante de bG-CSF. La secuencia líder o señal heteróloga seleccionada debe ser aquella que sea reconocida o procesada, por ejemplo, por el sistema de secreción de la célula huésped para secretarse y, posiblemente, escindirse por una señal peptidasa, por la célula huésped. Un procedimiento de tratamiento de una afección o de un trastorno con el bG-CSF de la presente divulgación pretende implicar el tratamiento con bG-CSF con un péptido señal o líder.

35 La presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento o de prevención de infecciones en animales. La presente divulgación también proporciona un procedimiento de tratamiento o de prevención de la mastitis y de la fiebre del transporte en animales bovinos. La presente divulgación también proporciona un procedimiento de tratamiento de infecciones en animales sin acumulación de resistencia a cepas bacterianas. Además, la presente divulgación proporciona un polipéptido purificado y aislado que tiene parte o la totalidad de la confirmación estructural primaria y 40 una o más de las propiedades biológicas del G-CSF bovino natural.

45 Se pueden administrar uno o más factores estimulantes de colonias adicionales al animal infectado con G-CSF, que incluyen, pero sin limitación, GM-CSF, M-CSF y multi-CSF (IL-3). Los CSF se pueden administrar juntos o por separado. Las infecciones de los animales se pueden tratar administrando G-CSF con uno o más de: los interferones que incluyen, pero sin limitación, interferón- $\alpha$ , IL2 y TNF o, con antibióticos tradicionales que incluyen, pero sin limitación, penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos.

50 bG-CSF de acuerdo con la invención reivindicada se puede usar de manera profiláctica. Se puede usar bG-CSF como terapia profiláctica para aumentar las defensas del huésped de los animales que están en riesgo de contraer una infección bacteriana, por levaduras o por hongos. Por ejemplo, se puede usar bG-CSF como una terapia profiláctica en animales normales con riesgo de adquirir una infección, incluyendo, pero sin limitación, neumonía. El término "normal", como se usa en el presente documento, significa un animal que tiene una función inmune normal, y un recuento y una diferencia de leucocitos normales. El ganado se puede tratar profilácticamente antes del transporte u otros hechos que puedan debilitar al ganado, con el fin de aumentar su capacidad de combatir las infecciones. La administración del bG-CSF puede realizarse en el momento en que se procesa el ganado, es decir, la vacunación, el marcaje, etc. El tratamiento con bG-CSF también puede realizarse durante la terapia de las vacas en período seco y/o justo antes de que una vaca dé a luz para reducir la probabilidad de infecciones intrauterinas posparto y de mastitis durante las primeras etapas de la lactancia. Véase Kehrli y col., *Am. J. Vet. Res.*, 50, n.º 2, 207 (1989); Oliver y col., *J. Dairy Sci.* 71:2584-2606 (1988); y Kehrli y col., *J. Dairy Sci.* 74:4399-4412 (1991) para consultar una descripción de

la función de los neutrófilos bovinos durante el período periparturiente. Convencionalmente, no hay tratamiento con antibióticos justo antes del nacimiento debido a que los residuos que aparecerían en la leche de las vacas la volverían no apta para su uso.

En otra realización de la divulgación, la conjugación del polipéptido bG-CSF según la invención reivindicada que comprende uno o más aminoácidos no naturales con otra molécula, incluyendo pero sin limitarse a PEG, proporciona bG-CSF sustancialmente purificado debido a la combinación única. Reacción química utilizada para la conjugación con el aminoácido no natural. La conjugación de bG-CSF según la invención reivindicada que comprende uno o más aminoácidos codificados de forma no natural con otra molécula, tal como PEG, se puede realizar con otras técnicas de purificación realizadas antes o después de la etapa de conjugación para proporcionar bG-CSF sustancialmente puro.

#### **Breve descripción de las figuras**

Figura 1 - Se muestra un plásmido usado para la expresión de bG-CSF.

Figura 2 - se muestran los detalles relativos a una estirpe celular huésped usada para expresar bG-CSF.

Figura 3 - Se muestra el análisis de SDS-PAGE de la expresión de los polipéptidos bG-CSF de la presente invención. Figura 4 - Se muestra el análisis de SDS-PAGE de las fracciones de máximo de la columna CM FF de bG-CSF antes de la PEGilación.

Figura 5 - Se muestra el análisis de SDS-PAGE de las fracciones de máximo de la columna SP HP de bG-CSF-T133pAF PEGilado. Figura 6 - Se muestra el análisis de SDS-PAGE de b-GCSF antes y después de la PEGilación.

Figura 7a - Se muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (exploración a 214 nm).

Figura 7b - Se muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (exploración a 214 nm). Figura 8a - Se muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (exploración a 250 nm).

Figura 8b - Se muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (exploración a 250 nm).

Figura 9a - Se muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (exploración a 214 nm).

Figura 9b - Se muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (exploración a 214 nm).

Figura 10a - Se muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (exploración a 250 nm).

Figura 10b - Se muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (exploración a 250 nm).

Figura 11 - Se muestra el análisis de SEC-HPLC del polipéptido bG-CSF PEGilado.

Figura 12 - Se muestra el análisis de SEC-HPLC del polipéptido bG-CSF.

Figura 13 - Se muestran los valores de CE<sub>50</sub> en bruto del ensayo de proliferación de M-NFS60 de G-CSF T133pAF bovino PEGilado 20 K y de tipo natural.

Figura 14 - Se muestran las diferencias en la CE<sub>50</sub> del ensayo de proliferación de M-NFS60 de G-CSF T133pAF bovino PEGilado 20 K y de tipo natural.

Figura 15 - Se muestran los resultados de un experimento que analiza los neutrófilos bovinos teñidos con el anticuerpo CD11b.

Figura 16 - Se muestran los resultados de la administración de bG-CSF PEGilado en ANC.

Figura 17 - Un gráfico lineal que muestra los recuentos de neutrófilos absolutos (media ± error típico) en terneros tratados con cualquier tampón de formulación de bG-CSF PEGilado después de una sola inyección subcutánea a 40 µg/kg.

Figura 18 - Un gráfico lineal que muestra la producción diaria media de leche de las vacas del ejemplo de 40 µg/kg.

Figura 19 - Un gráfico de barras que muestra las diferencias en los recuentos de células somáticas en los días 3, 5, 7 y 10 postparto entre cuatro grupos de vacas incluyendo un grupo de control, un grupo tratado con bG-CSF no PEGilado tratado diariamente, un grupo inyectado con bG-CSF PEGilado a 40 µg/kg y un grupo inyectado con bG-CSF PEGilado a 20 µg/kg.

#### **Definiciones**

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, estirpes celulares, construcciones y reactivos particulares descritos en el presente documento y, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a un "bGCSF", "G-CSF bovino", "bG-CSF", "bG-CSF", "polipéptido de G-CSF bovino" o "polipéptido bG-CSF" y las diversas formas con guiones y sin guiones es una referencia a una o más de dichas proteínas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento, dispositivo y material similar a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la invención, ahora se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en el presente documento como referencia con el fin de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, podrían usarse en conexión con la invención actualmente descrita. Las publicaciones aquí analizadas se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otro motivo.

La expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un polipéptido bG-CSF que puede estar sustancial o esencialmente exento de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína como se encuentra en su entorno natural, es decir, una célula nativa o célula huésped en el caso de polipéptidos bG-CSF producidos por recombinación. El polipéptido bG-CSF que puede estar sustancialmente exento de material celular incluye preparados de proteína que tienen menos del aproximadamente 30 %, menos del aproximadamente 25 %, menos del aproximadamente 20 %, menos del aproximadamente 15 %, menos del aproximadamente 10 %, menos del aproximadamente 5 %, menos del aproximadamente 4 %, menos del aproximadamente 3 %, menos del aproximadamente 2 % o menos del aproximadamente 1 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es producido por recombinación por las células huésped, la proteína puede estar presente al aproximadamente 30 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 % o aproximadamente 1 % o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido bG-CSF o una variante del mismo es producido por recombinación por las células huésped, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 10 mg/l o aproximadamente 1 mg/l o menos del peso seco de las células. Por lo tanto, el polipéptido bG-CSF "sustancialmente purificado" producido mediante los procedimientos de la presente divulgación puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %; al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, en concreto, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, y más concretamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 95 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 99 % o superior según lo determinado mediante procedimientos apropiados tales como análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

Una "célula huésped recombinante" o "célula huésped" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del procedimiento usado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, apareamiento f, u otros procedimientos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. El polinucleótido exógeno se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o como alternativa, se puede integrar en el genoma del huésped.

Como se usa en el presente documento, el término "medio" o "medios" incluye cualquier medio de cultivo, solución, soporte sólido, semisólido o rígido que pueda soportar o contener cualquier célula huésped, incluyendo células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células huésped vegetales, células huésped eucariotas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procariotas, células huésped de *E. coli* o *Pseudomonas*, y contenidos de células. Por lo tanto, el término puede englobar un medio en el que se haya cultivado la célula huésped, por ejemplo, un medio en el que se haya secretado el polipéptido bG-CSF, incluyendo un medio antes o después de una etapa de proliferación. El término también puede englobar tampones o reactivos que contengan lisados de células huésped, tales como en el caso de que el polipéptido bG-CSF se produzca intracelularmente, y las células huésped se lisen o se rompan para liberar el polipéptido bG-CSF.

El "agente reductor", como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en el estado reducido y reduce los enlaces disulfuro intra- o intermoleculares. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero sin limitación, ditiotreitol (DTT), 2-mercptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanol) y glutatión reducido. Es evidente para los expertos en la materia que hay una amplia variedad de agentes reductores que son adecuados para su uso en los procedimientos y en las composiciones descritas en el presente documento.

"Agente oxidante", como se usa en el presente documento en relación con el replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que sea capaz de retirar un electrón de un compuesto que se está oxidando. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, pero sin limitación, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitol oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Es evidente para los expertos en la materia que hay una amplia variedad de agentes oxidantes que son adecuados para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

"Agente de desnaturización" o "desnaturalizante", como se usa en el presente documento, se define como cualquier compuesto o material que provocará un despliegamiento reversible de una proteína. La resistencia de un agente de desnaturización o desnaturizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del agente de desnaturización o desnaturizante en particular. Los agentes de desnaturización o desnaturizantes adecuados pueden ser caótropos, detergentes, disolventes orgánicos, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos o

una combinación de dos o más de dichos agentes. Los caótropos adecuados incluyen, pero sin limitación, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los detergentes útiles pueden incluir, pero sin limitación, detergentes fuertes tales como dodecilsulfato sódico o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes suaves no iónicos (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves tales como *N*-2,3-(Dioleoxi)-propil-*N,N,N*-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato de sodio o desoxicólico de sodio) o detergentes zwitteriónicos que incluyen, pero sin limitación, sulfobetaínas (Zwittergent), sulfato de 3-(3-cloalamidopropil)dimetilamonio-1-propano (CHAPS) y sulfonato de 3-(3-cloalamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO). Pueden usarse como desnaturalizantes disolventes orgánicos miscibles en agua tales como acetonitrilo, alcanoles inferiores (en especial, alcanoles C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> tales como etanol o isopropanol) o alcanodíoles inferiores (en especial, alcanodíoles C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> tales como etilenglicol). Los fosfolípidos útiles en la presente divulgación pueden ser fosfolípidos naturales tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados de fosfolípidos sintéticos o variantes tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

"Replegamiento", como se usa en el presente documento, describe cualquier proceso, reacción o procedimiento que transforme los polipéptidos que contienen enlaces disulfuro de un estado plegado incorrectamente o desplegado a una configuración nativa o plegada correctamente con respecto a los enlaces disulfuro.

"Plegamiento conjunto", como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a procesos, reacciones o procedimientos de replegamiento que emplean al menos dos polipéptidos que interaccionan entre sí y dan lugar a la transformación de polipéptidos desplegados o plegados incorrectamente en polipéptidos nativos plegados adecuadamente.

Como se usa en el presente documento, "factor estimulante de colonias de granulocitos" o "G-CSF" incluirán aquellos polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de G-CSF (tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n.º 6.716.606; 6.689.351; 6.565.841; 6.162.426; 5.811.301; 5.776.895; 5.718.893; 5.580.755; 5.536.495; 5.202.117; 5.043.156; 4.999.291; 4.810.643; y 4.968.618 para hG-CSF), así como análogos de G-CSF, isoformas de G-CSF, miméticos de G-CSF, fragmentos de G-CSF, proteínas hibridas de G-CSF, oligómeros y multímeros de proteínas de fusión, homólogos, variantes del patrón de glicosilación y muteínas, independientemente de la actividad biológica de los mismos, y además, independientemente del procedimiento de síntesis o de fabricación de los mismos, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos recombinantes (ya sea producidos a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), sintéticos, transgénicos y procedimientos activados por genes. Los ejemplos específicos de G-CSF incluyen, pero sin limitación, pegfilgrastim (NEULASTA®), filgrastim (NEUPOGEN®), análogo de G-CSF, mutantes de G-CSF, G-CSF glucosilado alterado y análogos de G-CSF conjugados con PEG. Los ejemplos específicos de estirpes celulares modificadas para la expresión de G-CSF humano endógeno se describen en Devlin y col., *J. Leukoc. Biol.* 41:306 (1987); patente de EE.UU. n.º 6.716.606; 6.379.661; 6.004.548; 5.830.705; 5.582.823; 4.810.643; y 6.242.218.

Como se usa en el presente documento, "factor estimulante de colonias de granulocitos bovino", "G-CSF bovino" o "bG-CSF" incluirán aquellos polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de G-CSF, así como análogos de G-CSF, isoformas de G-CSF, miméticos de G-CSF, fragmentos de G-CSF, proteínas hibridas de G-CSF, oligómeros y multímeros de proteínas de fusión, homólogos, variantes del patrón de glicosilación y muteínas, independientemente de la actividad biológica de los mismos, y además, independientemente del procedimiento de síntesis o de fabricación de los mismos, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos recombinantes (ya sea producidos a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), sintéticos, transgénicos y activados por genes. Los ejemplos específicos de G-CSF incluyen, pero sin limitación, mutantes de bG-CSF, G-CSF glucosilado alterado y análogos de G-CSF conjugados con PEG.

La expresión "G-CSF bovino (bG-CSF)" o "polipéptido bG-CSF" se refiere al factor estimulante de colonias de granulocitos bovino o G-CSF como se ha descrito anteriormente, así como a un polipéptido que conserva al menos una actividad biológica de bG-CSF natural. Los polipéptidos bG-CSF incluyen las sales y los profármacos farmacéuticamente aceptables, y los profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros del G-CSF bovino de origen natural, así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas de G-CSF bovino natural y fusiones de polipéptidos de las mismas. Los ejemplos de polipéptidos y miméticos de bG-CSF incluyen los descritos en el documento WO 89/10932, y en las patentes de EE.UU. n.º 5.849.883 y 6.497.869. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino, extremo carboxilo, o ambos, están englobadas por la expresión "polipéptido bG-CSF". Las fusiones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, metionil bG-CSF en el que una metionina está enlazada al extremo N de bGCSF (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) resultante de la expresión recombinante de la forma madura de bGCSF, fusiones con fines de purificación (que incluyen, pero sin limitación, poli-histidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas tales como albúmina sérica. Se conocen las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de bG-CSF de origen natural para formas de longitud completa y maduras, así como variantes tales como variantes de aminoácidos individuales y variantes de corte y empalme. Para la secuencia de aminoácidos de bG-CSF madura, así como también para una secuencia de aminoácidos de metionil-bG-CSF, véase SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, en el presente documento. También se conocen moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de hG-CSF y polipéptidos de hG-CSF mutantes.

El factor estimulante de colonias de granulocitos bovino o bG-CSF tiene una variedad de actividades biológicas que incluyen, pero sin limitación, la unión a su receptor, causando la dimerización de su receptor, la estimulación de la producción de neutrófilos y la estimulación de la proliferación y la diferenciación celular. Se han descrito anteriormente ejemplos de algunas de las actividades biológicas del factor estimulante de colonias de granulocitos y hG-CSF, así como en la patente de EE.UU. n.º 6.676.947; 6.579.525; 6.531.121; 6.521.245; 6.489.293; 6.368.854; 6.316.254; 6.268.336; 6.239.109; 6.165.283; 5.986.047; 5.830.851; 5.043.156; y 5.773.569.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido G-CSF bovino", "polipéptido de bG-CSF", "G-CSF bovino" o "bG-CSF" y sus formas con guiones y sin guiones incluirán aquellos polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de un CSF, análogos de bG-CSF, mutantes de bG-CSF, bG-CSF glicosilado modificado, bG-CSF conjugado con PEG, isoformas de bG-CSF, miméticos de bG-CSF, fragmentos de bG-CSF, proteínas bG-CSF híbridas, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes del patrón de glicosilación, variantes, variantes de corte y empalme y muteínas de las mismas, independientemente de la actividad biológica de las mismas, y además independientemente del procedimiento de síntesis o de fabricación de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, procedimientos recombinantes (ya sea producidos a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), *in vitro*, *in vivo*, por microinyección de moléculas de ácido nucleico, sintéticos, transgénicos y activados por genes. La expresión "polipéptido G-CSF bovino", "polipéptido bG-CSF", "G-CSF bovino" o "bG-CSF" engloba polipéptidos bG-CSF que comprenden una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Véase la patente de EE.UU. n.º 5.849.883 para los análogos de G-CSF bovino.

Se han descrito sustituciones en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en bG-CSF. Sustituciones que incluyen, pero sin limitación, aquellas que modulan la estabilidad farmacéutica, aumentan la actividad agonista, aumentan la resistencia a proteasas, convierten el polipéptido en un antagonista, etc. y están englobadas por la expresión "polipéptido bG-CSF", "polipéptido de G-CSF bovino", "G-CSF bovino" o "bG-CSF".

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona tratar una infección administrando a un animal una variante proteica, habitualmente con un vehículo farmacéutico, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los bG-CSF mutantes analizados en la patente de EE.UU. n.º 5.849.883 incluyen polipéptidos diseñados con optimización de codones para *E. coli* y proteínas híbridas generadas con secuencias de G-CSF bovino y humano. La patente de EE.UU. n.º 5.416.195, describe mutantes de hG-CSF en los que se han realizado al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos (la numeración de aminoácidos se refiere a la proteína madura; por tanto, cuando hay una metionina N-terminal presente, se le asigna la posición -1 o 0): Cys17 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ser17, Asp27 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ser27, Leu15 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Glu15, Lys23 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Arg23, Gly28 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ala28, Lys40 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Arg40, Pro44 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ala44, Leu49 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Lys49, Gly55 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ala55, Cys60 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ser60, Pro111 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Glu111, Thr115 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Ser115 y Tyr165 de la secuencia nativa reemplazado por un resto Arg165. Muchos de estos restos están presentes en la secuencia de bG-CSF, y una o más de estas sustituciones se pueden encontrar en un polipéptido bG-CSF de la divulgación. Carter y col. *Biologicals* (2004) 32:37 describen hG-CSF mutado que carece de sitios de glicosilación.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos bG-CSF, incluyendo mutantes y los procedimientos de expresión y purificación de los polipéptidos bG-CSF son bien conocidos.

La expresión "polipéptido bG-CSF" también incluye las sales y los profármacos farmacéuticamente aceptables, y los profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros del bG-CSF natural, así como sus variantes agonistas, miméticos y antagonistas de las fusiones de bG-CSF y polipéptidos de origen natural. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino, extremo carboxilo, o ambos, están englobadas por la expresión "polipéptido bG-CSF". Las fusiones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, metionil-bG-CSF en la que una metionina está enlazada al extremo N-terminal de bG-CSF resultante de la expresión recombinante de la forma madura de bG-CSF que carece del péptido líder o señal, o de un parte del mismo (una metionina está enlazada al extremo N-terminal de bG-CSF resultante de la expresión recombinante), fusiones con el fin de la purificación (incluyendo, pero sin limitación, polihistidina o epitopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a la albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas tales como albúmina sérica. La patente de los EE.UU. n.º 5.750.373 describe un procedimiento de selección de nuevas proteínas tales como la hormona del crecimiento y variantes de fragmentos de anticuerpos que tienen propiedades de unión modificadas para sus respectivas moléculas receptoras. El procedimiento comprende fusionar un gen que codifique una proteína de interés con el dominio carboxi terminal de la proteína de cubierta del gen III del fago filamentoso M13, moléculas químéricas que comprenden bG-CSF y una o más moléculas diferentes. La molécula químérica puede contener regiones específicas o fragmentos de uno o ambos del bG-CSF y de otra/s molécula/s. Cualquiera de dichos fragmentos puede prepararse a partir de las proteínas mediante procedimientos bioquímicos convencionales, o mediante la expresión de un polinucleótido que codifique el fragmento, bG-CSF o un fragmento del mismo, puede producirse como una proteína de fusión que comprende albúmina de suero humano (HSA), Fc o una parte de los mismos. Dichas construcciones de fusión son adecuadas para potenciar la expresión del bG-CSF, o

fragmento del mismo, en una célula huésped eucariota. Los ejemplos de partes de HSA incluyen el polipéptido N-terminal (aminoácidos 1-369, 1-419 y longitudes intermedias que comienzan con el aminoácido 1), según lo desvelado en la patente de EE.UU. n.º 5.766.883, y la publicación WO 97/24445. Otros polipéptidos químicos pueden incluir una proteína HSA con bG-CSF, o fragmentos de la misma, unidos a cada uno de los extremos C-terminal y N-terminal de la HSA. Se pueden crear otras fusiones mediante la fusión de bG-CSF con a) la parte Fc de una inmunoglobulina; b) un análogo de la parte Fc de una inmunoglobulina; y c) fragmentos de la parte Fc de una inmunoglobulina.

Diversas referencias desvelan la modificación de polipéptidos mediante la conjugación de polímeros o la glicosilación. La expresión "polipéptido bG-CSF" incluye polipéptidos conjugados con un polímero tal como PEG, y puede estar compuesto por una o más derivatizaciones adicionales de cisteína, lisina u otros restos. Además, el polipéptido bG-CSF puede comprender un engarce o polímero, en el que el aminoácido con el que el engarce o el polímero está conjugado puede ser un aminoácido no natural de acuerdo con la presente divulgación, o puede conjugarse con un aminoácido codificado de forma natural utilizando técnicas conocidas en la materia tales como el acoplamiento a lisina o cisteína.

Se ha informado de la modificación polimérica de polipéptidos. El IFN $\beta$  se menciona como un ejemplo de un polipéptido que pertenece a la superfamilia de hormonas del crecimiento. El documento WO 00/23114 desvela IFN $\beta$  glicosilado y pegilado. El documento WO 00/23472 desvela proteínas de fusión de IFN $\beta$ . La patente de EE.UU. n.º 4.904.584 desvela polipéptidos PEGilados pobres en lisina, en los que al menos un resto de lisina se ha eliminado o sustituido por cualquier otro resto de aminoácido. El documento WO 99/67291 desvela un procedimiento de conjugación de una proteína con PEG, en el que al menos un resto de aminoácido de la proteína está eliminado, y la proteína se pone en contacto con PEG en condiciones suficientes para lograr la conjugación con la proteína. El documento WO 99/03887 desvela variantes PEGiladas de polipéptidos que pertenecen a la superfamilia de hormonas del crecimiento, en las que un resto de cisteína se ha sustituido con un resto de aminoácido no esencial ubicado en una región específica del polipéptido. El documento WO 00/26354 desvela un procedimiento de producción de una variante polipeptídica glicosilada con alergenicidad reducida, que, en comparación con un polipéptido precursor correspondiente, comprende al menos un sitio de glicosilación adicional. La patente de EE.UU. 5.218.092 desvela la modificación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y otros polipéptidos para introducir al menos una cadena de hidrato de carbono adicional en comparación con el polipéptido nativo.

La expresión "polipéptido bG-CSF" también incluye bG-CSF glicosilado, tal como, pero sin limitación, polipéptidos glicosilados en cualquier posición de aminoácido, formas glicosiladas del polipéptido enlazadas a N o enlazadas a O. Las variantes que contienen cambios de nucleótidos únicos también se consideran variantes biológicamente activas del polipéptido bG-CSF. Las variantes que contienen cambios de nucleótidos únicos también se consideran variantes biológicamente activas de bG-CSF. Además, también se incluyen variantes de corte y empalme. La expresión "polipéptido bG-CSF" también incluye heterodímeros bG-CSF, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros de uno cualquiera o más bG-CSF, o cualquier otro polipéptido, proteína, hidrato de carbono, polímero, molécula pequeña, engarce, ligando u otra molécula activa de cualquier tipo, enlazada por medios químicos o expresada como una proteína de fusión (véanse las patentes de EE.UU. n.º 6.261.550; 6.166.183; 6.204.247; 6.261.550; 6.017.876), así como análogos polipeptídicos que contienen, por ejemplo, eliminaciones específicas u otras modificaciones que todavía mantienen la actividad biológica (patente de EE.UU. n.º 6.261.550, 6.004.548, 6.632.426).

Todas las referencias a posiciones de aminoácidos en el bG-CSF descrito en el presente documento se basan en la posición en SEQ ID NO: 1, a menos que se especifique lo contrario (es decir, cuando se establezca que la comparación se basa en SEQ ID NO: 2 u otra secuencia de bG-CSF). Por ejemplo, el aminoácido en la posición 1 de SEQ ID NO: 1, es una treonina y la treonina correspondiente está situada en SEQ ID NO: 2 en la posición 2. Los expertos en la materia apreciarán que las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones en SEQ ID NO: 1 se pueden identificar fácilmente en cualquier otra molécula de bG-CSF tal como SEQ ID NO: 2. Los expertos en la materia apreciarán que las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1, 2 o cualquier otra secuencia de bG-CSF pueden identificarse fácilmente en cualquier otra molécula de bG-CSF, tal como las fusiones, variantes, fragmentos, etc. de bG-CSF. Por ejemplo, se pueden usar programas de alineamiento de secuencias tales como BLAST para alinear e identificar una determinada posición en una proteína que se corresponde con una posición de SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos descritas en el presente documento con referencia a SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF se refieren también a sustituciones, eliminaciones o adiciones en posiciones correspondientes de fusiones de bG-CSF, variantes, fragmentos , etc., descritos en el presente documento o conocidos en la técnica y están expresamente englobadas por la presente invención.

La expresión "polipéptido bG-CSF" o "bG-CSF" engloba polipéptidos bG-CSF que comprenden una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Los polipéptidos de bG-CSF de la presente invención pueden estar compuestos de modificaciones con uno o más aminoácidos naturales junto con una o más modificaciones de aminoácidos no naturales. Se han descrito sustituciones ejemplares en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en polipéptidos de bG-CSF naturales, incluyendo, entre otras, sustituciones que modulan la estabilidad farmacéutica, que modulan una o más de las actividades biológicas del polipéptido de bG-CSF, tales como como, entre otros, aumentar la actividad agonista, aumentar la solubilidad del polipéptido, disminuir la susceptibilidad a la proteasa, convertir el polipéptido en un antagonista, etc. y están abarcados por el término "polipéptido bG-CSF".

En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden además una adición, sustitución o eliminación que modula la actividad biológica del polipéptido bG-CSF. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden además una adición, sustitución o eliminación que modula la proliferación, función y/o diferenciación de neutrófilos del polipéptido bG-CSF. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular una o más propiedades o actividades de bG-CSF. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular la afinidad por un receptor, modular la semivida en circulación, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión por proteasas, modular la dosis, modular la liberación o la biodisponibilidad, facilitar la purificación, o mejorar o alterar una determinada vía de administración. De manera similar, los polipéptidos bG-CSF pueden comprender secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (que incluyen pero sin limitación, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en la afinidad (que incluyen, pero sin limitación, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas enlazadas (que incluyen, pero sin limitación, biotina) que mejoran la exploración (incluyendo, pero sin limitación, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

La expresión "polipéptido bG-CSF" también engloba homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que están enlazados, que incluyen, pero sin limitación, aquellos enlazados directamente a través de cadenas laterales de aminoácidos no codificados de forma natural, ya sea a las mismas o a diferentes cadenas laterales de aminoácidos no codificados de manera natural, a cadenas laterales de aminoácidos codificados de forma natural, o indirectamente a través de un engarce. Los engarces ilustrativos incluyen, pero sin limitación, compuestos orgánicos pequeños, polímeros hidrosolubles de una variedad de longitudes tales como poli(etilenglicol) o polidextrano, o polipéptidos de diversas longitudes.

Un "aminoácido no codificado de forma natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otros términos que se pueden usar como sinónimos de la expresión "aminoácido no codificado de forma natural" son "aminoácido no natural", ""aminoácido de origen no natural" y las diversas versiones con guiones y sin guiones de las mismas. La expresión "aminoácido no codificado de forma natural" también incluye, pero sin limitación, aminoácidos que se producen por modificación (por ejemplo, modificaciones posteriores a la traducción) de un aminoácido codificado de forma natural (incluyendo, pero sin limitación, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína), pero no están incorporados de forma natural a una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de traducción. Los ejemplos de dichos aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitación, *N*-acetilglucosaminil-L-serina, *N*-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

Un "grupo de modificación del extremo amino" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al extremo amino de un polipéptido. De forma similar, un "grupo de modificación del extremo carboxi" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al extremo carboxi de un polipéptido. Los grupos de modificación del extremos incluyen, pero sin limitación, diversos polímeros, péptidos o proteínas hidrosolubles tales como albúmina sérica u otros restos que aumentan la semivida en suero de los péptidos.

Las expresiones "grupo funcional", "fracción activa", "grupo de activación", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "fracción químicamente reactiva" se usan en la técnica y en el presente documento para referirse a distintas partes o unidades definibles de una molécula. Las expresiones son algo sinónimas en las técnicas químicas, y se usan en el presente documento para indicar las partes de moléculas que realizan alguna función o actividad, y que son reactivas con otras moléculas.

El término "enlace" o "engarce" se usa en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química, y normalmente son enlaces covalentes. La expresión "enlaces hidrolíticamente estables" significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y que no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, que incluyen, pero sin limitación, en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, quizás incluso indefinidamente. Los enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, la sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace es degradado por una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables de la estructura principal del polímero o del grupo de engarce entre la estructura principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula polimérica. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos de PEG o ácidos carboxílicos de PEG activados con grupos alcohol sobre un agente biológicamente activo, en general, se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero sin limitación, enlaces de carbonato; enlaces de imina resultantes de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster de fosfato formados haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces de ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, que incluyen, pero sin limitación, en un extremo de un polímero tal como PEG y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidito, que incluyen, pero sin limitación, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

La expresión "molécula biológicamente activa", "fracción biológicamente activa" o "agente biológicamente activo" cuando se usa en el presente documento significa cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción relacionada con un organismo, incluyendo, pero sin

- limitación, virus, bacterias, bacteriófago, transposón, príon, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, pero sin limitación, cualquier sustancia destinada al diagnóstico, la cura, la mitigación, el tratamiento o la prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero sin limitación, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, vacunas, inmunógenos, drogas duras, drogas blandas, hidratos de carbono, átomos o moléculas inorgánicos, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionucleidos, oligonucleótidos, toxoides, toxinas, células procariotas y eucariotas, virus, polisacáridos, ácidos nucleicos y partes de los mismos obtenidos o derivados de virus, bacterias, insectos, animales o cualquier otra célula o tipo de célula, liposomas, micropartículas y micelas. Los polipéptidos bG-CSF se pueden agregar a una formulación micelar. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, fármacos, profármacos, radionucleidos, agentes de formación de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antiviricos, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios y similares.
- Un "polímero bifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales diferenciados que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (que incluyen, pero sin limitación, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un engarce bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un determinado componente biológicamente activo, y otro grupo reactivo con un grupo en un segundo componente biológico, se puede usar para formar un conjugado que incluye el primer componente biológicamente activo, el engarce bifuncional y el segundo componente biológicamente activo. Se conocen muchos procedimientos y moléculas de engarce para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea n.º 188.256; las patentes de EE.UU. n.º 4.671.958. 4.659.839. 4.414.148. 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales diferenciados que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos (incluyendo, pero sin limitación, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede tener cualquier longitud o peso molecular deseado, y se puede seleccionar para proporcionar un determinado espaciado deseado o una determinada configuración deseada entre una o más moléculas unidas al bG-CSF y su receptor o bG-CSF.
- Cuando los grupos de sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, engloban igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura  $-\text{CH}_2\text{O}-$  es equivalente a la estructura  $-\text{OCH}_2-$ .
- El término "sustituyentes" incluye, pero sin limitación, "sustituyentes no interferentes". Los "sustituyentes no interferentes" son aquellos grupos que producen compuestos estables. Los sustituyentes o radicales no interferentes adecuados incluyen, pero sin limitación, halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, aralquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcarilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxiarilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, ariloxialquilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, oxiarilo C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>, alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>,  $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) en el que m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NRC(O)}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_{10})$ ,  $-\text{C(O)}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_{10})$ , alquil C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-tioalquilo,  $-\text{C(O)O}-(\text{alquilo C}_1\text{-C}_{10})$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SO}_2=\text{S}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NR}_2$ , carbonilo,  $-\text{C(O)}-(\text{alquil C}_1\text{-C}_{10})\text{-CF}_3$ ,  $-\text{C(O)-CF}_3$ ,  $-\text{C(O)NR}_2$ ,  $-(\text{aril C}_1\text{-C}_{10})\text{-S}-(\text{arilo C}_6\text{-C}_{10})$ ,  $-\text{C(O)}-(\text{arilo C}_1\text{-C}_{10})$ ,  $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), en el que cada m es de 1 a 8,  $-\text{C(O)NR}_2$ ,  $-\text{C(S)NR}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}_2$ ,  $-\text{NRC(O)NR}_2$ ,  $-\text{NRC(S)NR}_2$ , sales de los mismos, y similares. Cada R como se usa en el presente documento es H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, aralquilo o alcarilo.
- El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.
- El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical de hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, monoinsaturado o poliinsaturado y puede incluir radicales divalentes y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de uno a diez átomos de carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopripilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquel que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1 - y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo".
- El término "alquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ilustra, pero sin limitación, mediante las estructuras  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , y además incluye los grupos descritos a continuación como "heteroalquileno". Por lo general, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo esos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono una realización particular de los procedimientos y de las composiciones que se describen en el presente documento. Un "alquilo inferior" o

"alquieno inferior" es un grupo alquilo o alquieno de cadena más corta, que, en general, tiene ocho o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquilitio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", en sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical de hidrocarburo cíclico, o de cadena lineal o ramificada estable, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos uno heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado opcionalmente. Lo/s heteroátomo/s O, N y S y Si puede/n colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH=CHO- CH<sub>3</sub>, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=N-OCH<sub>3</sub> y -CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>.

Puede haber hasta dos heteroátomos consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. De manera similar, el término "heteroalquieno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ilustra, pero sin limitación, mediante -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-.

Para los grupos heteroalquieno, los heteroátomos iguales o diferentes también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (incluyendo, pero sin limitación, alquienoxi, alquilendioxi, alquienoamino, alquilendiamino, aminoxyalquieno y similares). Aún más, para grupos de engarce de alquieno y heteroalquieno, no se implica ninguna orientación del grupo de engarce por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de engarce. Por ejemplo, la fórmula -C(O)<sub>2</sub>R'- representa tanto C(O)<sub>2</sub>R' como -R'C(O)<sub>2</sub>-.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Así pues, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces de anillo saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Además, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-moifolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Además, el término engloba estructuras anulares bicíclicas y tricíclicas. De forma similar, el término "heterocicloalquieno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquieno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polímero hidrosoluble" se refiere a cualquier polímero que sea soluble en disolventes acuosos. La unión de polímeros hidrosolubles a polipéptidos bG-CSF puede producir cambios que incluyen, pero sin limitación, aumento o modulación de la semivida en suero, o aumento o modulación de la semivida terapéutica en relación con la forma no modificada, modulación de la inmunogenicidad, modulación de las características de asociación física tales como la agregación y la formación de multímeros, alteración de la unión al receptor, alteración de la unión a una o más parejas de unión y alteración de la dimerización o multimerización del receptor. El polímero hidrosoluble puede tener o no tener su propia actividad biológica, y puede utilizarse como un engarce para unir el bG-CSF a otras sustancias, incluyendo, pero sin limitación, uno o más polipéptidos bG-CSF, o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol, propionaldehído de polietilenglicol, derivados de mono-alcoxi o ariloxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo (descritos en la patente de EE.UU. n.º 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido maleico de diviniléter, *N*-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, incluyendo sulfato de

dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo, pero sin limitación, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicos y sus derivados, poliviniletiléteres y alfa-beta-polí[(2-hidroxietil) DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Los ejemplos de dichos polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol y albúmina de suero. Los documentos WO 03/074087 y WO 03/074088 describen la conjugación de proteínas o moléculas pequeñas con hidroxialquilalmidón (HAS). Los ejemplos de hidroxialquilalmidones incluyen, pero sin limitación, hidroxietilalmidón. Los conjugados de hidroxialquilalmidón y otra molécula, por ejemplo, pueden comprender un enlace covalente entre grupos aldehído terminales del HAS y grupos reactivos de la otra molécula.

Como se usa en el presente documento, el término "polialquilenglicol" o "poli(alquenoglicol)" se refiere a polietilenglicol (poli(etylenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. El término "polialquilenglicol" engloba tanto polímeros lineales como ramificados, y pesos moleculares medios de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Otras realizaciones ilustrativas se enumeran, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, tales como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado aromático, poliinsaturado, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (incluyendo, pero sin limitación, de 1 a 3 anillos) que se

condensan entre sí o se unen covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el/los átomo/s de nitrógeno está/n opcionalmente cuaternizado/s. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares de arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

Para abreviar, el término "arilo", cuando se usa en combinación con otros términos (incluyendo, pero sin limitación, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluyendo, pero sin limitación, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluyendo, pero sin limitación, un grupo metileno) se ha reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (incluyendo, pero sin limitación, fenoxymetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Cada uno de los términos anteriores (incluyendo, pero sin limitación, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretenden incluir formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes a modo de ejemplo para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen aquellos grupos a los que se hace referencia frecuentemente como alquieno, alquenilo, heteroalquieno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, pero sin limitación: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R'R'', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NRC(NR'R'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R', -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub> en un número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono de dicho radical. R', R'', R''' y R'''' se refieren independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando hay más de uno de estos grupos presentes. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' incluye, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la descripción anterior de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (que incluyen, pero sin limitación, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (que incluyen, pero sin limitación, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, y similares).

De forma similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan, pero sin limitación, de: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R'R'', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NRC(NR'R'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R', -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluoro-alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y fluoro-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo. Cuando un compuesto incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando hay más de uno de estos grupos presente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modulación de la semivida en suero" significa el cambio positivo o negativo en la semivida en circulación de un bG-CSF modificado con respecto a su forma no modificada. La semivida en suero se mide tomando muestras de sangre en varios momentos después de la administración de bG-CSF y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración en suero con el tiempo permite calcular la semivida en suero. El aumento de la semivida en suero deseablemente tiene al menos aproximadamente el doble, pero un aumento menor puede ser útil, por ejemplo, cuando permite una pauta posológica satisfactoria o evita un efecto tóxico. El aumento puede ser de al menos aproximadamente el triple, de al menos aproximadamente cinco veces o de al menos aproximadamente diez veces.

La expresión "modulación de la semivida terapéutica", como se usa en el presente documento, significa el cambio positivo o negativo en la semivida de la cantidad terapéuticamente eficaz de bG-CSF, con respecto a su forma no modificada. La semivida terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos de tiempo después de la administración. El aumento de la semivida terapéutica deseablemente permite una pauta posológica beneficiosa particular, una determinada dosis total beneficiosa o evita un efecto no deseado. El aumento de la semivida terapéutica puede resultar del aumento de la potencia, aumento o reducción de la unión de la molécula modificada a su diana, aumento o reducción de la descomposición de la molécula por enzimas tales como proteasas, o un aumento o una reducción de otro parámetro o mecanismo de acción de la

molécula no modificada, o un aumento o una reducción del aclaramiento mediado por un receptor de la molécula.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o a una proteína, denota que el ácido nucleico o la proteína está exento de al menos algunos de los componentes celulares con los que se asocia en estado natural, o que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado hasta un nivel superior a la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*.

- 5 Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar bien en un estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo, pero sin limitación, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprenda vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analíticas tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en un preparado está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés. El término "purificado" denota que un ácido nucleico o una proteína da lugar a sustancialmente una banda en un gel electroforético. En particular, puede significar que el ácido nucleico o la proteína es al menos un 85 % puro, al menos un 90 % puro, al menos un 95 % puro, al menos un 99 % o más puro.
- 10 15 La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y sus polímeros en forma bien monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se limite específicamente lo contrario, el término también se refiere a análogos de oligonucleótidos que incluyen PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosfootioatos, fosforoamidatos y similares). A menos que se indique lo contrario, una determinada secuencia de ácido nucleico también engloba implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (que incluyen, pero sin limitación, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. En concreto, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer y col., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un aminoácido no codificado de forma natural. Como se usan en el presente documento, los términos engloban cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

- 30 35 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un átomo de carbono a que está unido a un átomo de hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (tales como norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos proteogénicos de origen natural; D-aminoácidos, aminoácidos modificados químicamente tales como variantes de aminoácidos y derivados; aminoácidos no proteogénicos naturales tales como β-alanina, ornitina, etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitación, aminoácidos α-metílicos (por ejemplo, α-metil-alanina), D-aminoácidos, aminoácidos de tipo histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina y α-metil-histidina), aminoácidos que tienen un metileno adicional en la cadena lateral (aminoácidos "homo") y aminoácidos en los que un grupo funcional de ácido carboxílico de la cadena lateral se reemplaza por un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico). La incorporación de aminoácidos no naturales, que incluyen aminoácidos no nativos sintéticos, aminoácidos sustituidos o uno o más D-aminoácidos en las proteínas de la presente divulgación, puede ser ventajosa de varias maneras diferentes. Los péptidos que contienen D-aminoácidos, etc., presentan una mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo* en comparación con los homólogos que contienen L-aminoácidos. Así pues, la construcción de péptidos, etc., que incorpora D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se desea o se requiere una mayor estabilidad intracelular. Más concretamente, los D-péptidos, etc., son resistentes a las peptidasas y proteasas endógenas, proporcionando de este modo una mejor biodisponibilidad de la molécula, y vidas *in vivo* prolongadas cuando se desean dichas propiedades. Además, los péptidos D, etc., no pueden procesarse de manera eficaz para la presentación restringida al complejo de histocompatibilidad principal de clase II a los linfocitos T auxiliares, y por lo tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunes humorales en el organismo entero.

Los aminoácidos se pueden denominar en el presente documento ya sea mediante sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden denominarse mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

- 5 Las "variantes modificadas conservativamente" se aplican tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a determinadas secuencias de ácidos nucleicos, "variantes modificadas conservativamente" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede modificarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que habitualmente es el único codón para la metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para el triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.
- 10 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservativamente", en la que la modificación da lugar a la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Los expertos en la materia conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas conservativamente son además de, y sin excluir, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.
- 15
- 20
- 25

Los expertos en la materia conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los ocho siguientes grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 30 1) Alanina (A), Glicina (G);  
 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);  
 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);  
 4) Arginina (R), Lisina (K);  
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);  
 35 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);  
 7) Serina (S), Treonina (T); y  
 8) Cisteína (C), Metionina (M);

(véase, por ejemplo Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Properties" (W H Freeman & Co.; 2<sup>a</sup> edición (diciembre de 1993).

- 40 El término "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente un 60 % de identidad, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 % de identidad en una región específica), en comparación y en alineación para una correspondencia máxima en una franja de comparación, o región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para los expertos habituales en la materia) o mediante la alineación manual y el examen visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. La identidad puede existir en una región que tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o en una región que tiene de 75 a 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de especies distintas de las humanas, puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de exploración de una biblioteca en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tenga una secuencia de polinucleótidos de la invención o un fragmento de la misma, y aislar clones de ADNc y genómicos de longitud completa que contengan dicha secuencia de polinucleótidos. Dichas técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia.
- 45
- 50
- 55

- 60 Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros de

programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

5 Una "franja de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de una serie de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras la alineación óptima de las dos secuencias. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son conocidos por los expertos en la materia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación 10 se puede realizar, incluyendo, pero sin limitación, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 85:2444, mediante implantaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y 15 TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual y examen visual (véase, por ejemplo, Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology" (suplemento de 1995).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud 20 de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis 25 BLAST está disponible para el público en general a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica disponible en Internet en ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5; N = -4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST normalmente se realiza con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, 30 Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:5873-5877). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2 o inferior a aproximadamente 0,01 o inferior a aproximadamente 0,001.

35 La expresión "se hibrida selectiva (o específicamente) a" se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula solo a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (que incluye, pero sin limitación, ADN o ARN celular o de biblioteca total).

40 La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN, PNA u otros imitadores de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura como se conocen en la técnica. Por lo general, en condiciones rigurosas, una sonda se hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (que incluye, pero sin limitación, ADN o ARN celular o de biblioteca total), pero no se hibridará con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia, y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan 45 específicamente a temperaturas más altas. En 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), se encuentra una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 a 10 °C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_f$ ) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La  $T_f$  es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración 50 de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a la  $T_f$ , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las que la concentración de sal es una concentración de iones de sodio inferior a aproximadamente 1,0 M, normalmente una concentración de iones de sodio 55 aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (incluyendo, pero sin limitación, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (incluyendo, pero sin limitación, más de 50 nucleótidos). También se pueden lograr 60 condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas pueden ser las siguientes: formamida al 50 %, 5 x SSC y SDS al 1 %, incubando a 42 °C, o 5 x SSC, SDS al 1 %, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2 x SSC, y SDS al 0,1 % a 65 °C. Dichos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos.

Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético *Eucarya* tales como animales (incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo, pero sin limitación, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "no eucariota" se refiere a organismos no eucariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético *Eubacteria* (incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pulida*, etc.) o al dominio filogenético *Archaea* (incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* tales como *Haloferax volcanii* y la especie NRC-1 de *Halobacterium*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeouropyrum pernix*, etc.).

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en algunas realizaciones a un mamífero, y en otras realizaciones, a un ser humano, que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), un animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).

15 La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad del polipéptido de aminoácidos no naturales modificado que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se trata. Las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado descrito en el presente documento pueden administrarse para tratamientos profilácticos, 20 potenciadores y/o terapéuticos.

25 Los términos "potenciar" o "potenciación" significan aumentar o prolongar bien en potencia o en duración un efecto deseado. Por lo tanto, con respecto a potenciar el efecto de los agentes terapéuticos, el término "potenciación" se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, bien en potencia o en duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una "cantidad eficaz potenciadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado. Cuando se usan en un animal, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y del curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la terapia previa, del estado de salud del animal y de la respuesta a los fármacos, y el juicio del veterinario tratante.

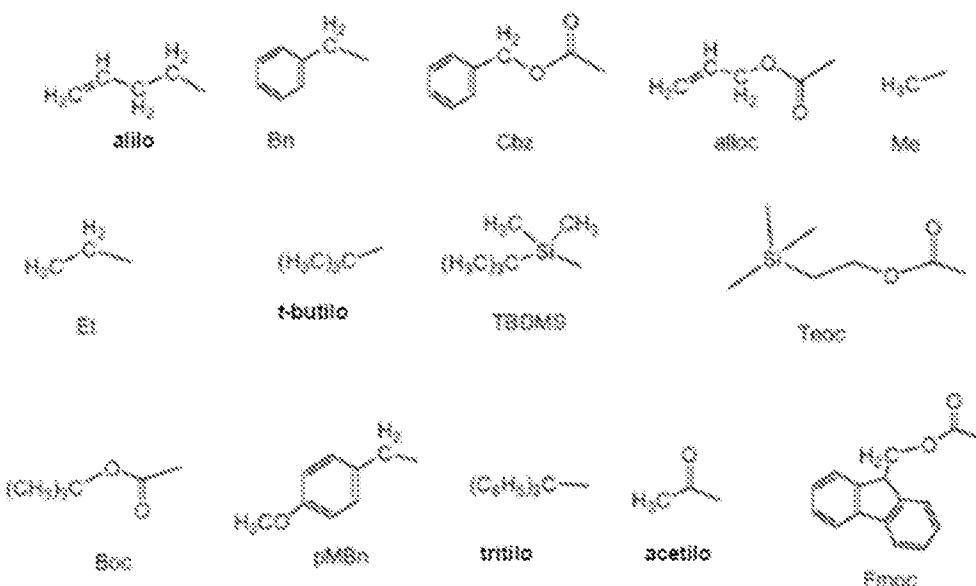
30 El término "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cambio realizado en un polipéptido dado, tal como cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación durante la traducción o la modificación posterior a la traducción de un polipéptido. El término forma ("modificada") significa que los polipéptidos que se están analizando están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos sometidos a análisis pueden estar modificados o no.

35 La expresión "modificado después de la traducción" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en dicho aminoácido después de que se haya incorporado a una cadena polipeptídica. La expresión engloba, a modo de ejemplo únicamente, modificaciones *in vivo* durante la traducción, modificaciones *in vitro* durante la traducción (tales como en un sistema de traducción exento de células), modificaciones *in vivo* después de la traducción y modificaciones *in vitro* después de la traducción.

40 En las aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el polipéptido bG-CSF se pueden administrar a un animal susceptible o en riesgo de contraer de una enfermedad, trastorno o afección en particular. Dicha cantidad se define como una "cantidad profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades exactas también dependen del estado de salud, del peso y similares del animal. Se considera que la determinación de dichas cantidades profilácticamente eficaces está dentro del alcance de la técnica mediante la experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento de la dosis).

45 El término "protegido" se refiere a la presencia de un "grupo protector" o fracción que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará según el tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de *terc*-butiloxicarbonilo (*t*-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o *terc*-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también pueden usarse en o con los procedimientos y las composiciones que se describen en el presente documento, que incluyen grupos fotolábiles tales como Nvoc y MeNvoc. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también pueden usarse en o con los procedimientos y las composiciones que se describen en el presente documento.

55 A modo meramente ilustrativo, los grupos de bloqueo/protección se pueden seleccionar de:



En Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999, se describen otros grupos protectores.

- En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificado se administra a un animal que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Dicha cantidad se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz", y dependerá de la gravedad y del curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la terapia previa, del estado de salud del animal y de la respuesta a los fármacos, y del juicio del veterinario tratante. Se considera que un experto en la materia puede determinar dichas cantidades terapéuticamente eficaces mediante la experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento de la dosis).

El término "tratar" se usa para referirse a tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

- Los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural presentados en el presente documento pueden incluir compuestos marcados isotópicamente con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tenga una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. Ciertos compuestos marcados isotópicamente descritos en el presente documento, por ejemplo, aquellos a los que se incorporan isótopos radiactivos tales como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , pueden ser útiles en ensayos de distribución tisular de sustratos y/o fármacos. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas como resultado de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos.

- Todos los isómeros, incluyendo, pero sin limitación, diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento. Los polipéptidos de aminoácidos codificados de manera no natural se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se usa para producir un efecto deseado, que incluye un efecto terapéutico deseado. También se describen de metabolitos activos de polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural.

- En algunas situaciones, los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural pueden existir en forma de tautómeros. Además, los polipéptidos de aminoácidos no codificados de forma natural descritos en la presente pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. También se considera que las formas solvatadas se divultan en el presente documento. Los expertos habituales en la materia reconocerán que algunos de los compuestos del presente documento pueden existir en varias formas tautoméricas. La totalidad de dichas formas tautoméricas se considera parte de las composiciones descritas en el presente documento.

- 35 A menos que se indique lo contrario, se emplean procedimientos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica.

**Descripción detallada*****I. Introducción***

En la invención, se proporcionan moléculas b-GCSF que comprenden al menos un aminoácido no natural como se define en las reivindicaciones. El polipéptido b-GCSF con al menos un aminoácido no natural puede incluir al menos una modificación posterior a la traducción. En una realización, la al menos una modificación posterior a la traducción

5 comprende la unión de una molécula que incluye, pero sin limitación, hidroxialquilalmidón (HAS), hidroxietilalmidón (HES), un marcador, un colorante, un polímero, un polímero hidrosoluble, un derivado de polietilenglicol, un agente fotorreticulante, un radionucleido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metales, un cofactor, un ácido graso, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero hidrosoluble, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radioactiva, un nuevo grupo funcional, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotourada, una fracción excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que

10 incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, una fracción tóxica, una fracción marcada isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforecente, un grupo quimioluminiscente, un grupo denso de electrones, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un

20 radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable que comprenda un segundo grupo reactivo con al menos un aminoácido no natural que comprenda un primer grupo reactivo utilizando la metodología química que es conocida por los expertos habituales en la materia como adecuada para los grupos reactivos particulares. Por ejemplo, el primer

25 grupo reactivo es una fracción alquinilo (que incluye, pero sin limitación, el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina, en el que el grupo propargilo también se denomina a veces fracción acetileno) y el segundo grupo reactivo es una fracción azido, y se utilizan metodologías de química de cicloadición [3 + 2]. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es la fracción azido (que incluye, pero sin limitación, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquinilo. En ciertas divulgaciones del polipéptido b-GCSF modificado de la presente invención, al menos un aminoácido no natural (que incluye, pero sin limitación, aminoácido

30 no natural que contiene un grupo funcional ceto) que comprende al menos una modificación posterior a la traducción, se usa cuando la al menos una modificación posterior a la traducción comprende una fracción sacárido. En ciertas realizaciones, la modificación posterior a la traducción se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. Un engarce, un polímero, un polímero hidrosoluble u otra molécula puede unir la molécula al polipéptido. La molécula puede enlazarse directamente al polipéptido.

35 La proteína puede incluir al menos una modificación posterior a la traducción que es realizada *in vivo* por una célula huésped, en la que la modificación posterior a la traducción normalmente no es realizada por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación posterior a la traducción que es realizada *in vivo* por una célula eucariota, en las que la modificación posterior a la traducción normalmente no es realizada por una célula no eucariota. Los ejemplos de modificaciones posterior a la traducción incluyen, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión de glicolípidos y similares.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural para la glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de unión de glicolípidos del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural para la glicosilación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende uno o más aminoácidos codificados de forma natural para la glicosilación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende uno o más aminoácidos codificados de forma natural para la glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de unión de glicolípidos del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende un aminoácido codificados de forma natural para la glicosilación del polipéptido.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una sustitución de un aminoácido no codificado de forma natural que potencie la glicosilación del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más eliminaciones que potencien la glicosilación del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencien la glicosilación en un aminoácido diferente del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más eliminaciones que potencian la glicosilación en un aminoácido diferente del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido no codificado de forma natural del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido codificado de forma natural del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido diferente del polipéptido.

50 En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido codificado de forma natural del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido codificado de forma natural del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido diferente del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido codificado de forma natural del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido diferente del polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido codificado de forma natural del

polipéptido. En algunas divulgaciones, el polipéptido b-GCSF comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos no codificados de forma natural que potencian la glicosilación en un aminoácido no codificado de forma natural del polipéptido.

- 5 En una realización, la modificación posterior a la traducción comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina mediante un enlace de GlcNAc-asparagina (que incluye, pero sin limitación, cuando el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación posterior a la traducción comprende la unión de un oligosacárido (que incluye, pero sin limitación, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por un enlace de GalNAc-serina, en enlace de GalNAc-treonina, un enlace de GlcNAc-serina o un enlace de GlcNAc-treonina. En ciertas realizaciones, una proteína o un polipéptido de la invención pueden comprender una secuencia de secreción o localización, un marcador de epítopo, un marcador de FLAG, un marcador de polihistidina, una fusión de GST y/o similares. Los ejemplos de secuencias de señal de secreción incluyen, pero sin limitación, una secuencia de señal de secreción procariota, una secuencia de señal de secreción eucariota, una secuencia de señal de secreción eucariota optimizada en 5' para la expresión bacteriana, una nueva secuencia de señal de secreción, secuencia de señal de secreción de pectato liasa, una secuencia de señal de secreción de Omp A y una secuencia de señal de secreción de fago. Los ejemplos de secuencias de señal de secreción incluyen, pero sin limitación, STII (procariotas), Fd GIII y M13 (fago), Bgl2 (levadura), y la secuencia de señal bla derivada de un transposón. Cualquier secuencia de este tipo se puede modificar para proporcionar un resultado deseado con el polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, la sustitución de una secuencia señal con una secuencia señal diferente, la sustitución de una secuencia líder con una secuencia líder diferente, etc.
- 10 15 20 25
- La proteína o polipéptido de interés contiene al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o diez o más aminoácidos no naturales. . Los aminoácidos no naturales pueden ser iguales o diferentes, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprenden 1, 2, 3, , 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. Al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en una versión natural de la proteína se sustituye por un aminoácido no natural.

30 35 40 45

Las composiciones basadas en b-GCSF que comprenden al menos un aminoácido no codificado de forma natural están cubiertas por la invención reivindicada. La introducción de al menos un aminoácido no codificado de forma natural en b-GCSF puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que impliquen reacciones químicas específicas, incluyendo, pero sin limitación, con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sin reaccionar con los 20 aminoácidos comunes. En algunas realizaciones, b-GCSF que comprende el aminoácido no codificado de forma natural se une a un polímero hidrosoluble, tal como polietilenglicol (PEG), a través de la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. Se describe en la presente un procedimiento altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas con derivados de PEG, que implica la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente, que incluyen, pero sin limitación, aquellos aminoácidos que contienen grupos funcionales o sustituyentes que no se encuentran en los 20 aminoácidos incorporados de forma natural, que incluyen, pero sin limitación, una fracción cetona, azida o acetileno, en proteínas en respuesta a un codón selector y la modificación posterior de esos aminoácidos con un derivado de PEG adecuadamente reactivo. Una vez incorporadas; las cadenas laterales de los aminoácidos pueden modificarse entonces mediante la utilización de metodologías químicas conocidas por los expertos en la materia por su idoneidad para determinados grupos funcionales o sustituyentes presentes en el aminoácido no codificado de forma natural. Las metodologías químicas conocidas de una amplia variedad son adecuadas para su uso en la presente invención para incorporar un polímero hidrosoluble a la proteína. Dichas metodologías incluyen, pero sin limitación, una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen (véase, por ejemplo, Padwa, A. en "Comprehensive Organic Synthesis", Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, pág. 1069-1109; y, Huisgen, R. en "1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry", (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, pág. 1-176) con, incluyendo, pero sin limitación, derivados de acetileno o azida, respectivamente.

50 55

Debido a que el procedimiento de cicloadición [3 + 2] de Huisgen implica una cicloadición en lugar de una reacción de sustitución nucleófila, las proteínas pueden modificarse con una selectividad sumamente alta. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con excelente regioselectividad (1,4>1,5) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu (I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornoe, y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y, Rostovtsev, y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; y el documento WO 03/101972. Una molécula que se puede añadir a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye casi cualquier molécula con un grupo funcional o sustituyente adecuado, incluyendo, pero sin limitación, un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo acetileno, incluyendo, pero sin limitación, *p*-propargiloxifenilalanina, o un grupo azido, incluyendo, pero sin limitación, *p*-azidofenilalanina, respectivamente.

60

El anillo de cinco miembros que resulta de la cicloadición [3+2] de Huisgen, en general, no es reversible en entornos reductores, y es estable frente a la hidrólisis durante períodos prolongados en entornos acuosos. Por consiguiente, las características físicas y químicas de una amplia variedad de sustancias se pueden modificar en condiciones acuosas exigentes con los derivados activos de PEG de la presente invención. Aún más importante, debido a que las fracciones de azida y acetileno son específicas entre sí (y no reaccionan, por ejemplo, con ninguno de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente), las proteínas pueden modificarse en uno o más sitios específicos con una selectividad sumamente elevada.

- 5 También se describen derivados hidrosolubles e hidrolíticamente estables de derivados de PEG y polímeros hidrófilos relacionados que tienen una o más fracciones acetileno o azida. Los derivados de polímeros de PEG que contienen fracciones acetileno son altamente selectivos hacia el acoplamiento con fracciones azida que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector. De forma similar, los derivados de polímeros de PEG que contienen fracciones azida son altamente selectivos hacia el acoplamiento con fracciones acetileno que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector.
- 10 Más concretamente, las fracciones azida comprenden, pero sin limitación, alquilazidas, arilazidas y derivados de estas azidas. Los derivados de las alquilazidas y arilazidas pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica del acetileno. Las fracciones acetileno comprenden alquil- y aril-acetilenos y derivados de cada uno. Los derivados de los alquil- y aril-acetilenos pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de la azida.
- 15 Se describe en la presente conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o fracciones, con otras sustancias que incluyen, pero sin limitación, hidroxialquilalmidón (HAS); hidroxietilalmidón (HES); un marcador; un colorante; un polímero; un polímero hidrosoluble; un derivado de polietilenglicol; un agente fotorreticulante; un radionucleido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un hidrato de carbono; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero hidrosoluble; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo; una fracción que contiene metal; una fracción radioactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción fotocurada; una fracción excitable por radiación actínica; una fracción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo photoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo redox; un amino tioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso de electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones; o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. La presente invención también incluye conjugados de sustancias que tienen fracciones azida o acetileno con derivados de polímeros de PEG que tienen las fracciones acetileno o azida correspondientes. Por ejemplo, un polímero de PEG que contiene una fracción azida se puede acoplar a una molécula biológicamente activa en una posición de la proteína que contenga un aminoácido no codificado genéticamente portador de una funcionalidad de acetileno. El enlace por el que el PEG y la molécula biológicamente activa están acoplados incluye, pero sin limitación, el producto de cicloadición [3+2] de Huisgen.
- 20 30 35 40 45 50 55 60
- 35 Está bien establecido en la materia que el PEG se puede usar para modificar las superficies de los biomateriales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.610.281; Mehvar, R., *J. Pharm Pharm Sci.*, 3(1):125-136 (2000)). Se describen, pero no están cubiertos por la invención reivindicada, biomateriales que comprenden una superficie que tiene uno o más sitios reactivos de azida o acetileno y uno o más de los polímeros que contienen azida o acetileno descritos en el presente documento acoplados a la superficie a través del enlace de cicloadición [3+2] de Huisgen.
- 40 También se pueden acoplar biomateriales y otras sustancias a los derivados de polímeros activados con azida o acetileno a través de un enlace distinto del enlace de azida o acetileno, tal como a través de un enlace que comprenda una fracción ácido carboxílico, amina, alcohol o tiol, para dejar la fracción azida o acetileno disponible para reacciones posteriores.
- 45 Se describe pero no se reivindica un procedimiento de síntesis de los polímeros que contienen azida y acetileno de la invención. En el caso del derivado de PEG que contiene azida, la azida se puede unir directamente a un átomo de carbono del polímero. Como alternativa, el derivado de PEG que contiene azida se puede preparar uniendo un agente de engarce que tiene la fracción azida en un extremo a un polímero activado convencional de forma que el polímero resultante tenga la fracción azida en su extremo. En el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, el acetileno se puede unir directamente a un átomo de carbono del polímero. Como alternativa, el derivado de PEG que contiene acetileno puede prepararse uniendo un agente de engarce que tenga la fracción acetileno en un extremo a un polímero activado convencional de manera que el polímero resultante tenga una fracción acetileno en su extremo.
- 50 55 60
- 55 Más concretamente, en el caso del derivado de PEG que contiene azida, un polímero hidrosoluble que tiene al menos una fracción hidroxilo activa experimenta una reacción para producir un polímero sustituido que tenga una fracción más reactiva, tal como un grupo saliente mesilato, tresilato, tosilato o halógeno, encima. La preparación y el uso de derivados de PEG que contienen haluros de ácido sulfonílico, átomos de halógeno y otros grupos salientes son conocidos por los expertos en la materia. El polímero sustituido resultante experimenta luego una reacción para sustituir la fracción más reactiva con una fracción azida en el extremo del polímero. Como alternativa, un polímero hidrosoluble que tiene al menos una fracción nucleófila o electrófila activa experimenta una reacción con un agente de engarce que tiene una azida en un extremo de manera que se forma un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de engarce y la fracción azida en el extremo del polímero. Las fracciones nucleófilas y electrófilas, incluyendo aminas, tioles, hidrazidas, hidrazinas, alcoholes, carboxilatos, aldehídos, cetonas, tioésteres y similares, son conocidas por los expertos en la materia.

Más concretamente, en el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, un polímero hidrosoluble que tiene al menos una fracción hidroxilo activa experimenta una reacción para desplazar un halógeno u otro grupo saliente activado de un precursor que contenga una fracción acetileno. Como alternativa, un polímero hidrosoluble que tenga al menos una fracción nucleófila o electrófila activa experimenta una reacción con un agente de engarce que tenga un acetileno en un extremo, de modo que se forme un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de engarce y la fracción de acetileno en el extremo del polímero. El uso de fracciones de halógeno, grupos salientes activados, fracciones nucleófilas y electrófilas en el contexto de la síntesis orgánica, y la preparación y el uso de derivados de PEG está bien establecido para los expertos en la materia.

También descrito pero no cubierto por la invención reivindicada es un procedimiento de modificación selectiva de proteínas para añadir otras sustancias a la proteína modificada, incluyendo, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles tales como PEG y derivados de PEG que contienen una fracción azida o acetileno. Los derivados de PEG que contienen azida y acetileno pueden usarse para modificar las propiedades de las superficies y las moléculas cuando la biocompatibilidad, la estabilidad, la solubilidad y la falta de inmunogenicidad sean importantes, mientras que, al mismo tiempo, proporcionan un medio más selectivo de unión de los derivados de PEG a proteínas en comparación con el conocido previamente en la materia.

## ***II. GCSF bovino***

Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden usarse para mejorar o prevenir las infecciones en animales. Las actividades biológicas, así como los ensayos para caracterizar las actividades biológicas del G-CSF bovino y humano, son conocidos por los expertos en la materia. Los ensayos que implican una evaluación del número de neutrófilos y la función de los neutrófilos son conocidos por los expertos en la materia.

## ***III. Procedimientos generales de ácido nucleico recombinante [No cubierto por la invención reivindicada]***

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido bG-CSF de interés pueden ser aislados, clonados y, a menudo, alterados usando procedimientos recombinantes. Dichos procedimientos se pueden usar, incluyendo, pero sin limitación, para la expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados, cassetes de expresión u otras secuencias derivadas de un polipéptido bG-CSF. Las secuencias que codifican los polipéptidos de la invención pueden estar unidas operativamente a un promotor heterólogo. El aislamiento de hG-CSF y la producción de G-CSF en células huésped se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.810.643; 4.999.291; 5.580.755; y 6.716.606.

Se puede sintetizar una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido bG-CSF que comprenda un aminoácido no codificado de forma natural basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor, incluyendo pero no limitado a, que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2 y luego cambiar la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, la incorporación o sustitución) o eliminación (es decir, delección o sustitución) del/de los resto/s de aminoácido relevante/s. La secuencia de nucleótidos puede modificarse convenientemente mediante mutagénesis dirigida de acuerdo con procedimientos convencionales. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede prepararse mediante síntesis química, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un sintetizador de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos se diseñan basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado, y preferentemente seleccionando los codones que se prefieren en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante. Por ejemplo, se pueden sintetizar varios oligonucleótidos pequeños que codifican partes del polipéptido deseado y ensamblarlos por PCR, ligadura o reacción en cadena de ligadura. Véase, por ejemplo, Barany y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193 (1991); patente de EE.UU. n.º 6.521.427.

Los textos básicos que desvelan los procedimientos generales incluyen Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (3<sup>a</sup> ed. 2001); Kriegler, "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual" (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., 1994)).

Los textos generales que describen técnicas de biología molecular incluyen Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology", Volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y col., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2<sup>a</sup> Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook") y "Current Protocols in Molecular Biology", F. M. Ausubel y col., eds., "Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates", Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (suplementado a lo largo de 1999) ("Ausubel")). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados, incluyendo, pero sin limitación, la generación de genes o polinucleótidos que incluyen codones selectores para la producción de proteínas que incluyen aminoácidos no naturales, ARNt ortogonales, sintetasas ortogonales y sus pares.

Se pueden usar diversos tipos de mutagénesis para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitación, producir sintetasas o ARNt novedosos, mutar moléculas de ARNt, mutar polinucleótidos que codifiquen sintetasas, producir bibliotecas de ARNt, producir bibliotecas de sintetasas, producir codones selectores, insertar codones selectores que codifiquen aminoácidos no naturales en una proteína o en un polipéptido de interés. Incluyen, pero sin limitación, mutagénesis puntual aleatoria dirigida, recombinación homóloga, barajado de ADN u otros procedimientos de mutagénesis recursiva, construcción químérica, mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis

dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada con fosforoato, mutagénesis usando dúplex hueco de ADN o similar, mutagénesis mediada por PCT, o cualquier combinación de las mismas. Otros procedimientos adecuados adicionales incluyen la reparación de desapareamientos puntuales, mutagénesis usando cepas huésped deficientes en la reparación, selección de restricción y purificación de restricción, mutagénesis de eliminación, 5 mutagénesis por síntesis génica total, reparación de ruptura de doble cadena y similares. Las mutagénesis, incluyendo, pero sin limitación, en la que participan construcciones químicas, también se describen. La mutagénesis puede guiarse por información conocida de la molécula de origen natural o la molécula de origen natural modificada o mutada, incluyendo, pero sin limitación, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, estructura cristalina o similares.

10 Los textos y ejemplos que se encuentran en el presente documento describen estos procedimientos. Se puede encontrar información adicional en las siguientes publicaciones y referencias citadas en: Ling y col., "Approaches to DNA mutagenesis: an overview", *Anal Biochem*. 254(2): 157-178 (1997); Dale y col., "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 y 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", en *Nucleic Acid & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:488-492 (1985); Kunkel y col., "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass y col., "Mutant Trip repressor with new DNA-binding specificities", *Science* 242:240-245 (1988); Zoller y Smith, "Oligonucleotidedirected mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragments", *Nucleic Acid Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller y Smith, "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors", *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller y Smith, "Oligonucleotidedirected mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template", *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor y col., "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme redactions to prepare nicked DNA", *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor y col., "The rapid generation of oligonucleotidedirected mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA", *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye y 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 y col., "5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis", *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers y col., "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 y col., "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction", *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer y Fritz, "Oligonucleotide directed construction of mutations via gapped duplex DNA", *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); 25 Kramer y col., "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations", *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz y col., "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro", *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer y col., "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 y col., "Improved oligonucleotide site-directed 30 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); Eghitedarzadeh y Henikoff, "Use of oligonucleotides to generate large deletions", *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells y col., "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar y col., "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein", *Science* 223: 1299-1301 (1984); 35 Sakmar y Khorana, "Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine road outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)", *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells y col., "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites", *Gene* 34:315-323 (1985); Grundström y col., "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis", *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: 40 a method for site-specific mutagenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, "Protein engineering for unusual environments", *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, y col., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); y, I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acid Res.* 23, 3067-8 (1995). Se pueden encontrar detalles adicionales sobre muchos de los procedimientos anteriores en *Methods in Enzymology*, Volumen 154, que también describe controles útiles para problemas de resolución de 45 problemas con diversos procedimientos de mutagénesis.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en mutagénesis, por ejemplo, bibliotecas de mutantes de sintetasas, o ARNt alterado, normalmente se sintetizan químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automático, según lo descrito en Needham-VanDevanter y col., *Nucleic Acid Res.*, 12:6159-6168 (1984).

También descritas pero no cubiertas por la invención reivindicada son las células huésped eucariotas, células huésped no eucariotas y organismos para la incorporación *in vivo* de un aminoácido no natural a través de pares ARNt/RS ortogonales. Las células huésped se modifican por ingeniería genética (incluyendo, pero sin limitación, transformadas,

transducidas o transfectadas) con los polinucleótidos descritos aquí o construcciones que incluyen un polinucleótido descrito aquí, incluyendo, pero sin limitación, un vector de la invención, que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. Por ejemplo, las regiones codificantes para el ARNt ortogonal, la ARNt sintetasa ortogonal y la proteína por derivatizar están operativamente unidas a elementos de control de la expresión génica que son funcionales en la célula huésped deseada. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, un cásimo, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos mediante procedimientos convencionales incluyendo la electroporación (Fromm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82, 5824 (1985)), infección por vectores víricos, penetración balística a alta velocidad por partículas pequeñas con el ácido nucleico bien dentro de la matriz de pequeñas partículas o partículas, o en la superficie (Klein y col., *Nature* 327, 70-73 (1987)), y/o similares. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células *in vitro* incluyen el uso de liposomas, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia génica *in vivo* incluyen, pero sin limitación, transfección con vectores víricos (normalmente, vectores retrovíricos) y transfección mediada por proteína de la cubierta vírica-liposoma [Dzau y col., *Trends in Biotechnology* 11:205-210 (1993)]. En algunas situaciones, puede ser deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a las células diana, tal como un anticuerpo específico de una proteína de membrana de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis se pueden usar para dirigir y/o facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a la internalización en el ciclo, proteínas que se dirigen a la ubicación intracelular y potencian la semivida intracelular.

Las células huésped modificadas genéticamente se pueden cultivar en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para dichas actividades tales como, por ejemplo, etapas de exploración, activación de promotores o selección de transformantes. Estas células pueden cultivarse opcionalmente en organismos transgénicos no humanos. Otras referencias útiles que incluyen, pero sin limitación, el aislamiento y el cultivo de células (por ejemplo, para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos) incluyen Freshney (1994) "Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique", tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en la misma; Payne y col. (1992) "Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems", John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) "Plant Cell, Tissue and Organ Culture"; *Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg, Nueva York), y Atlas y Parks (eds.) "The Handbook of Microbiological Media" (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Hay varios procedimientos bien conocidos de introducción de ácidos nucleicos diana en células que están disponibles. Estos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo de proyectiles e infección con vectores víricos (analizados además a continuación), etc. Se pueden usar células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen construcciones de ADN de la presente invención. Las bacterias se cultivan hasta la fase logarítmica y los plásmidos dentro de las bacterias se pueden aislar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, hay kits disponibles en el mercado para la purificación de plásmidos de bacterias (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan luego para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan a vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y traducción, secuencias de iniciación de la transcripción y traducción, y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana en particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia de terminación independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas o procariotas, o ambas (incluyendo, pero sin limitación, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Hay vectores disponibles para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véase Gillam y Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, y col., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., y col., *Protein Expr. Purif.* 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos *supra*). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para la clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, el Catálogo de la ATCC de bacterias and bacteriófagos (1992) Gherna y col. (eds), publicado por la ATCC. También se pueden encontrar procedimientos básicos adicionales para la secuenciación, la clonación y otros aspectos de la biología molecular y las consideraciones teóricas subyacentes en Watson y col., (1992) "Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books", NY. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, ya sea convencional o no convencional) puede pedirse de forma personalizada o convencional a cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, disponible en Internet, en [mcrc.com](http://mcrc.com)), The Great American Gene Company (Ramona, CA, disponible en Internet en [genco.com](http://genco.com)), ExpressGen Inc. (Chicago, IL, disponible en Internet en [expressgen.com](http://expressgen.com)), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchos otros.

CODONES SELECTORES (DESCRITOS PERO NO CUBIERTOS POR LA INVENCIÓN REIVINDICADA)

Los codones selectores amplían el marco de codones genéticos de la maquinaria biosintética de las proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, pero sin limitación, un único codón de tres bases, un codón sin sentido, tal como un codón de parada, incluyendo, pero sin limitación, un codón ámbar (UAG), un codón ocre, o un codón ópalo (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro o más bases, un codón raro o similar. Es evidente para los expertos en la materia que existe una amplia selección en el número de codones selectores que pueden introducirse en un gen o polinucleótido deseado, incluyendo, pero sin limitación, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más en un solo polinucleótido que codifique al menos una parte del polipéptido bG-CSF.

Los procedimientos pueden implicar el uso de un codón selector que es un codón de parada para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales *in vivo*. Por ejemplo, se produce un O-ARNt que reconoce el codón de parada, incluyendo, pero sin limitación, UAG, y es aminoacilado por una O-RS con un aminoácido no natural deseado. Este O-ARNt no es reconocido por las aminoacil-ARNt sintetasas del huésped de origen natural. Se puede usar la mutagénesis convencional dirigida para introducir el codón de parada, incluyendo, pero sin limitación, TAG, en el sitio de interés de un polipéptido de interés. Véase, por ejemplo, Sayers, J. R., y col. (1988), "5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis". *Nucleic Acid Res.*, 16:791-802. Cuando el O-RS, O-ARNt y el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés se combinan *in vivo*, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para dar un polipéptido que contenga el aminoácido no natural en la posición especificada.

La incorporación de aminoácidos no naturales *in vivo* puede realizarse sin perturbación significativa de la célula huésped eucariota. Por ejemplo, debido a que la eficacia de supresión para el codón UAG depende de la competencia entre el O-ARNt, incluyendo, pero sin limitación, el ARNt supresor de ámbar y un factor de liberación eucariota (incluyendo, pero sin limitación, eRF) (que se une a un codón de parada e inicia la liberación del péptido en crecimiento desde el ribosoma), es posible modular la eficacia de la supresión, incluyendo, pero sin limitación, el aumento del nivel de expresión de O-ARNt y/o el ARNt supresor.

Los aminoácidos no naturales también se pueden codificar con codones raros. Por ejemplo, cuando se reduce la concentración de arginina en una reacción de síntesis de proteínas *in vitro*, el codón de arginina raro, AGG, ha demostrado ser eficaz para la inserción de Ala mediante un ARNt sintético acilado con alanina. Véase, por ejemplo, Ma y col., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). En este caso, el ARNt sintético compite con la Arg del ARNt de origen natural, que existe como una especie menor en *Escherichia coli*. Algunos organismos no usan todos los codones de triplete. Se ha usado un codón AGA no asignado de *Micrococcus luteus* para la inserción de aminoácidos en un extracto de transcripción/traducción *in vitro*. Véase, por ejemplo, Kowal y Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997). Los componentes descritos aquí se pueden generar para usar estos codones raros *in vivo*.

Los codones selectores también comprenden codones extendidos, incluyendo, pero sin limitación, codones de cuatro o más bases, tales como codones de cuatro, cinco, seis o más bases. Los ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, pero sin limitación, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Los ejemplos de codones de cinco bases incluyen, pero sin limitación, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC y similares. Se describe aquí el uso de codones extendidos basados en la supresión del desplazamiento de fase de lectura. Se pueden insertar codones de cuatro o más bases, incluyendo, pero sin limitación, uno o múltiples aminoácidos no naturales en la misma proteína. Por ejemplo, en presencia de O-ARNt mutados, incluyendo, pero sin limitación, un ARNt supresor del desplazamiento de fase de lectura especial, con bucles anticodón, por ejemplo, con al menos bucles anticodón de 8-10 nt, se leen los codones de cuatro o más bases como un solo aminoácido. Los bucles anticodón pueden descodificar, incluyendo, pero sin limitación, un codón de al menos cuatro bases, un codón de al menos cinco bases o un codón de al menos seis bases o más. Como hay 256 posibles codones de cuatro bases, se pueden codificar múltiples aminoácidos no naturales en la misma célula usando un codón de cuatro o más bases. Véase, Anderson y col., (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.

Por ejemplo, se han usado codones de cuatro bases para incorporar aminoácidos no naturales a proteínas usando procedimientos biosintéticos *in vitro*. Véase, por ejemplo, Ma y col., (1993) *Biochemistry*, 32:7939; y Hohsaka y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:34. Se usaron CGGG y AGGU para incorporar simultáneamente 2-naftilanina y un derivado NBD de lisina a estreptavidina *in vitro* con dos ARNt supresores del desplazamiento de fase de lectura acilados químicamente. Véase, por ejemplo, Hohsaka y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194. En un estudio *in vivo*, Moore y col. examinaron la capacidad de los derivados de Leu de ARNt con anticodones NCUA para suprimir codones UAGN (N puede ser U, A, G o C), y encontraron que el cuadruplete UAGA puede ser descodificado por una Leu de ARNt con un anticodón UCUA con una eficiencia del 13 al 26 % con poca descodificación en la fase de lectura 0 o -1. Véase Moore y col., (2000) *J. Mol. Biol.*, 298:195. Se pueden usar codones extendidos basados en codones raros o codones sin sentido, lo que puede reducir la lectura de sentido erróneo y la supresión del desplazamiento de fase de lectura en otros sitios no deseados.

Para un sistema dado, un codón selector también puede incluir uno de los codones de tres bases naturales, en el que el sistema endógeno no usa (o rara vez usa) el codón de base natural. Por ejemplo, esto incluye un sistema que carece

de un ARNt que reconoce el codón de tres bases naturales y/o un sistema en el que el codón de tres bases es un codón raro.

Los codones selectores incluyen opcionalmente pares de bases no naturales. Estos pares de bases no naturales expanden aún más el alfabeto genético existente. Un par de bases extra aumenta la cantidad de codones de triplete de 64 a 125. Las propiedades de los pares de tercera base incluyen apareamientos de bases estables y selectivos, incorporación enzimática eficiente a ADN con alta fidelidad mediante una polimerasa, y la extensión eficaz continua del cebador después de la síntesis del par de bases no naturales naciente. Las descripciones de pares de bases no naturales que pueden adaptarse a procedimientos y composiciones incluyen, por ejemplo, Hirao, y col., (2002) "An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein", *Nature Biotechnology*, 20:177-182. Véase también Wu, Y., y col., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630. Otras publicaciones relevantes se enumeran a continuación.

Para el uso *in vivo*, el nucleósido no natural es permeable a la membrana y se fosforila para formar el trifosfato correspondiente. Además, el aumento de la información genética es estable y no es destruida por las enzimas celulares. Los esfuerzos anteriores de Benner y otros aprovecharon los patrones de enlaces de hidrógeno que son diferentes de los de los pares canónicos Watson-Crick, cuyo ejemplo más notable es el par iso C:iso-G. Véase, por ejemplo, Switzer y col., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; y Piccirilli y col., (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602. Estas bases, en general, no se aparean correctamente, en cierto grado, con las bases naturales y no se pueden replicar enzimáticamente. Kool y colaboradores demostraron que las interacciones de empaquetamiento hidrófobas entre bases pueden reemplazar el enlace de hidrógeno para impulsar la formación del par de bases. Véase, Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602; y Guckian y Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. En un esfuerzo por desarrollar un par de bases no naturales que satisfaga todos los requisitos anteriores, Schultz, Romesberg y colaboradores han sintetizado y estudiado sistemáticamente una serie de bases hidrófobas no naturales. Se ha encontrado que un autopar PICS:PICS es más estable que los pares de bases naturales, y puede incorporarse de manera eficaz al ADN por el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (KF). Véase, por ejemplo., McMinn y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6; y Ogawa y col., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274. Se puede sintetizar un autopar 3MN:3MN mediante KF con eficacia y selectividad suficientes para la función biológica. Véase, por ejemplo, Ogawa y col., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803. Sin embargo, ambas bases actúan como un terminador de cadena para una replicación adicional. Recientemente, se ha desarrollado una ADN polimerasa mutante que se puede usar para replicar el autopar de PICS. Además, se puede replicar un autopar 7Al. Véase, por ejemplo, Tae y col., (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439. También se ha desarrollado un nuevo par de metalobases, Dipic:Py, que forma un par estable al unirse a Cu (II). Véase Meggers y col., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714. Debido a que los codones extendidos y los codones no naturales son intrínsecamente ortogonales a los codones naturales, los procedimientos descritos aquí pueden aprovechar esta propiedad para generar ARNt ortogonales para ellos.

También se puede usar un sistema de derivación de la traducción para incorporar un aminoácido no natural a un polipéptido deseado. En un sistema de derivación de la traducción, se incorpora una secuencia grande en un gen, pero no se traduce en proteína. La secuencia contiene una estructura que sirve como señal para inducir al ribosoma a saltar sobre la secuencia y reanudar la traducción cadena abajo de la inserción.

Los genes que codifican proteínas o polipéptidos de interés pueden mutagenizarse usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento para incluir, por ejemplo, uno o más codones selectores para la incorporación de un aminoácido no natural. Por ejemplo, un ácido nucleico para una proteína de interés se mutageniza para incluir uno o más codones selectores, proporcionando la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales.

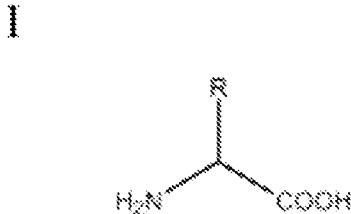
Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de interés tal como un polipéptido bG-CSF pueden mutarse fácilmente para introducir una cisteína en cualquier posición deseada del polipéptido. La cisteína se usa ampliamente para introducir moléculas reactivas, polímeros hidrosolubles, proteínas o una amplia variedad de otras moléculas en una proteína de interés. Los expertos en la materia conocen procedimientos adecuados para la incorporación de cisteína a una posición deseada de un polipéptido, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.608.183, y técnicas de mutagénesis estándar.

#### 50 **IV. Aminoácidos no codificados de forma natural**

Hay una amplia variedad de aminoácidos no codificados de forma natural que son adecuados para su uso en la presente invención. Se puede introducir cualquier cantidad de aminoácidos no codificados de forma natural en un polipéptido bG-CSF. En general, los aminoácidos no codificados de forma natural introducidos son sustancialmente inertes químicamente hacia los 20 aminoácidos genéticamente codificados comunes (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina). En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural incluyen grupos funcionales de cadena lateral que reaccionan de manera eficaz y selectiva con grupos funcionales que no se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, se puede hacer

reaccionar un polipéptido bG-CSF que incluye un aminoácido no codificado de forma natural que contiene un grupo azido funcional con un polímero (incluyendo, pero sin limitación, poli(etilenglicol) o, como alternativa, un segundo polipéptido que contiene una fracción alquino para formar un conjugado estable producido a partir de la reacción selectiva de la azida y los grupos funcionales alquino para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen.

- 5 La estructura genérica de un alfa-aminoácido se ilustra de la siguiente manera (Fórmula I):



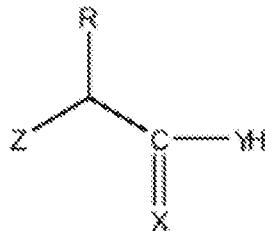
Un aminoácido no codificado de forma natural normalmente es cualquier estructura que tenga la fórmula presentada anteriormente, en la que el grupo R es cualquier sustituyente distinto de uno usado en los veinte aminoácidos naturales, y puede ser adecuado para su uso en la presente invención. Debido a que los aminoácidos no codificados de forma natural de la invención normalmente difieren de los aminoácidos naturales solo en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos no codificados de forma natural forman enlaces amida con otros aminoácidos, incluyendo, pero sin limitación, codificados de forma natural o no natural, de la misma manera en que se forman en polipéptidos de origen natural. Sin embargo, los aminoácidos no codificados de forma natural tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R comprende opcionalmente un grupo alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, selenio, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfona, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares, o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos no naturales de interés que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aminoácidos que comprenden un agente reticulante fotoactivable, aminoácidos marcados con espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales,

- 10 aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interaccionan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoestabilizados y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con hidratos de carbono, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, 20 aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con aminoácidos naturales, incluyendo, pero sin limitación, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluyendo, pero sin limitación, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 átomos carbonos, aminoácidos que contienen azúcar unidos a carbono, aminoácidos activos redox, aminoácidos que contienen aminoácido y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

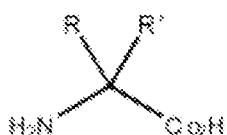
- 25 30 Los ejemplos de aminoácidos no codificados de manera natural que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención y que son útiles para reacciones con polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, aquellos con grupos reactivos carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden una fracción sacárido. Los ejemplos de dichos aminoácidos incluyen *N*-acetil-L-glucosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-galactosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, *N*-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de dichos aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N u O natural que existe entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de dichos aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en proteínas de origen natural tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

- 35 40 45 50 Muchos de los aminoácidos no codificados de forma natural proporcionados en la presente están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania) o Peptech (Burlington, MA, EE.UU.). Los que no se encuentran disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporcionan en el presente documento o usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Para consultar técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, "Organic Chemistry" de Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); "Advanced Organic Chemistry" de March (Tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y "Advanced Organic Chemistry" de Carey y Sundberg (Tercera edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Véanse, también, las patentes de EE.UU. n.º 7.045.337 y 7.083.970. Además de aminoácidos no naturales que contienen nuevas cadenas laterales, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras modificadas de la estructura principal, incluyendo, pero sin limitación, lo que se ilustra por las estructuras de Fórmula II y III:

II



III



en las que Z normalmente comprende OH, NH<sub>2</sub>, SH, NH-R' o S-R'; X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, normalmente comprenden S u O, y R y R', que son opcionalmente iguales o diferentes, normalmente se seleccionan de la misma lista de constituyentes que para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen Fórmula I, así como también hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención comprenden

5 opcionalmente sustituciones en el grupo amino o carboxilo como las ilustradas por las Fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero sin limitación,  $\alpha$ -hidroxiácidos,  $\alpha$ -tioácidos,  $\alpha$ -aminotiocarboxilatos, incluyendo, pero sin limitación, con cadenas laterales que corresponden a los veinte aminoácidos naturales comunes o cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono  $\alpha$  opcionalmente incluyen, pero sin limitación, aminoácidos disustituidos en L, D o  $\alpha$ - $\alpha$  tales como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico, y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cíclicos tales como análogos de prolina, así como análogos de prolina de anillo de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, aminoácidos  $\beta$  y  $\gamma$  tales como  $\beta$ -alanina sustituida y ácido  $\gamma$ -aminobutírico sustituido.

10 Muchos aminoácidos no naturales se basan en aminoácidos naturales tales como tirosina, glutamina, fenilalanina y similares, y son adecuados para su uso en la presente invención. Los análogos de tirosina incluyen, pero sin limitación, tirosinas *para*-sustituidas, tirosinas *ortho*-sustituidas y tirosinas *meta*-sustituidas, en los que la tirosina sustituida comprende, incluyendo, pero sin limitación, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un grupo benzoílo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, un hidrocarburo saturado o insaturado, un grupo O-metilo, un grupo poliéster, un grupo nitró, un grupo alquinilo o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo múltiplemente sustituidos. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, derivados de  $\alpha$ -hidroxi, derivados  $\gamma$ -sustituidos, derivados cíclicos y derivados de glutamina sustituidos con amida. Los ejemplos de análogos de fenilalanina que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, fenilalaninas *para*-sustituidas, fenilalaninas *ortho*-sustituidas y 15 fenilalaninas *meta*-sustituidas, en las que el sustituyente comprende, pero sin limitación, un grupo hidroxi, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un grupo benzoílo, un grupo alquinilo, o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, una *p*-acetil-L-fenilalanina, un O-metil-L-tiroseno y una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-20 4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetyl-GlcNAc $\beta$ -serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una *p*-azido-L-fenilalanina, una *p*-acil-L-fenilalanina, una *p*-benzoyl-L-fenilalanina, L-fososerina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una *p*-yodo-fenilalanina, una *p*-bromofenilalanina, una *p*-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina y una *p*-propargiloxy-fenilalanina, y similares. Los ejemplos de estructuras de una variedad de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención se proporcionan, por ejemplo, en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids". Véase también Kiick y col., (2002) "Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation", PNAS 99:19-24, para análogos de metionina adicionales. La solicitud internacional n.º PCT/US06/47822 titulada "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides", describe la alquilación reductiva de fracciones de amino aromáticas, incluyendo, pero sin limitación: *p*-amino-fenilalanina y aminación reductiva.

40 Se pueden proporcionar composiciones de un polipéptido bG-CSF que incluyen un aminoácido no natural (tal como *p*-(propargiloxy)-fenilalanina). En una realización, una composición que incluye un aminoácido no natural *p*-

(propargiloxi)-fenilalanina incluye además un ARNt ortogonal. El aminoácido no natural se puede unir (incluyendo, pero sin limitación, covalentemente) al ARNt ortogonal, incluyendo, pero sin limitación, unido covalentemente al ARNt ortogonal a través de un enlace aminoacilo, unido covalentemente a un OH de 3' o un OH de 2' de un azúcar de ribosa terminal del ARNt ortogonal, etc.

- 5 Las fracciones químicas a través de aminoácidos no naturales que se pueden incorporar a las proteínas ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de la proteína. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional ceto permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de una serie de reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vitro* e *in vivo*. Un aminoácido no natural de átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para sincronizar los datos de la estructura de rayos X. La introducción específica del sitio de átomos pesados usando 10 aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la selección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluyendo, pero sin limitación, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluyendo, pero sin limitación, fenilazida)), por ejemplo, permiten una fotorreticulación eficaz *in vivo* e *in vitro* de la proteína. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero sin limitación, *p*-azidofenilalanina y *p*-benzoyl-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales 15 fotorreactivos se puede reticular después a voluntad mediante la excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo, el grupo metilo de un amino no natural puede ser sustituido con un, incluyendo, pero sin limitación, grupo metilo marcado isotópicamente como una sonda de estructura y dinámica locales, incluyendo, pero sin limitación, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopía vibratoria. Los grupos funcionales alquinilo o azido, por ejemplo, permiten la modificación selectiva de proteínas con moléculas a través de 20 una reacción de cicloadición [3+2].

Un aminoácido no natural incorporado a un polipéptido en el extremo amino puede componerse de un grupo R que sea cualquier sustituyente distinto de uno usado en los veinte aminoácidos naturales y un segundo grupo reactivo diferente del grupo NH<sub>2</sub> normalmente presente en los α-aminoácidos (véase la Fórmula I). Se puede incorporar un aminoácido no natural similar en el extremo carboxilo con un segundo grupo reactivo diferente del grupo COOH 25 normalmente presente en α-aminoácidos (véase la Fórmula I).

Los aminoácidos no naturales de la invención pueden seleccionarse o diseñarse para proporcionar características adicionales no disponibles en los veinte aminoácidos naturales. Por ejemplo, el aminoácido no natural se puede diseñar o seleccionar opcionalmente para modificar las propiedades biológicas de una proteína, por ejemplo, en la que se incorporan. Por ejemplo, las siguientes propiedades pueden modificarse opcionalmente mediante la inclusión 30 de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, solubilidad, estabilidad, por ejemplo, térmica, hidrolítica, oxidativa, resistencia a la degradación enzimática y similares, facilidad de purificación y procesamiento, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, actividad catalítica, potencial redox, semivida, capacidad de reaccionar con otras moléculas, por ejemplo, covalente o no covalentemente, y similares.

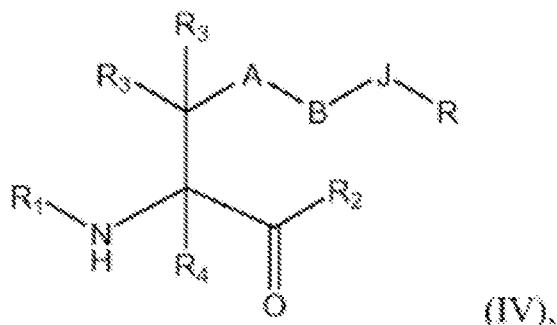
### ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES: CARBONILO, TIPO CARBONILO, CARBONILO ENMASCARADO, GRUPOS CARBONILO PROTEGIDOS Y GRUPOS HIDROXILAMINA

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona bG-CSF enlazado a un polímero hidrosoluble, por ejemplo, un PEG, mediante un enlace oxima.

Muchos tipos de aminoácidos no codificados de forma natural son adecuados para la formación de enlaces oxima. 40 Estos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no codificados de manera natural que contienen un grupo carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Dichos aminoácidos se describen en las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289, y en el documento WO. 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides". Los aminoácidos no codificados de forma natural también se describen en la patente de EE.UU. n.º 7.083.970 y en la patente de EE.UU. n.º 7.045.337.

45 La invención utiliza polipéptidos bG-CSF que están sustituidos en una o más posiciones con un aminoácido de *para*-acetilfenilalanina. La síntesis de *p*-acetil-(+/-)-fenilalanina y *m*-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen en Zhang, Z., y col., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo pueden ser preparados de manera similar por un experto habitual en la materia. Además, las síntesis ilustrativas no limitantes de aminoácidos no naturales que se incluyen en el presente documento se presentan en las FIG. 4, 24-34 y 36-39 de la patente de EE.UU. n.º 7.083.970.

50 Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten una variedad de reacciones para unir moléculas a través de reacciones de adición nucleófila, entre otras. Dichos grupos electrófilos reactivos incluyen un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo), un grupo similar al carbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo), un grupo carbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo)) o un grupo carbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) después de la desprotección. Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IV):

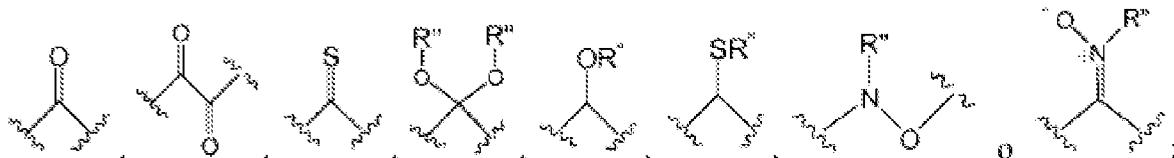


en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilen o alquilen sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')CO-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

J es



R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

cada R" es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector o cuando está presente más de un grupo R", dos R" forman opcionalmente un heterocicloalquilo;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

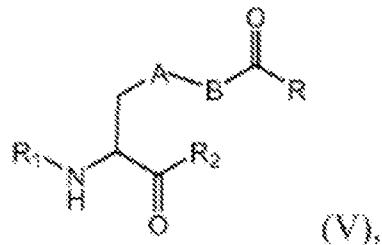
cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>, o dos grupos R<sub>3</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

o los grupos -A-B-J-R forman juntos un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido o grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado;

o el grupo -J-R forma junto un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido o grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado;

con la condición de que cuando A sea fenileno y cada R<sub>3</sub> sea H, B esté presente; y que cuando A sea -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- y cada R<sub>3</sub> sea H, B no sea -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; y que cuando A y B estén ausentes y cada R<sub>3</sub> sea H, R no sea metilo.

Además, se incluyen los que tienen la estructura de Fórmula (V):



en la que:

5 A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

10 B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

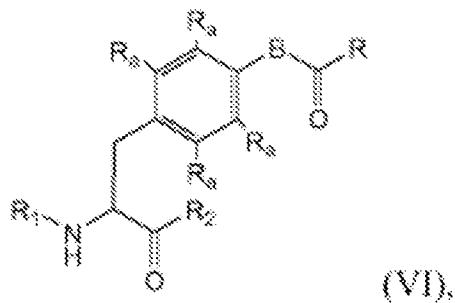
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

20 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

con la condición de que cuando A sea feníleno, B esté presente; y que cuando A sea -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, B no sea -NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-; y que cuando A y B estén ausentes, R no sea metilo.

25 Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VI):



en la que:

B es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

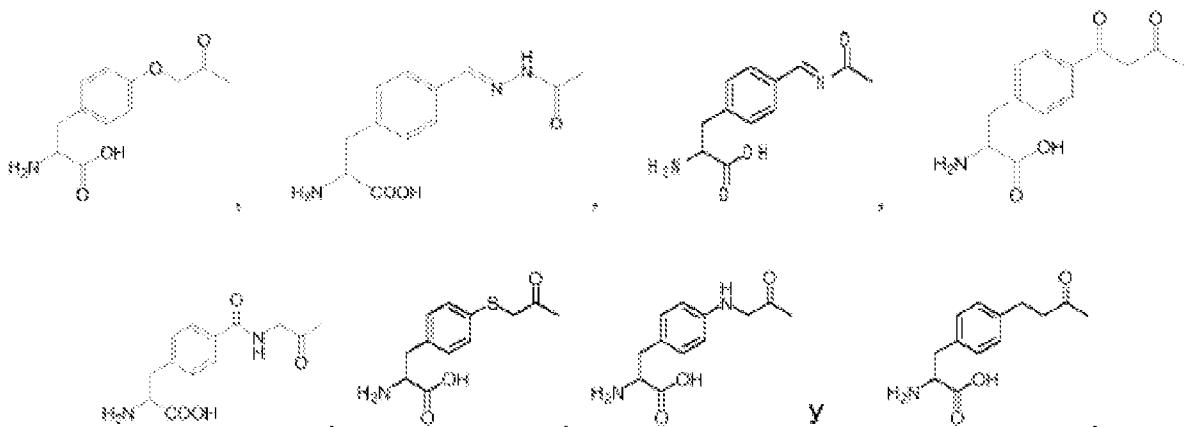
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

5 R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

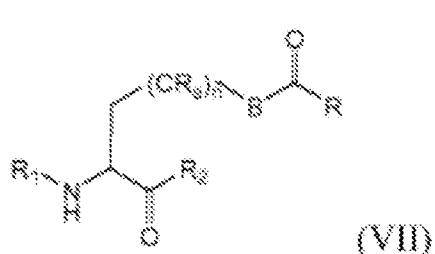
cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



10 en los que dichos compuestos son opcionalmente grupo protegido por amino, grupo protegido por carboxilo o una sal de los mismos. Además, cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



15 en la que:

B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquieno inferior, alquieno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquieno inferior, heteroalquieno inferior sustituido, -O-, -O-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S-, -S-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')CO-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=-, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

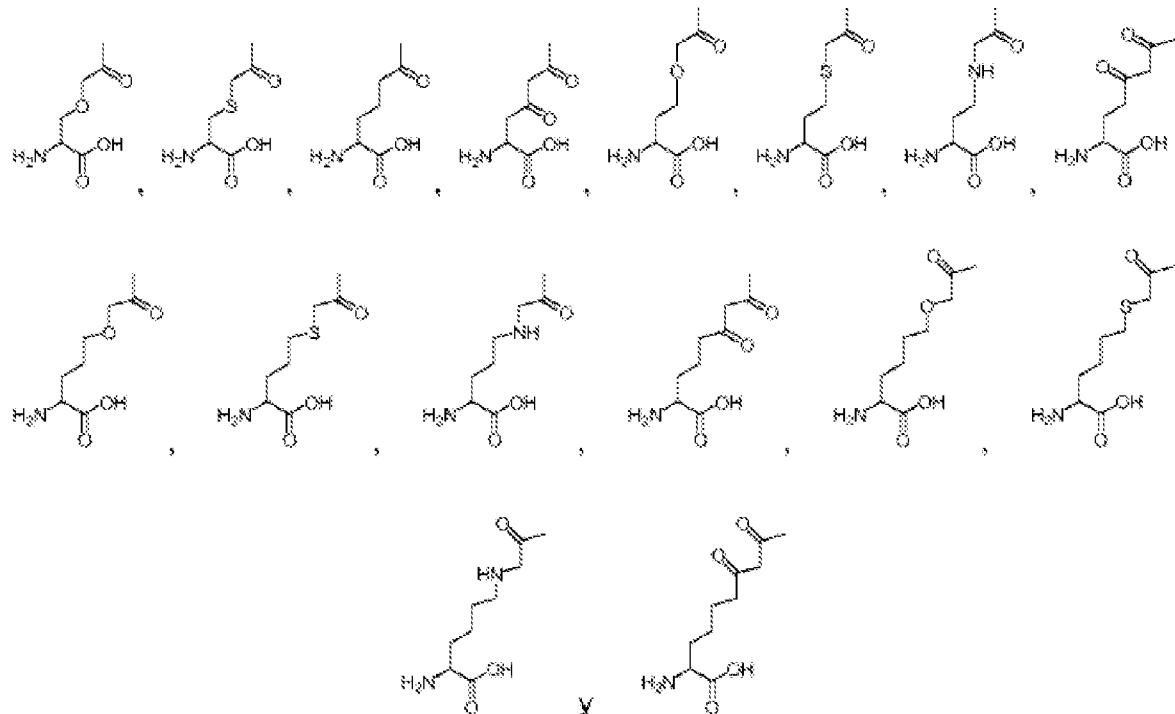
R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

30 R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

cada  $R_a$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido,  $-N(R')_2$ ,  $-C(O)_kR'$  donde k es 1, 2 o 3,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-OR'$  y  $-S(O)_kR'$ , donde cada  $R'$  es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8;

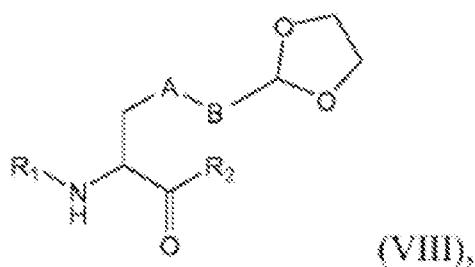
con la condición de que cuando A sea  $-(CH_2)_4-$ , B no sea  $NHC(O)(CH_2CH_2)-$ .

- 5 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



- 10 en los que dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se pueden incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VIII):

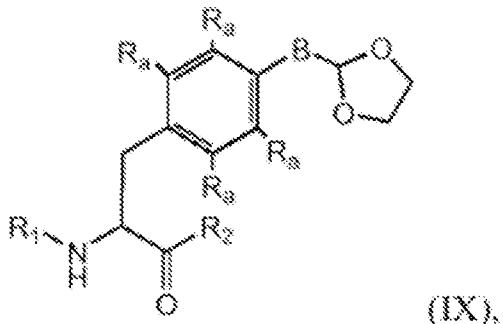


- 15 en la que A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

20 B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior sustituido,  $-O-$ ,  $-O-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-S-$ ,  $-S-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-S(O)_k-$  donde k es 1, 2 o 3,  $-S(O)_k(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-N(R')$ ,  $-NR'-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-C(O)N(R')$ ,  $-CON(R')$  (alquilen o alquilen sustituido)-,  $-CSN(R')$ ,  $-CSN(R')-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-N(R')CO-(alquilen\ o\ alquilen\ sustituido)-$ ,  $-N(R')C(O)O-$ ,  $-S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')C(O)N(R')$ ,  $-N(R')C(S)N(R')$ ,  $-N(R')S(O)_kN(R')$ ,  $-N(R')$ .

- N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R)=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;  
 5 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y  
 R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IX):



- 10 B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')-, -NR'(alquilen o alquilen sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilen o alquilen sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')CO-(alquilen o alquilen sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-
- 15 N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R)=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

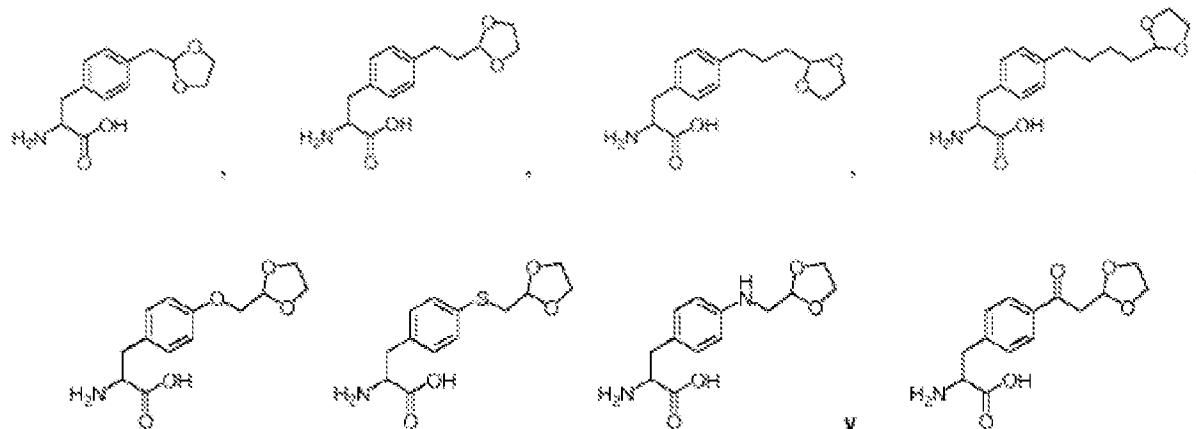
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

- 20 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

- 25 en la que cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

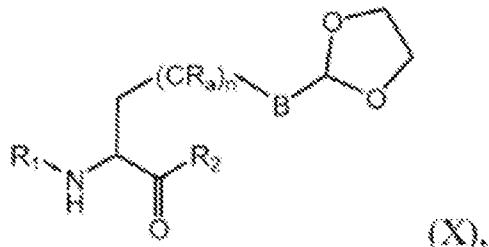
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



- 30 en los que dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos

no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se pueden incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (X):



- 5 en la que B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquieno inferior, alquieno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquieno inferior, heteroalquieno inferior sustituido, -O-, -O-(alquien o alquien sustituido)-, -S-, -S-(alquien o alquien sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquien o alquien sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquien o alquien sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquien o alquien sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquien o alquien sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquien o alquien sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquien o alquien sustituido)-, -N(R')CO-(alquien o alquien sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')=N-, -C(R)=N-, -C(R)=N-N(R')-, -C(R)=N-N=, -C(R)<sub>2</sub>-N=N- y -C(R)<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- 10

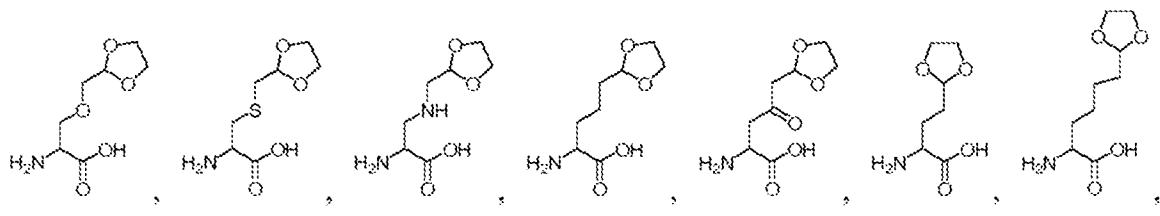
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

- 15 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

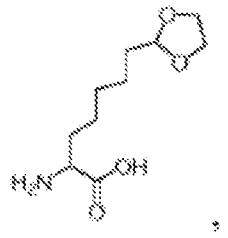
R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

- 20 cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



y

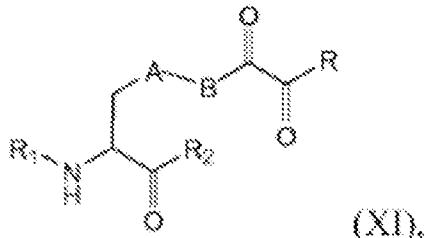


- 25 en los que dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se pueden incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

- 30 Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento

pueden incluir grupos tales como grupos dicarbonilo, de tipo dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y dicarbonilo protegido.

Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XI):



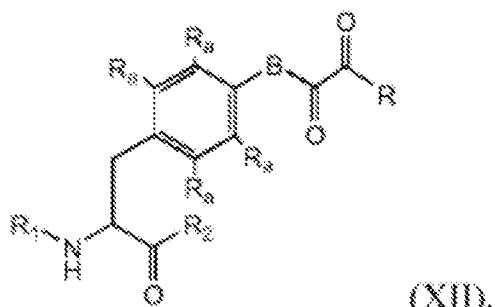
- 5 en la que A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;
- 10 B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquílen o alquílen sustituido)-, -S-, -S-(alquílen o alquílen sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquílen o alquílen sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')CO-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquílo o alquílo sustituido;
- 15

R es H, alquílo, alquílo sustituido, cicloalquílo o cicloalquílo sustituido;

20 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XII):



- 25 B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquílen o alquílen sustituido)-, -S-, -S-(alquílen o alquílen sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquílen o alquílen sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquílen o alquílen sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')CO-(alquílen o alquílen sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquílo o alquílo sustituido;
- 30

R es H, alquílo, alquílo sustituido, cicloalquílo o cicloalquílo sustituido;

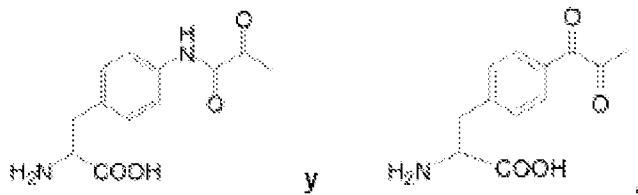
R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o

polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

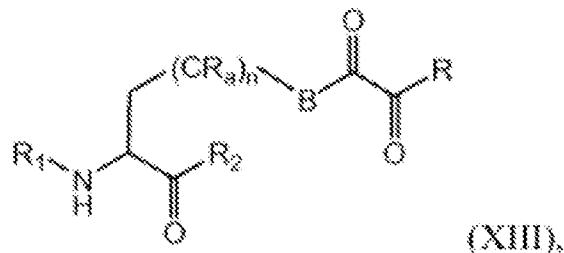
- 5 en la que cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



- 10 en los que dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se pueden incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIII):



- 15 en la que B es opcional, y cuando está presente, es un engarce seleccionado del grupo que consiste en alquieno inferior, alquieno inferior sustituido, alquieneno inferior, alquieneno inferior sustituido, heteroalquieno inferior, heteroalquieno inferior sustituido, -O-, -O-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S-, -S-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S(O)<sub>k</sub>- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)<sub>k</sub>(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')CO-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')<sub>2</sub>-N=N- y -C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

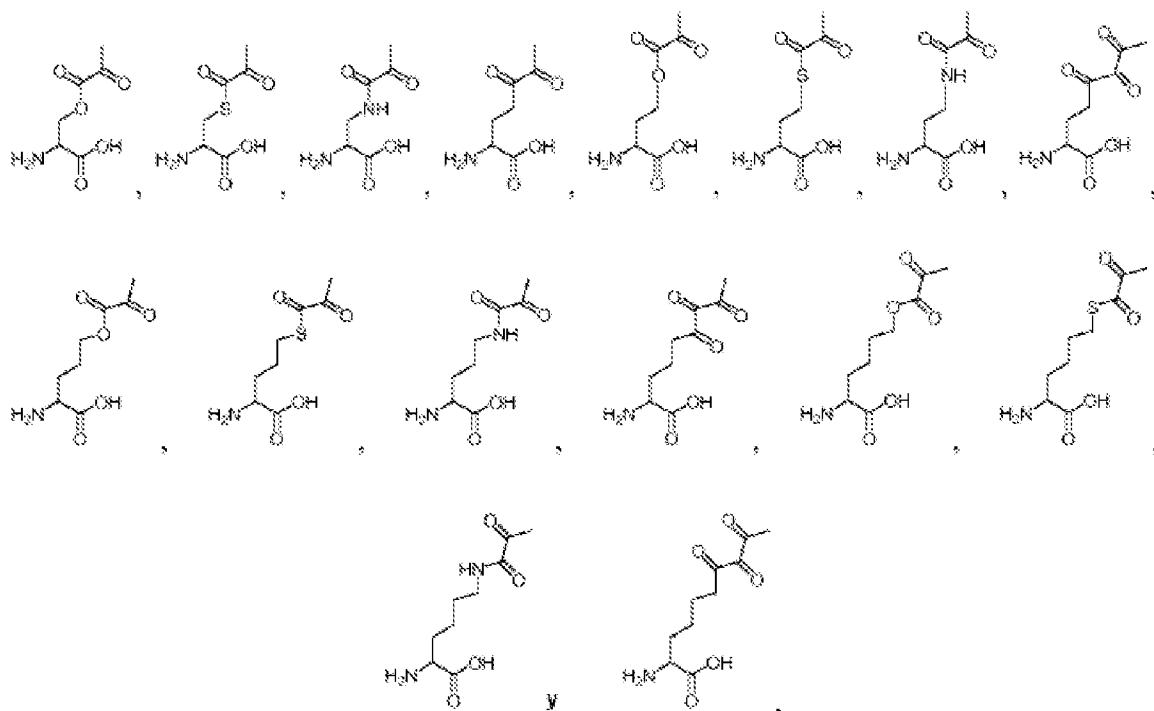
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

- 25 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

- 30 cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8.

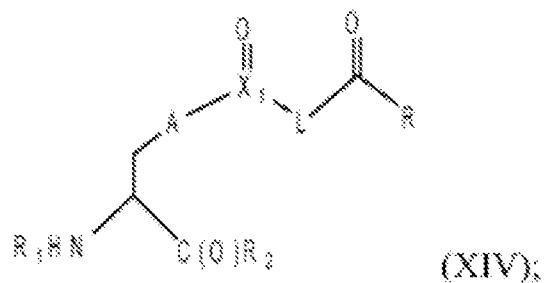
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



en los que dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se pueden incorporar a un polipéptido de aminoácidos no naturales.

5

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV):



en la que:

10 A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

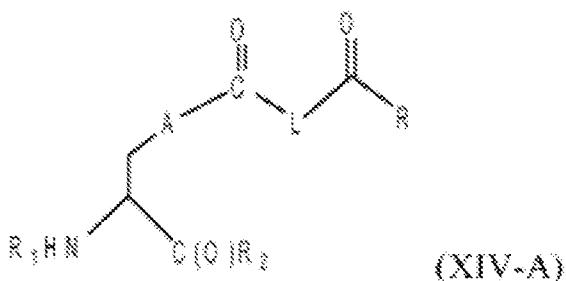
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

15 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

20 X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV-A):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

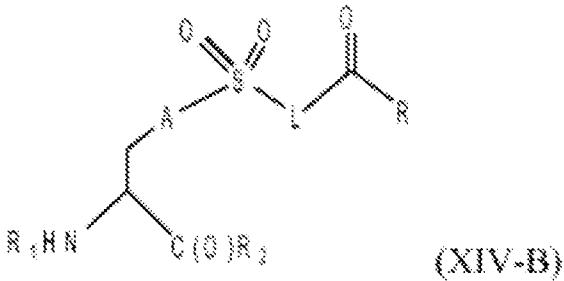
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

10 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

15 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

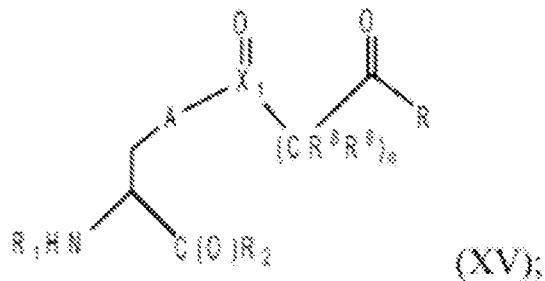
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

20 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

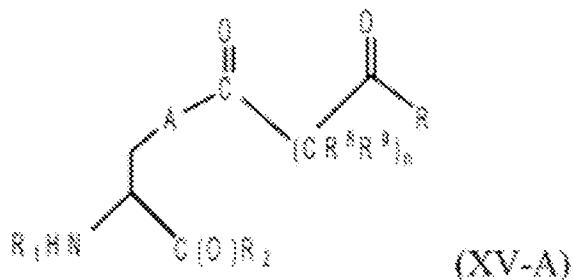
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

10 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

15 X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> de cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV-A):



en la que:

20 A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

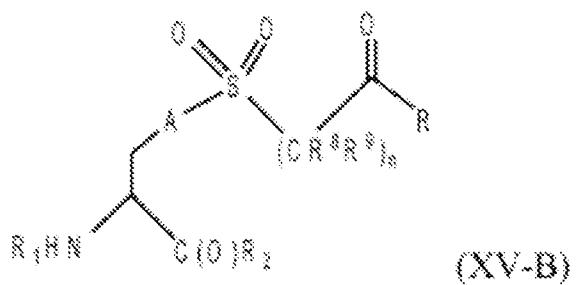
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

25 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

30 n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> de cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos =O o un cicloalquilo o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XV-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquenileno inferior, heteroalquenileno sustituido, heterocicloalquenileno inferior, heterocicloalquenileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

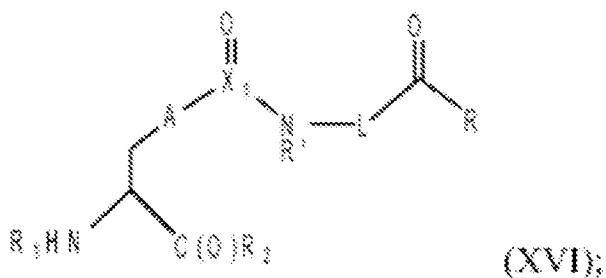
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> de cada grupo CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> pueden formar juntos =O o un cicloalquilo o cualquiera de los grupos R<sup>8</sup> adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquenileno inferior, heteroalquenileno sustituido, heterocicloalquenileno inferior, heterocicloalquenileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

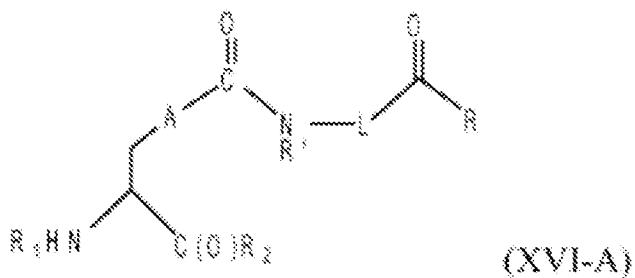
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

X<sub>1</sub> es C, S o S(O); y L es alqueno, alqueno sustituido, N(R')(alqueno) o N(R')(alqueno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI-A):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

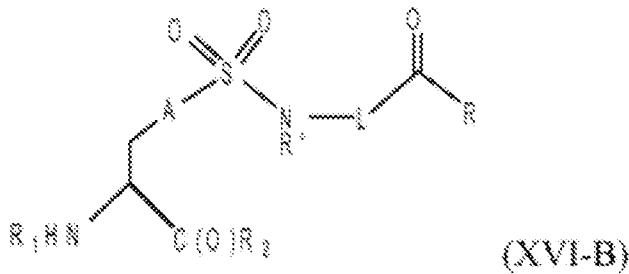
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

15 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

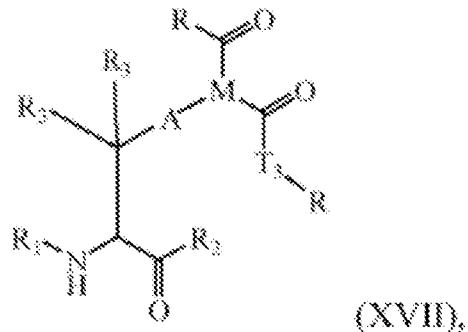
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

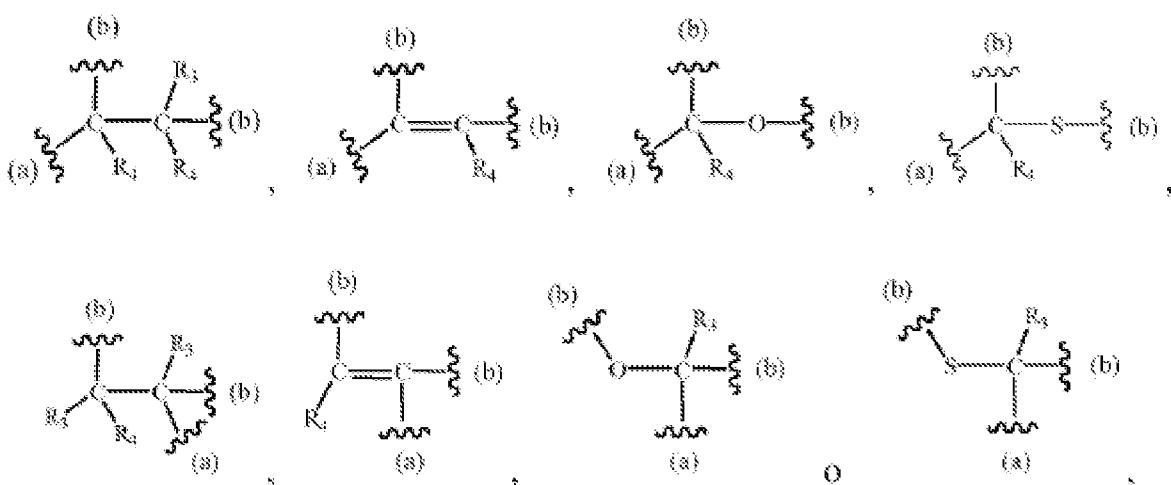
30 Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVII):



en la que:

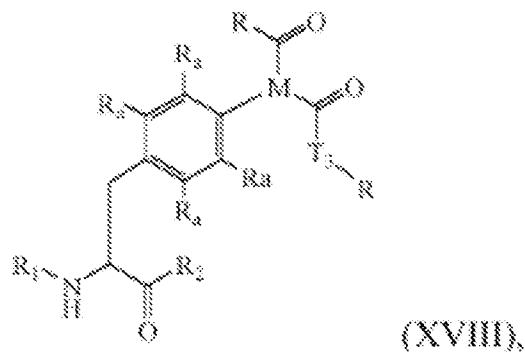
- 5 A es opcional, y cuando está presente, es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

M es  $-C(R_3)-$ ,



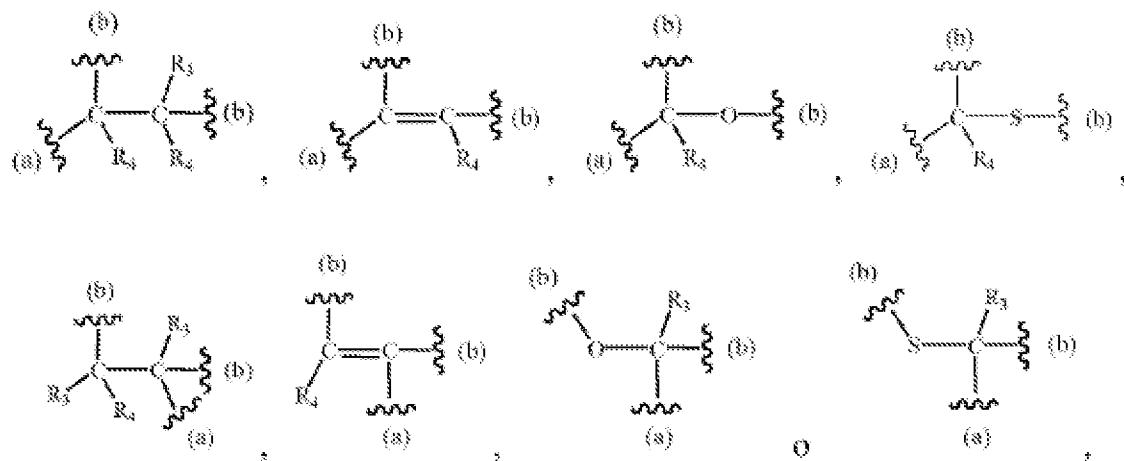
- 10 donde (a) indica un enlace al grupo A y (b) indica un enlace a los respectivos grupos carbonilo,  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o  $R_3$  y  $R_4$  o dos grupos  $R_3$  o dos grupos  $R_4$  forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;
- R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O o S y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 15 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
- R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVIII):



en la que:

M es  $-C(R_3)-$ ,



5 donde (a) indica un enlace al grupo A y (b) indica un enlace a los respectivos grupos carbonilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> o dos grupos R<sub>3</sub> o dos grupos R<sub>4</sub> forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

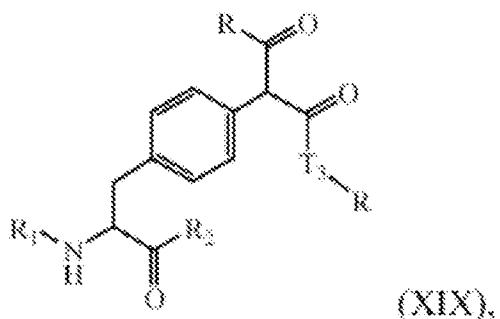
T<sub>3</sub> es un enlace, C(R)(R), O o S y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

10 R<sub>1</sub> es opcional y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R<sub>2</sub> es opcional y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

15 cada R<sub>a</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')<sub>2</sub>, -C(O)<sub>k</sub>R' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -OR' y -S(O)<sub>k</sub>R', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

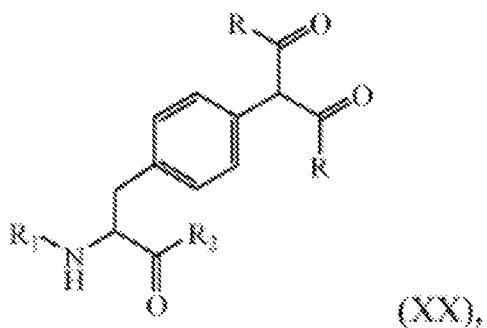
Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIX):



en la que:

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y  
T<sub>3</sub> es O o S.

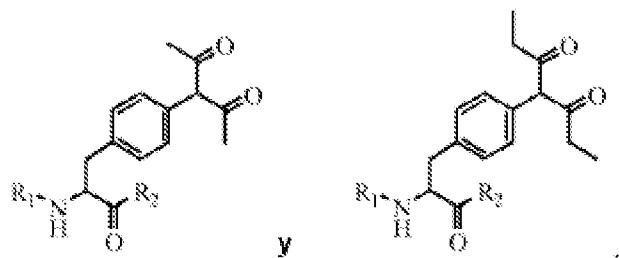
- 5 Además, se incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XX):



en la que:

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen las estructuras de Fórmula (XXI):



10

En algunas realizaciones, se modifica químicamente un polipéptido que comprende un aminoácido no natural para generar un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo reactivo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tenga grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede usar una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente de manera normal o puede estar expuesta a través de digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suave usando peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, y col., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. y Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner y col., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los procedimientos conocidos en la técnica están restringidos al aminoácido en el extremo N del péptido o de la proteína.

15 20 En la presente invención, se puede incorporar un aminoácido no natural portador de grupos hidroxilo y amino adyacentes al polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina porta un

5 grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído normalmente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación normalmente es de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 molar de exceso de meta-periodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguida de la incubación durante aproximadamente 10 minutos a oscuras. Véase la patente de EE.UU. n.º 6.423.685.

10 La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contenga hidroxilamina en condiciones suaves en solución acuosa para formar el enlace de oxima correspondiente que sea estable en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. y Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., *Science* 276:1125-1128 (1997).

#### **Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina**

15 La solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/638.418 proporciona las siguientes divulgaciones en el apartado V (titulado "Aminoácidos no naturales"), Parte B (titulada "Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina"), Publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289, y el documento WO 2006/069246 titulado "Composiciones que contienen, procedimientos que implican y usos de aminoácidos y polipéptidos no naturales".

#### **20 SÍNTESIS QUÍMICAS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES**

Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma (EE.UU.) o Aldrich (Milwaukee, WI, EE.UU.). Aquellos que no se encuentran disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento o como se proporciona en diversas publicaciones o usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Para consultar técnicas de síntesis orgánica. Véase, por ejemplo, "Organic Chemistry" de Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); "Advanced Organic Chemistry" de March (Tercera edición, 1985, Wiley y Sons, Nueva York); y "Advanced Organic Chemistry" de Carey y Sundberg (Tercera edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Otras publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids", Matsoukas y col., (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F. E. y Kidd, D. A. A. (1949) "A New Synthesis of Glutamine and of  $\gamma$ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthalylated Intermediates". *J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O. M. y 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. y col. (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. y Frappier, F. (1991) "Glutamine analogues as Potential Antimalarials", *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. y Rapoport, H. (1989) "Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues". *J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B. D. y Rapoport, H. (1985) "Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization". *J. Org. Chem.* 50:1239-1246; Barton y col., (1987) "Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- y D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives". *Tetrahedron* 43:4297-4308; y, Subasinghe y col., (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. Véase también la publicación de patente de EE.UU. n.º 2004/0198637 titulada "Protein Arrays".

#### **45 A. Grupos reactivos de carbonilo**

Los aminoácidos con un grupo reactivo de carbonilo permiten una variedad de reacciones para enlazar moléculas (incluyendo, pero sin limitación, PEG u otras moléculas hidrosolubles) a través de la adición nucleófila o reacciones de condensación de aldol, entre otras.

Los ejemplos de aminoácidos que contienen carbonilo se pueden representar de la siguiente manera:



50 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R<sub>2</sub> es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino; y R<sub>4</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub>

es fenilo y R<sub>2</sub> es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción cetona está situada en la posición *para* en relación con la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo y R<sub>2</sub> es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción cetona está situada en la posición *meta* con respecto a la cadena lateral de alquilo.

- 5 La síntesis de *p*-acetil-(+/-)-fenilalanina y *m*-acetil-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., y col., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Otros aminoácidos que contienen carbonilo pueden ser preparados de forma similar por un experto habitual en la materia.

Se puede modificar químicamente un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural para generar un grupo funcional carbonilo reactivo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tenga grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede usar una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente de manera normal o puede estar expuesta a través de digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suave usando peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, y col., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. y Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner y col., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los procedimientos conocidos en la técnica están restringidos al aminoácido del extremo N del péptido o de la proteína.

En la presente invención, se puede incorporar un aminoácido no codificado de forma natural portador de grupos hidroxilo y amino adyacentes al polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina porta un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído normalmente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación normalmente es de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 molar de exceso de metaperyodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguida de la incubación durante aproximadamente 10 minutos a oscuras. Véase la patente de EE.UU. n.º 6.423.685.

25 La funcionalidad carbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contenga hidracina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones suaves en solución acuosa para formar enlaces de hidrazona, oxima o semicarbazona, respectivamente, que sean estables en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. y Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., *Science* 276:1125-1128 (1997).

#### B. Grupos reactivos de hidracina, hidrazida o semicarbazida

35 Los aminoácidos no codificados de forma natural que contienen un grupo nucleófilo, tal como hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros hidrosolubles).

Los ejemplos de aminoácidos que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida se pueden representar de la siguiente manera:



40 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido, o no está presente; X es O, N o S, o no está presente; R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi.

45 En algunas realizaciones, n es 4, R<sub>1</sub> no está presente y X es N. En algunas realizaciones, n es 2, R<sub>1</sub> no está presente y X no está presente. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X es O y el átomo de oxígeno está situado *para* con respecto al grupo alifático en el anillo de arilo.

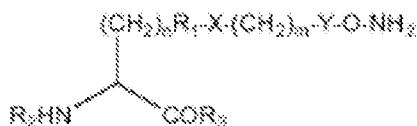
Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida se encuentran disponibles en el mercado. Por ejemplo, L-glutamato-γ-hidrazida está disponible en Sigma Chemical (St. Louis, MO). Otros aminoácidos no disponibles en el mercado pueden ser preparados por un experto habitual en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.281.211.

- Los polipéptidos que contienen aminoácidos no codificados de manera natural que portan funcionalidades de hidrazida, hidrazina o semicarbazida pueden reaccionar de manera eficaz y selectiva con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). La reactividad única de los grupos funcionales hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace significativamente más reactivos hacia los aldehídos, las cetonas y otros grupos electrófilos en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, el grupo hidroxilo de serina o treonina, o los grupos amino de lisina y el extremo N).
- 5

### C. Aminoácidos que contienen aminooxi

- Los aminoácidos no codificados de forma natural que contienen un grupo aminooxi (también denominado hidroxilamina), permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros hidrosolubles). Como las hidracinas, hidrazidas o semicarbazidas, la nucleofilia potenciada del grupo aminooxi permite la reacción de manera eficaz y selectiva con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazone correspondiente, sin embargo, una oxima resulta en general de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo tal como una cetona.
- 10
- 15

Los ejemplos de aminoácidos que contienen grupos aminooxi se pueden representar de la siguiente manera:



- 20 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido, o no está presente; X es O, N o S, o no está presente; m es 0-10; Y = C(O) o no está presente; R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X es O, m es 1 e Y está presente. En algunas realizaciones, n es 2, R<sub>1</sub> y X no están presentes, m es 0 e Y no está presente.
- 25 Los aminoácidos que contienen aminooxi pueden prepararse a partir de precursores de aminoácidos que se pueden obtener fácilmente (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003). Ciertos aminoácidos que contienen aminooxi, tales como el ácido L-2-amino-4-(aminooxi)butírico, se han aislado a partir de fuentes naturales (Rosenthal, G., *Life Sci.* 60:1635-1641 (1997). Otros aminoácidos que contienen aminooxi pueden ser preparados por un experto habitual en la materia.
- 30

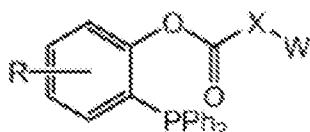
### D. Grupos reactivos de azida y alquino

- La reactividad única de los grupos funcionales azida y alquino los hace sumamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, en particular, las azidas alifáticas y los alquinos, en general, son estables frente a las condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto la azida como los grupos funcionales alquino son inertes hacia las cadenas laterales (es decir, grupos R) de los 20 aminoácidos comunes encontrados en polipéptidos que se producen de forma natural. Sin embargo, al acercarse, se revela la naturaleza "accionada por resorte" de los grupos azida y alquino, y reaccionan de forma selectiva y eficaz a través de la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin J., y col., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).
- 40 Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, por ejemplo, Padwa, A., en "COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS", Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), pág. 1069-1109; Huisgen, R. en "1,3-DIPOLAR CICLOADDITION CHEMISTRY", (ed. Padwa, A., 1984), pág. 1-176) en lugar de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural portadores de cadenas laterales que contienen azida y alquino permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido no codificado de forma natural. La reacción de cicloadición que implica un polipéptido bG-CSF que contiene azida o alquino se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu (II) (incluyendo, pero sin limitación, en forma de una cantidad catalítica de CuSO<sub>4</sub>) en presencia de un agente reductor para reducir Cu (II) a Cu (I), *in situ*, en cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., y col., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Los ejemplos de agentes reductores incluyen, pero sin limitación, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y un potencial eléctrico aplicado.
- 45
- 50

En algunos casos, cuando se desea una reacción de cicloadición [3 + 2] de Huisgen entre una azida y un alquino, el polipéptido bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de forma natural que comprende una fracción alquino, y

el polímero hidrosoluble que se unirá al aminoácido comprende una fracción azida. Como alternativa, también se puede realizar la reacción inversa (es decir, con la fracción azida en el aminoácido y la fracción alquino presente en el polímero hidrosoluble).

- 5 El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero hidrosoluble que contenga un ariléster y funcionalizarse apropiadamente con una fracción arilfosfina para generar un enlace amida. El grupo arilfosfina reduce la azida *in situ*, y la amina resultante reacciona luego de manera eficaz con un enlace éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser una alquilazida (incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una arilazida (*p*-azidofenilalanina).
- 10 Los ejemplos de polímeros hidrosolubles que contienen un ariléster y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:



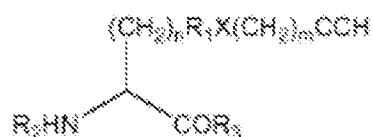
- 15 en la que X puede ser O, N, S o no estar presente, Ph es fenilo, W es un polímero hidrosoluble y R puede ser H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y grupos arilo sustituidos. Los ejemplos de grupos R incluyen, pero sin limitación, -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN y -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' y R'''' se refieren independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando hay más de uno de estos grupos presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la descripción anterior de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y similares).
- 20
- 25

- El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero hidrosoluble que contenga un tioéster y funcionalizarse apropiadamente con una fracción arilfosfina para generar un enlace amida. El grupo arilfosfina reduce la azida *in situ*, y la amina resultante reacciona luego de manera eficaz con un enlace tioéster para generar la amida correspondiente. Los ejemplos de polímeros hidrosolubles que contienen un tioéster y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:



en la que n es 1-10; X puede ser O, N, S o no estar presente, Ph es fenilo y W es un polímero hidrosoluble.

Los ejemplos de aminoácidos que contienen alquino se pueden representar de la siguiente manera:



- 35 en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido, o no está presente; X es O, N o S, o no está presente; m es 0-10; R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción acetileno está situada en la posición *para* respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X es O, m es 1 y el grupo propargiloxi está situado en la posición *para* respecto a la cadena lateral de alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> y X no están presentes y m es 0 (es decir, propargilglicina).
- 40

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la propargilglicina está

disponible en el mercado en Peptech (Burlington, MA). Como alternativa, los aminoácidos que contienen alquino se pueden preparar de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, la *p*-propargiloxifenilalanina puede sintetizarse, por ejemplo, como se describe en Deiters, A., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003), y la 4-alquinil-L-fenilalanina se puede sintetizar como se describe en Kayser, B., y col., *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997).

5 El experto habitual en la materia puede preparar otros aminoácidos que contengan alquino.

Los ejemplos de aminoácidos que contienen azida se pueden representar de la siguiente manera:



- en la que n es 0-10; R<sub>1</sub> es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido, o no está presente; X es O, N o S, o no está presente; m es 0-10; R<sub>2</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino; y R<sub>3</sub> es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxi. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción azida está situada en la posición *para* respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 0-4, y R<sub>1</sub> y X no están presentes, y m = 0. En algunas realizaciones, n es 1, R<sub>1</sub> es fenilo, X es O, m es 2, y la fracción β-azidoetoxilo está situada en la posición *para* respecto a la cadena lateral de alquilo.
- 10 Los aminoácidos que contienen azida están disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, 4-azidofenilalanina se puede obtener de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Para los aminoácidos que contienen azida que no están disponibles en el mercado, el grupo azida se puede preparar de forma relativamente fácil usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, mediante el desplazamiento de un grupo saliente adecuado (incluyendo, pero sin limitación, haluro, mesilato, tosilato) o mediante la apertura de una lactona adecuadamente protegida. Véase, por ejemplo, "Advanced Organic Chemistry" de March (Tercera edición, 1985, Wiley y Sons, Nueva York).
- 15
- 20

#### E. Grupos reactivos de aminotiol

- La reactividad única de los grupos funcionales aminotiol beta-sustituidos los hace sumamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído mediante la formación de la tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao y J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas realizaciones, los aminoácidos de aminotiol beta-sustituidos pueden incorporarse a polipéptidos de bG-CSF y luego hacerse reaccionar con polímeros hidrosolubles que comprendan una funcionalidad de aldehído. En algunas realizaciones, un polímero hidrosoluble, un conjugado de fármaco u otra carga útil pueden acoplarse a un polipéptido bG-CSF que comprenda un aminoácido aminotiol beta-sustituido mediante la formación de la tiazolidina.

#### F. Grupos reactivos adicionales

- En las siguientes solicitudes de patente, se describen grupos reactivos adicionales y aminoácidos no codificados de forma natural, incluyendo, pero sin limitación, *para*-aminofenilalanina, que pueden incorporarse a polipéptidos bG-CSF de la invención: publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0194256, publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0217532, publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0217289, patente provisional de EE.UU. n.º 60/755,338; patente provisional de EE.UU. n.º 60/755,711; patente provisional de EE.UU. n.º 60/755,018; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/49397; documento WO 2006/069246; patente provisional de EE.UU. n.º 60/743,041; patente provisional de EE.UU. n.º 60/743,040; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/47822; patente provisional de EE.UU. n.º 60/882,819; patente provisional de EE.UU. n.º 60/882,500; y patente provisional de EE.UU. n.º 60/870,594. Estas solicitudes también analizan grupos reactivos que pueden estar presentes en PEG u otros polímeros, incluyendo, pero sin limitación, grupos hidroxilamina (aminooxi) para la conjugación.

#### ABSORCIÓN CELULAR DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

- La absorción de aminoácidos no naturales por parte de una célula es un problema que normalmente se considera al diseñar y seleccionar aminoácidos no naturales, incluyendo, pero sin limitación, la incorporación a una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los α-aminoácidos sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales son absorbidos por la célula eucariota a través de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Se puede realizar una exploración rápida que evalúe qué aminoácidos no naturales, si los hay, son absorbidos por las células. Véanse, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays"; y Liu, D. R. y Schultz, P. G. (1999) "Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code". *PNAS United States* 96:4780-4785. Aunque la absorción se analiza fácilmente con diversos ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que sean sensibles a las vías de absorción celular es proporcionar vías biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Ya existen muchas vías biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque un procedimiento biosintético para un determinado aminoácido no natural puede no existir en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, en una célula, la invención proporciona dichos procedimientos. Por ejemplo, las vías biosintéticas

- 5 para aminoácidos no naturales se generan opcionalmente en células huésped mediante la adición de nuevas enzimas o la modificación de vías de células huésped existentes. Enzimas nuevas adicionales son opcionalmente enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de *p*-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo del documento WO 2002/085923 titulado "*In vivo incorporation of unnatural amino acids*") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas se pueden 10 introducir en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que comprenda los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una vía enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Los ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente se proporcionan en los siguientes ejemplos. Se encuentran secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en Genbank. También se añaden opcionalmente enzimas 15 desarrolladas artificialmente a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

Hay una variedad de procedimientos disponibles para producir nuevas enzimas para su uso en vías de biosíntesis o para la evolución de las vías existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, incluyendo, pero sin limitación, la desarrollada por Maxygen, Inc. (disponible en Internet en maxygen.com), se usa opcionalmente para desarrollar nuevas enzimas y vías. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994), "Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling",

- 20 *Nature* 370(4):389-391; y, Stemmer, (1994), "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91:10747-10751. De forma similar, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en Internet en genencor.com) se usa opcionalmente para la ingeniería de vías metabólicas, incluyendo, pero sin limitación, el diseño de una vía para crear O-metil-L-tirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye las vías existentes en organismos huésped usando una combinación de genes 25 nuevos, que incluyen, pero sin limitación, los identificados mediante genómica funcional, y evolución y diseño molecular. Diversa Corporation (disponible en Internet en diversa.com) también proporciona tecnología para la exploración rápida de bibliotecas de genes y vías genéticas, incluyendo, pero sin limitación, la creación de nuevas vías.

Por lo general, el aminoácido no natural producido con una vía de biosíntesis modificada por ingeniería genética 30 descrito aquí se produce a una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, incluyendo, pero sin limitación, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que afecte la concentración del resto de aminoácidos o agote los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que 35 comprende los genes usados para producir las enzimas deseadas para una vía específica y se genera un aminoácido no natural, las selecciones *in vivo* se usan opcionalmente para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural para la síntesis de proteínas ribosómicas y el crecimiento celular.

POLIPÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS NO NATURALES

La incorporación de un aminoácido no natural se puede realizar para una variedad de fines, incluyendo, pero sin 40 limitación, cambios en la estructura y/o función de la proteína, cambio de tamaño, acidez, nucleofильidad, enlaces de hidrógeno, hidrofobicidad, accesibilidad de los sitios diana de la proteasa, dirección a una fracción (incluyendo, pero sin limitación, una serie de proteínas), adición de una molécula biológicamente activa, unión de un polímero, unión de un radionúclido,

- 45 modulación de la semivida en suero, modulación de la penetración tisular (por ejemplo, tumores), modulación del transporte activo, modulación de la especificidad o distribución de tejidos, células u órganos, modulación de la inmunogenicidad, modulación de la resistencia a la proteasa, etc. Las proteínas que incluyen un aminoácido no natural pueden tener propiedades catalíticas o biofísicas mejoradas o incluso completamente nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente mediante la inclusión de un aminoácido no natural 50 a una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, capacidad catalítica, semivida (incluyendo, pero sin limitación, semivida en suero), capacidad de reaccionar con otras moléculas, incluyendo, pero sin limitación, covalente o no covalentemente, y similares. Las composiciones que incluyen proteínas que incluyen al menos un aminoácido no natural son útiles para, incluyendo, pero sin limitación, nuevas terapias, diagnósticos, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos) e incluyen, pero sin limitación, el estudio de la estructura y la función de la proteína. Véase, por ejemplo Dougherty, (2000) "Unnatural Aminoacids as Probes of Protein Structure and Function", *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

- 55 Una composición de la invención puede incluir al menos una proteína con al menos uno, incluyendo pero sin limitación, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o al menos diez o más aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales pueden ser iguales o diferentes, incluyendo, pero sin limitación, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. Una composición de la invención 60 incluye una proteína con al menos uno, pero menos que todos, de un determinado aminoácido presente en la proteína que está sustituido con el aminoácido no natural. Para una proteína dada con más de un aminoácido no natural, los

5 aminoácidos no naturales pueden ser idénticos o diferentes (incluyendo, pero sin limitación, la proteína puede incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales, o puede incluir dos de los mismos aminoácidos no naturales). Para una proteína dada con más de dos aminoácidos no naturales, los aminoácidos no naturales pueden ser iguales, diferentes o una combinación de un aminoácido no natural múltiple del mismo tipo con al menos un aminoácido no natural diferente.

Las proteínas o los polipéptidos de interés con al menos un aminoácido no natural son una característica de la invención. La invención también incluye polipéptidos o proteínas con al menos un aminoácido no natural producido usando las composiciones y los procedimientos descritos aquí. Un excipiente (incluyendo, pero sin limitación, un excipiente farmacéuticamente aceptable) también puede estar presente con la proteína.

10 Al producir proteínas o polipéptidos de interés con al menos un aminoácido no natural en células eucariotas, las proteínas o los polipéptidos normalmente incluirán modificaciones eucariotas posteriores a la traducción. En ciertas realizaciones, una proteína incluye al menos un aminoácido no natural y al menos una modificación posterior a la traducción que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, donde la modificación posterior a la traducción no se realiza mediante una célula procariota. Por ejemplo, la modificación posterior a la traducción incluye, pero sin limitación, 15 acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión a glucolípidos, glicosilación y similares. En un aspecto, la modificación posterior a la traducción incluye la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitación, (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc) a una asparagina mediante un enlace GlcNAc-asparagina. Véase la Tabla 1, que enumera algunos ejemplos de oligosacáridos enlazados a N de proteínas eucariotas (también pueden estar presentes restos adicionales, que no se muestran). En otro aspecto, la modificación posterior a la traducción incluye la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitación, Gal-GalNAc, 20 Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina mediante un enlace GalNAc-serina o GalNAc-treonina, o un enlace GlcNAc-serina o GlcNAc-treonina.

Tipo	Estructura de la base
Rico en manosa	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1\text{-}6 \\  \searrow \\  \text{Man}\alpha 1\text{-}3 \quad \text{Man}\alpha 1\text{-}6 \\  \swarrow \quad \searrow \\  \text{Man}\alpha 1\text{-}3 \quad \text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}  \end{array}  $
Híbrido	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1\text{-}6 \\  \searrow \\  \text{GlcNAc}\beta 1\text{-}2 \quad \text{Man}\alpha 1\text{-}3 \\  \text{---} \quad \swarrow \\  \text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}  \end{array}  $
Complejo	$  \begin{array}{c}  \text{GlcNAc}\beta 1\text{-}2 \quad \text{Man}\alpha 1\text{-}6 \\  \text{---} \quad \searrow \\  \text{GlcNAc}\beta 1\text{-}2 \quad \text{Man}\alpha 1\text{-}3 \\  \text{---} \quad \swarrow \\  \text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}  \end{array}  $
Xilosa	$  \begin{array}{c}  \text{Man}\alpha 1\text{-}6 \\  \searrow \\  \text{Xyl}\beta 1\text{-}2 \quad \text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}  \end{array}  $

25 En otro aspecto más, la modificación posterior a la traducción incluye el procesamiento proteolítico de precursores (incluyendo, pero sin limitación, precursor de calcitonina, precursor de péptido relacionado con el gen de calcitonina, hormona prepropatoidea, preproinsulina, proinsulina, prepropiometacortisolina, propiomelanocortina y similares), ensamblaje en una proteína de múltiples subunidades o ensamblaje macromolecular, traducción a otro sitio en la célula (incluyendo, pero sin limitación, orgánulos, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, el núcleo, los lisosomas, los peroxisomas, las mitocondrias, los cloroplastos, las vacuolas, etc., o a través de la vía secretora). En ciertas realizaciones, la proteína comprende una secuencia de secreción o localización, un marcador de epítopo, 30 un marcador de FLAG, un marcador de polihistidina, una fusión de GST o similares.

Una ventaja de un aminoácido no natural es que presenta fracciones químicas adicionales que pueden usarse para

agregar moléculas adicionales. Estas modificaciones pueden realizarse *in vivo* en una célula eucariota o no eucariota, o *in vitro*. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la modificación posterior a la traducción es a través del aminoácido no natural. Por ejemplo, la modificación posterior a la traducción puede ser a través de una reacción nucleófila-electrófila. La mayoría de las reacciones usadas actualmente para la modificación selectiva de proteínas implican la formación de enlaces covalentes entre las parejas de reacción nucleófilas y electrófilas, incluyendo, pero sin limitación, la reacción de  $\alpha$ -halocetonas con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en estos casos está determinada por el número y la accesibilidad de los restos nucleófilos en la proteína. En las proteínas de la invención, pueden usarse otras reacciones más selectivas tales como la reacción de un cetoaminoácido no natural con hidrazidas o compuestos aminooxi, *in vitro* e *in vivo*. Véase, por ejemplo, Cornish, y col., (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151; Mahal, y col., (1997) *Science*, 276:1125-1128; Wang, y col., (2001) *Science* 292:498-500; Chin, y col., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027; Chin, y col., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:11020-11024; Wang, y col., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:56-61; Zhang, y col., (2003) *Biochemistry*, 42:6735-6746; y, Chin, y col., (2003) *Science*, 301:964-7'. Esto permite el marcaje selectivo de prácticamente cualquier proteína con una multitud de reactivos incluyendo fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos y moléculas citotóxicas. Véase también la patente de EE.UU. n.º 6.927.042 titulada "Glycoprotein synthesis". Las modificaciones posteriores a la traducción, incluyendo, pero sin limitación, a través de un aminoácido azido, también se pueden realizar a través de la ligadura de Staudinger (incluyendo, pero sin limitación, con reactivos de triarilfosfina). Véase, por ejemplo, Kiick y col., (2002) "Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation", *PNAS* 99:19-24.

Se describe otro procedimiento altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas, que implica la incorporación genética de aminoácidos no naturales, incluyendo, pero sin limitación, la introducción de una fracción azida o alquinilo en proteínas en respuesta a un codón selector. Estas cadenas laterales de aminoácidos pueden modificarse entonces, incluyendo, pero sin limitación, una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen (véase, por ejemplo, Padwa, A. en "Comprehensive Organic Synthesis", Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, pág. 1069-1109; y, Huisgen, R. en "1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry", (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, pág. 1-176) con, incluyendo, pero sin limitación, derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Debido a que este procedimiento implica una cicloadición en lugar de sustitución nucleófila, las proteínas pueden modificarse con una selectividad sumamente alta. Esta reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con excelente regioselectividad (1,4>1,5) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu (I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornoe, y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y Rostovtsev y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Otro método que se puede usar es el intercambio de ligandos en un compuesto bisarsénico con un motivo de tetracisteína; véase, por ejemplo Griffin, y col., (1998) *Science* 281:269-272.

Una molécula que puede añadirse a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un derivado de azida o alquinilo. Las moléculas incluyen, pero sin limitación, colorantes, fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos, polímeros (incluyendo, pero sin limitación, derivados de polietilenglicol), agentes fotorreticulantes, compuestos citotóxicos, marcadores de afinidad, derivados de biotina, resinas, perlas, un segunda proteína o polipéptido (o más), polinucleótido/s (incluyendo, pero sin limitación, ADN, ARN, etc.), quelantes de metales, cofactores, ácidos grasos, hidratos de carbono y similares. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo alquinilo, incluyendo, pero sin limitación, *p*-propargiloxifenilalanina, o un grupo azido, incluyendo, pero sin limitación, *p*-azido-fenilalanina, respectivamente.

#### **V. Generación *in vivo* de polipéptidos bG-CSF que comprenden aminoácidos no codificados de forma natural**

Los polipéptidos bG-CSF de la invención se pueden generar *in vivo* usando ARNt modificado y ARNt sintetasas para añadir o sustituir aminoácidos que no estén codificados en sistemas de origen natural.

Los procedimientos de generación de ARNt y ARNt sintetasas que usan aminoácidos que no están codificados en sistemas naturales se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 7.045.337 y 7.083.970. Estos procedimientos implican la generación de una maquinaria de traducción que funciona independientemente de las sintetasas y los ARNt endógenos al sistema de traducción (y, por lo tanto, a veces se denominan "ortogonales"). Por lo general, el sistema de traducción comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (ORS). Por lo general, el O-RS aminoacila preferentemente el O-ARNt con al menos un aminoácido no natural en el sistema de traducción y el O-ARNt reconoce al menos un codón selector que no es reconocido por otros ARNt en el sistema. Por lo tanto, el sistema de traducción inserta el aminoácido no codificado de forma natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, "sustituyendo" un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

En la técnica, se ha descrito una amplia variedad de ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas para insertar determinados aminoácidos sintéticos en polipéptidos. Por ejemplo, se describen O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas cetoespécificas en Wang, L., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 100:56-61 (2003) y Zhang, Z. y col., *Biochem.* 42(22):6735-6746 (2003). Ejemplos de O-RS, o partes de los mismos, están codificados por secuencias de polinucleótidos e incluyen secuencias de aminoácidos desveladas en las patentes de EE.UU. n.º 7.045.337 y 7.083.970. También se describen moléculas de O-ARNt correspondientes para su uso con los O-RS en las patentes de EE.UU. n.º 7.045.337 y 7.083.970. Se describen ejemplos adicionales de pares de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa en los documentos WO 2005/007870, WO 2005/007624; y WO 2005/019415.

- Un ejemplo de un sistema O-ARNt específico de azida/aminoacil-ARNt sintetasa se describe en Chin, J. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002). Los ejemplos de secuencias de O-RS para *p*-azido-L-Phe incluyen, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 14-16 y 29-32 y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 46-48 y 61-64 según lo desvelado en la patente de EE.UU. n.º 7.083.970. Los ejemplos de secuencias de O-ARNt incluyen, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1-3 como se divulga en la patente de EE.UU. n.º 7.083.970. Otros ejemplos de pares de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específicos para determinados aminoácidos no codificados de forma natural se describen en la patente de EE.UU. n.º 7.045.337. O-RS y O-ARNt que incorporan aminoácidos que contienen ceto y azida en *S. cerevisiae* se describen en Chin, J. W., y col., *Science* 301:964-967 (2003).
- 5 Se ha informado de otros varios pares ortogonales. Se han descrito sistemas de glutaminilo (véase, por ejemplo, Liu, D. R. y Schultz, P. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 96:4780-4785), aspartilo (véase, por ejemplo, Pastmak, M., y col., (2000) *Helv. Chim. Acta* 83:2277-2286) y tirosilo (véase, por ejemplo, Ohno, S., y col., (1998) *J. Biochem.* (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; y, Kowal, A. K., y col., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 98:2268-2273) derivados de ARNt y sintetasas de *S. cerevisiae* para la posible incorporación de aminoácidos no naturales en sistemas de *E. coli*.
- 10 15 Se han descrito sistemas derivados de glutaminil (véase, por ejemplo, Kowal, A. K., y col., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 98:2268-2273) y tirosil (véase, por ejemplo, Edwards, H. y Schimmel, P. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:1633-1641) sintetasas de *E. coli* para su uso en *S. cerevisiae*. El sistema de tirosilo de *E. coli* se ha usado para la incorporación de 3-yodo-L-tirosina *in vivo*, en células de mamífero. Véase, Sakamoto, K., y col., (2002) *Nucleic Acid Res.* 30:4692-4699.
- 20 25 El uso de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas implica la selección de un codón específico que codifica el aminoácido no codificado de forma natural. Aunque puede usarse cualquier codón, en general, es deseable seleccionar un codón que rara vez o nunca se use en la célula en la que se expresa la O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa. Por ejemplo, los codones a modo de ejemplo incluyen codones sin sentido tales como codones de parada (ámbar, ocre y ópalos), codones de cuatro o más bases y otros codones naturales de tres bases que se usan rara vez o no se usan.
- 30 35 40 45 50 Los codón/es selector/es específico/s pueden introducirse en posiciones apropiadas en la secuencia que codifica el polinucleótido de bG-CSF usando procedimientos de mutagénesis conocidos en la técnica (incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis específica de sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción, etc.).
- Los procedimientos de generación de componentes de la maquinaria biosintética de proteínas, tales como O-RS, O-ARNt y pares ortogonales de O-ARNt/O-RS que pueden usarse para incorporar un aminoácido no codificado de forma natural se describen en Wang, L., y col., *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. y col., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Los procedimientos y las composiciones para la incorporación *in vivo* de aminoácidos no codificados de forma natural se describen en la patente de EE.UU. n.º 7.045.337. Los procedimientos de selección de un par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en el sistema de traducción *in vivo* de un organismo también se describen en las patentes de EE.UU. n.º 7.045.337 y 7.083.970. La Publicación PCT n.º WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins" describe pares ortogonales de RS y ARNt para la incorporación de cetoaminoácidos. La Publicación PCT n.º WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" describe pares ortogonales de RS y ARNt para la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en células huésped eucariotas.
- 55 Los procedimientos de producción de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa recombinante ortogonal (O-RS) comprenden: (a) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un primer organismo, incluyendo, pero sin limitación, un organismo procariota tal como *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares, o un organismo eucariota; (b) seleccionar (y/o explorar) la biblioteca de RS (opcionalmente, RS mutantes) en busca de miembros que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, proporcionando así una combinación de RS activas (opcionalmente mutantes); y/o (c) seleccionar (opcionalmente a través de selección negativa) la combinación de RS activas (incluyendo, pero sin limitación, RS mutantes) que aminoacilan preferentemente el O-ARNt en ausencia del aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de este modo al menos una O-RS recombinante; en los que la al menos una O-RS recombinante aminoacila preferentemente el O-ARNt con el aminoácido no codificado de forma natural.
- 60 La RS puede ser una RS inactiva. La RS inactiva se puede generar mediante la mutación de una RS activa. Por ejemplo, la RS inactiva puede generarse mutando al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6 o al menos aproximadamente 10 o más aminoácidos a diferentes aminoácidos, incluyendo, pero sin limitación, alanina.
- 65 Se pueden generar bibliotecas de RS mutantes usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, diseño racional basado en la estructura tridimensional proteica de RS, o mutagénesis de nucleótidos de RS en una técnica de diseño aleatorio o racional. Por ejemplo; las RS mutantes pueden generarse por mutaciones específicas de sitio, mutaciones aleatorias, mutaciones de recombinación que generan diversidad, construcciones químicas, diseño racional y mediante otros procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la

técnica.

Esta puede incluir la selección (y/o exploración) de la biblioteca de RS (opcionalmente, RS mutantes) en busca de miembros que sean activos, incluyendo, pero sin limitación, los que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, incluye: introducir un marcador

- 5 de selección o exploración positiva, incluyendo, pero sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos o similares, y la biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células, incluyendo el marcador de selección y/o de exploración positiva al menos un codón selector, incluyendo, pero sin limitación, un codón ámbar, ocre u ópalo; cultivar la pluralidad de células en presencia de un agente de selección; identificar las células que sobrevivan (o muestren una respuesta específica) en presencia del agente de selección y/o de exploración al suprimir al menos un codón selector en el marcador de selección o exploración positiva, proporcionando así un subconjunto de células seleccionadas positivamente que contiene la combinación de RS activas (opcionalmente mutantes). Opcionalmente, la concentración del agente de selección y/o exploración puede variarse.
- 10

El marcador de selección positiva puede ser un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y el codón selector es un codón de parada ámbar del gen CAT. Opcionalmente, el marcador de selección positiva es un gen de β-lactamasa, y el codón selector es un codón de parada ámbar del gen de β-lactamasa. El marcador de exploración positiva puede comprender un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad (incluyendo, pero sin limitación, un marcador de superficie celular).

15 La selección o el exploración negativa de la combinación para las RS activas (opcionalmente mutantes) que preferentemente aminoacilan el O-ARNt en ausencia del aminoácido no codificado de manera natural puede incluir:

- 20 introducir un marcador de selección o exploración negativa con la combinación de RS activas (opcionalmente mutantes) de la selección o exploración positiva en una pluralidad de células de un segundo organismo, comprendiendo el marcador de selección o exploración negativa al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos, incluyendo, pero sin limitación, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)); e identificar las células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio suplementado con el aminoácido no codificado de forma natural y un agente de exploración o selección, pero no logran sobrevivir o mostrar la respuesta específica en un segundo medio no suplementado con el aminoácido no codificado de forma natural y el agente de selección o exploración, proporcionando de ese modo células supervivientes o células exploradas con al menos una O-RS recombinante. Por ejemplo, un protocolo de identificación de CAT actúa opcionalmente como una selección positiva y/o una exploración negativa en la determinación de recombinantes de O-RS apropiadas. Por ejemplo, una combinación de clones se replica opcionalmente en placas de crecimiento que contienen CAT (que comprende al menos un codón selector) con o sin uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. Por lo tanto, se considera que las colonias que crecen exclusivamente en las placas que contienen aminoácidos no codificados de forma natural contienen O-RS recombinante. La concentración del agente de selección (y/o exploración) puede ser variada. En algunos aspectos, el primer y el segundo organismo son diferentes. Por lo tanto, el primer y/o el segundo organismo comprenden opcionalmente: un procariota, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc. Alernativamente el marcador de exploración puede comprender un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en la afinidad.
- 25

30 La exploración o selección (incluyendo, pero sin limitación, la selección negativa) de la combinación para las RS activas (opcionalmente mutantes) puede incluir: aislar la combinación de RS mutantes activas de la etapa de selección positiva (b); introducir un marcador de selección o exploración negativa, en el que el marcador de selección o exploración negativa comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitación, un gen marcador tóxico, incluyendo, pero sin limitación, un gen de ribonucleasa bacteriana que comprende al menos un codón selector), y la combinación de RS activas (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células de un segundo organismo; e identificar células

- 35 que sobrevivan o muestren una respuesta de exploración específica en un primer medio no suplementado con el aminoácido no codificado de forma natural, pero que no sobrevivan ni muestren una respuesta de exploración específica en un segundo medio suplementado con el aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de ese modo células supervivientes o detectadas con al menos una O-RS recombinante, siendo la al menos una O-RS recombinante específica del aminoácido no codificado de forma natural. El al menos un codón selector puede comprender aproximadamente dos o más codones selectores. Tales ejemplos opcionalmente pueden incluir aquellas en las que el al menos un codón selector comprende dos o más codones selectores, y en las que el primer y el segundo organismo son diferentes (incluyendo, pero sin limitación, que cada organismo sea opcional, incluyendo, pero sin limitación, un procariota, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc.). Opcionalmente también se incluyen algunos aspectos incluyen aquellos en los que el marcador de selección negativa comprende un gen de ribonucleasa barnasa (que comprende al menos un codón selector). También se incluyen aquellos en los que el marcador de exploración comprende opcionalmente un marcador de exploración fluorescente o luminiscente, o un marcador de exploración basado en la afinidad. Las detecciones y/o selecciones incluyen opcionalmente la variación de la rigurosidad de la exploración y/o selección.
- 40

45 Los procedimientos de producción de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (O-RS) pueden comprender además: (d) aislar la al menos una O-RS recombinante; (e) generar un segundo conjunto de O-RS (opcionalmente mutada) derivado de al menos una O-RS recombinante; y, (f) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se

obtenga una O-RS mutada que comprenda la capacidad de aminoacilar preferentemente el O-ARNt. Opcionalmente, se repiten las etapas (d)-(f), incluyendo, pero sin limitación, al menos aproximadamente dos veces. El segundo conjunto de O-RS mutada derivado de al menos una O-RS recombinante puede generarse mediante mutagénesis, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis aleatoria, mutagénesis específica de sitio, recombinación o una combinación de las mismas.

La rigurosidad de las etapas de selección/exploración, incluyendo, pero sin limitación, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o la etapa de selección/exploración tanto positiva como negativa (b) y (c), en los procedimientos descritos anteriormente, incluye opcionalmente la variación de la rigurosidad de selección/exploración. La etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de selección/exploración tanto positiva como negativa (b) y (c) puede comprender el uso de un indicador, en la que el indicador se detecta mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o en la que el indicador se detecta mediante luminiscencia. Opcionalmente, el indicador se muestra en una superficie celular, en una presentación en fagos o similar, y se selecciona basándose en la afinidad o actividad catalítica que implica el aminoácido no codificado de forma natural o un análogo. La sintetasa mutada se puede mostrar en una superficie celular, en una presentación en fagos o similar.

Los procedimientos de producción de un ARNt ortogonal recombinante (O-ARNt) incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt, incluyendo, pero sin limitación, un ARNt supresor, de un primer organismo; (b) seleccionar (incluyendo, pero sin limitación, la selección negativa) o explorar la biblioteca en busca de ARNt (opcionalmente mutantes) que sean aminoacilados por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando de este modo una combinación de ARNt (opcionalmente mutantes); y (c) seleccionar o explorar la combinación de ARNt (opcionalmente mutantes) en busca de los miembros que estén aminoacilados por una RS ortogonal introducida (O-RS), proporcionando de este modo al menos un O-ARNt recombinante; en el que el al menos un O-ARNt recombinante reconoce un codón selector y no es reconocido de manera eficaz por la RS del segundo organismo y es preferentemente aminoacilado por la O-RS. El al menos un ARNt puede ser un ARNt supresor y/o comprende un codón de tres bases único de bases naturales y/o no naturales, o es un codón sin sentido, un codón raro, un codón no natural, un codón que comprende al menos 4 bases, un codón ámbar, un codón ocre o un codón de parada de ópalo. El O-ARNt recombinante puede poseer una mejora de la ortogonalidad. Se apreciará que, el O-ARNt se puede importar opcionalmente a un primer organismo de un segundo organismo sin la necesidad de modificación. El primer y segundo organismos pueden ser iguales o diferentes, y se escogen opcionalmente entre los que se incluyen, pero sin limitación, procariotas (incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, etc.), eucariotas, mamíferos, hongos, levaduras, arqueobacterias, eubacterias, plantas, insectos, protistas, etc. Además, el ARNt recombinante está opcionalmente aminoacilado por un aminoácido no codificado de forma natural, en el que el aminoácido no codificado de manera natural se biosintetiza *in vivo*, ya sea de forma natural o mediante manipulación genética. El aminoácido no codificado de forma natural se añade opcionalmente a un medio de crecimiento para al menos el primer o segundo organismo.

La selección (incluyendo, pero sin limitación, la selección negativa) o la exploración de la biblioteca de ARNt (opcionalmente mutantes) que son aminoacilados por una aminoacil-ARNt sintetasa (etapa (b)) puede incluir: introducir un gen marcador tóxico, comprendiendo el gen marcador tóxico al menos uno de los codones selectores (o un gen que conduce a la producción de un agente tóxico o estático, o un gen esencial para el organismo en el que dicho gen marcador comprende al menos un codón selector) y la biblioteca de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; y, seleccionar células supervivientes, en las que las células supervivientes contienen la combinación de ARNt (opcionalmente mutantes) que comprenden al menos un ARNt ortogonal o ARNt no funcional. Por ejemplo, las células supervivientes pueden seleccionarse usando un ensayo de densidad celular de relación de comparación.

El gen marcador tóxico puede incluir dos o más codones selectores. El gen marcador tóxico puede ser un gen de ribonucleasa barnasa, en la que el gen de ribonucleasa barnasa comprende al menos un codón ámbar. Opcionalmente, el gen de ribonucleasa barnasa puede incluir dos o más codones ámbar.

La selección o la exploración de la combinación de ARNt (opcionalmente mutantes) en busca de los miembros que son aminoacilados por una RS ortogonal introducida (O-RS) pueden incluir: introducir un gen marcador de selección o exploración positiva, en el que el gen marcador positivo comprende un gen de resistencia a fármacos (incluyendo, pero sin limitación, el gen de β-lactamasa que comprende al menos uno de los codones selectores, tales como al menos un codón de parada ámbar) o un gen esencial para el organismo, o un gen que conduce a la desintoxicación de un agente tóxico, junto con la O-RS, y la combinación de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; e identificar células supervivientes o exploradas cultivadas en presencia de un agente de selección o exploración, incluyendo, pero sin limitación, un antibiótico, proporcionando de este modo una combinación de células que poseen al menos un ARNt recombinante, siendo el al menos un ARNt recombinante aminoacilado por la O-RS e inserta un aminoácido en un producto de traducción codificado por el gen marcador positivo, en respuesta a al menos un codón selector. Se puede variar la concentración del agente de selección y/o exploración.

Se describen procedimientos de generación de pares de O-ARNt/O-RS específicos pero no están cubiertos por la

invención reivindicada. Los procedimientos incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt de un primer organismo; (b) seleccionar o explorar negativamente la biblioteca en busca de ARNt (opcionalmente mutantes) que sean aminoacilados por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando de este modo una combinación de ARNt (opcionalmente mutantes); y (c) seleccionar o explorar la combinación de ARNt (opcionalmente mutantes) en busca de los miembros que sean aminoacilados por una RS ortogonal (O-RS) introducida, proporcionando de este modo al menos un O-ARNt recombinante. El al menos un O-ARNt recombinante reconoce un codón selector y no es reconocido por la eficacia de la RS del segundo organismo y es preferentemente aminoacilado por la O-RS. El procedimiento también incluye: (d) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un tercer organismo; (b) seleccionar o explorar la biblioteca de RS mutantes en busca de miembros que aminoacilan preferentemente al menos un O-ARNt recombinante en presencia de un aminoácido no codificado de forma natural y un aminoácido natural, proporcionando así una combinación de RS activas (opcionalmente mutantes); y (f) seleccionar o explorar negativamente la combinación de RS activas (opcionalmente mutantes) que aminoacilan preferentemente el al menos un O-ARNt recombinante en ausencia del aminoácido no codificado de forma natural, proporcionando de este modo el al menos un par de O-ARNt/O-RS específico; comprendiendo el al menos un par de O-ARNt/O-RS específico al menos una O-RS recombinante que es específica del aminoácido no codificado de forma natural y el al menos un O-ARNt recombinante. Se incluyen pares específicos de O-ARNt/O-RS producidos mediante los procedimientos. Por ejemplo, el par de O-ARNt/O-RS específico puede incluir, incluyendo, pero sin limitación, un par mutRNATyr-mutTyrRS, tal como un par mutRNATyr-SS12TyrRS, un par mutRNALeu-mutLeuRS, un par mutRNATHrmutThrRS, un par mutRNAGlu-mutGluRS, o similares. Además, dichos procedimientos incluyen aquellos en los que el primer y tercer organismo son iguales (incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*).

Los procedimientos de selección de un par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en un sistema de traducción *in vivo* de un segundo organismo también se describen pero no se cubren por la invención reivindicada. Los procedimientos incluyen: introducir un gen marcador, un ARNt y una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) aislados o derivados de un primer organismo en un primer conjunto de células del segundo organismo; introducir el gen marcador y el ARNt en un conjunto de células duplicadas de un segundo organismo; y seleccionar las células supervivientes del primer conjunto que no sobreviven en el conjunto de células duplicadas o explorar las células que muestran una respuesta de exploración específica que no da dicha respuesta en el conjunto de células duplicadas, cultivándose el primer conjunto y el conjunto de células duplicadas en presencia de un agente de selección o exploración, comprendiendo las células supervivientes o exploradas el par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en el sistema de traducción *in vivo* del segundo organismo. La comparación y selección o exploración puede incluir un ensayo de complementación *in vivo*. La concentración del agente de selección o exploración puede variarse.

Los organismos descritos aquí comprenden una variedad de organismos y una variedad de combinaciones. Por ejemplo, el primer y el segundo organismo de los procedimientos descritos aquí pueden ser iguales o diferentes. Los organismos son opcionalmente un organismo procariota, incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* o similares. Como alternativa, los organismos comprenden opcionalmente un organismo eucariota, incluyendo, pero sin limitación, plantas (incluyendo, pero sin limitación, plantas complejas tales como monocotiledóneas o dicotiledóneas), algas, protistas, hongos (incluyendo, pero sin limitación, levadura, etc.), animales (incluyendo, pero sin limitación, mamíferos, insectos, artrópodos, etc.) o similares. El segundo organismo puede ser un organismo procariota, incluyendo, pero sin limitación, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* o similares. Como alternativa, el segundo organismo puede ser un organismo eucariota, incluyendo, pero sin limitación, una levadura, una célula animal, una célula vegetal, un hongo, una célula de mamífero o similares. El primer y el segundo organismo pueden ser diferentes.

#### **VI. Ubicación de los aminoácidos no naturales en polipéptidos bG-CSF**

La presente invención contempla la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en polipéptidos bG-CSF. Se pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una determinada posición que no interrumpa la actividad del polipéptido. Esto puede realizarse haciendo sustituciones "conservativas", incluyendo, pero sin limitación, la sustitución de aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófobos, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos hidrófilos y/o la inserción de aminoácidos no naturales en una ubicación que no se requiera para la actividad.

Se puede emplear una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural dentro del polipéptido bG-CSF. Es evidente para los expertos en la materia que cualquier posición de la cadena polipeptídica es adecuada para seleccionarla para incorporar un aminoácido no codificado de forma natural, y la selección puede basarse en un diseño racional o en una selección aleatoria para cualquier o ningún fin deseado en particular. La selección de los sitios deseados puede ser para producir una molécula de bG-CSF que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo, pero sin limitación, agonistas, superagonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores de unión a receptores, moduladores de la actividad del receptor, formación de dímeros o multímeros, ningún cambio en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipulando de cualquier propiedad física o química del polipéptido tal como solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, las ubicaciones en el polipéptido requerido

para la actividad biológica de los polipéptidos bG-CSF pueden identificarse usando un análisis de mutación puntual, rastreo con alanina, mutagénesis de saturación y exploración de la actividad biológica, o procedimientos de rastreo de homólogos conocidos en la técnica. Se pueden usar otros procedimientos para identificar restos para la modificación de los polipéptidos bG-CSF que incluyen, pero sin limitación, perfiles de secuencias, selecciones de bibliotecas de rotámeros, potenciales de pares de restos y diseño racional usando la tecnología de diseño de proteínas Automation®. (Véanse las patentes de EE.UU. n.º 6,188.965; 6.269.312; 6.403.312; WO98/47089). Los restos que son fundamentales para la bioactividad de bG-CSF, los restos que participan en la estabilidad farmacéutica, los epítopos de anticuerpos o los restos de unión a receptores pueden estar mutados. Las patentes de EE.UU. n.º 5.580.723; 5,834,250; 6.013.478; 6.428.954; y 6.451.561 describen procedimientos para el análisis sistemático de la estructura y la función de polipéptidos tales como bG-CSF identificando dominios activos que influyen en la actividad del polipéptido con una sustancia diana. Los estudios de mutagénesis de rastreo de alanina de G-CSF se describen en Reidhaar-Olson J. F. y col., *Biochemistry* (1996) 16 de julio; 35(28):9034-41, Young D. C. y col. *Protein Sci.* (1997) junio; 6(6):1228-36 y Layton y col. (1997) *JBC* 272(47):29735-29741. Los restos distintos de los identificados como fundamentales para la actividad biológica mediante mutagénesis de rastreo de alanina u homólogos pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Como alternativa, los sitios identificados como fundamentales para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones en serie en cada posición de la cadena polipeptídica con un aminoácido no codificado de forma natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Es evidente para los expertos habituales en la materia que cualquier medio, técnica o procedimiento de selección de una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso.

La estructura y la actividad de los mutantes de los polipéptidos bG-CSF que contienen eliminaciones también se pueden examinar para determinar las regiones de la proteína que probablemente sean tolerantes a la sustitución con un aminoácido no codificado de forma natural. De manera similar, se pueden usar la digestión con proteasa y los anticuerpos monoclonales para identificar regiones de bG-CSF que sean responsables de unirse a su receptor. Layton y col. (2001) *JBC* 276 (39) 36779-36787 describe estudios de anticuerpos con hG-CSF y su receptor. Una vez que se han eliminado los restos que probablemente sean intolerantes a la sustitución con aminoácidos no codificados de forma natural, se puede examinar el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes. Los modelos se pueden generar a partir de las estructuras cristalinas tridimensionales de otros miembros de la familia de CSF y receptores de CSF. El Banco de Datos de Proteínas (PDB, disponible en Internet en rcsb.org) es una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos. Se pueden crear modelos que investiguen la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no se dispone de datos estructurales tridimensionales. Las estructuras cristalográficas de rayos X y de RMN de hG-CSF están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas con los ID de PDB: 1CD9, 1PGR, 1RHG, 1GNC, así como en la patente de EE.UU. n.º 5.581.476; y 5.790.421. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden identificar fácilmente las posiciones de aminoácidos que se pueden sustituir con aminoácidos no codificados de forma natural.

Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales situados en una región de la proteína que no interrumpa la estructura del polipéptido.

Los restos ilustrativos de incorporación de un aminoácido no codificado de forma natural pueden ser aquellos que están excluidos de las posibles regiones de unión al receptor, pueden estar total o parcialmente expuestos a disolventes, tienen interacciones mínimas o inexistentes con enlaces de hidrógeno con restos cercanos, pueden estar mínimamente expuestos a los restos reactivos cercanos, pueden estar en una o más de las caras expuestas, pueden ser un sitio o sitios que se yuxtaponen a un segundo bG-CSF u otra molécula o fragmento del mismo, pueden estar en regiones que son altamente flexibles o estructuralmente rígidas, según lo predicho por la estructura tridimensional, secundaria, terciaria o cuaternaria de bG-CSF, unidos o no a su receptor, o acoplados o no acoplados a otra molécula biológicamente activa, o pueden modular la configuración del propio bG-CSF o un dímero o multímero que comprenda uno o más bG-CSF, alterando la flexibilidad o rigidez de la estructura completa según se deseé.

Un experto habitual en la materia reconoce que dicho análisis de bG-CSF permite la determinación de qué restos de aminoácidos están expuestos a la superficie en comparación con los restos de aminoácidos que están enterrados dentro de la estructura terciaria de la proteína.

Se incorpora un aminoácido no codificado de forma natural en la posición 133 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende la adición o eliminación de uno o más aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no naturales se incorporan en una secuencia líder o señal que es N o C terminal de SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF.

El polipéptido bG-CSF de la presente invención tiene una para-acetilfenilalanina incorporada en la posición 133 de SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en SEQ ID NO: 2.

El aminoácido no codificado de forma natural de la posición 133 está enlazado a un polímero hidrosoluble (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no natural del

extremo N o C de la secuencia señal o líder con respecto a SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF está enlazado a un polímero hidrosoluble.

Un examen de la estructura cristalina de bG-CSF o de uno o varios miembros de la familia de bG-CSF y su interacción con el receptor de G-CSF puede indicar qué restos de aminoácidos tienen cadenas laterales que son total o parcialmente accesibles para el disolvente. La cadena lateral de un aminoácido no codificado de forma natural en estas posiciones puede apuntar lejos de la superficie de la proteína y salir al disolvente.

5 Se puede sustituir una amplia variedad de aminoácidos no codificados de forma natural o incorporarse en una posición dada de un polipéptido bG-CSF. En general, se selecciona un determinado aminoácido no codificado de forma natural para su incorporación basándose en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido bG-CSF u otro miembro de la familia de G-CSF con su receptor, una preferencia por sustituciones conservativas (es decir, aminoácidos a base de arilo no codificados de forma natural, tales como *p*-acetilfenilalanina u O-propargiltirosina que sustituyen con Phe, Tyr o Trp) y la química de conjugación específica que se desea introducir en el polipéptido bG-CSF (por ejemplo, la introducción de 4-azidofenilalanina si se desea efectuar una cicloadición [3+2] de Huisgen con un polímero hidrosoluble portador de una fracción alquino o una formación de enlace amida con un polímero hidrosoluble que porta un arilester que, a su vez, incorpora una fracción fosfina).

10 El procedimiento puede incluir además incorporar a la proteína el aminoácido no natural, en el que el aminoácido no natural comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto la proteína con una molécula (incluyendo, pero sin limitación, hidroxialquilalmidón (HAS), hidroxietilalmidón (HES), un marcador, un colorante, un polímero, un polímero hidrosoluble, un derivado de polietilenglicol, un agente fotorreticulante, un radionucleido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido, o un análogo polipeptídico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metales, un cofactor, un ácido graso, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero hidrosoluble, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radioactiva, un nuevo grupo funcional, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotourizada, una fracción excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un aminoácido, una fracción tóxica, una fracción marcada isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforecente, un grupo quimioluminiscente, un grupo denso de electrones, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable que comprenda un segundo grupo reactivo. El primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo para unir la molécula al aminoácido no natural a través de una cicloadición [3+2]. En una realización, el primer grupo reactivo es una fracción alquinilo o azido y el segundo grupo reactivo es una fracción azido o alquinilo. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es la fracción alquinilo (incluyendo, pero sin limitación, el aminoácido no natural *p*-propargiloxifenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción azido. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es la fracción azido (incluyendo, pero sin limitación, en el aminoácido no natural *p*-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquinilo.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 En algunos casos, la/s sustitución/es de aminoácidos no codificados de forma natural se combinarán con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido bG-CSF para afectar a otros rasgos biológicos del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo, pero sin limitación, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido bG-CSF o aumentar la afinidad del polipéptido bG-CSF por su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden potenciar la actividad biológica del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo, pero sin limitación, cuando se expresa en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido bG-CSF. En algunas realizaciones, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido bG-CSF después de la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los sitios se seleccionan para la sustitución con un aminoácido codificado de forma natural o no codificado de forma natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que dé lugar al aumento de la solubilidad polipeptídica después de la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad por un receptor, proteínas de unión o ligando asociado, modula la transducción de señales después de unirse a un receptor, modula la semivida en circulación, modula la liberación o la bioprotección, facilita la purificación, o mejora o altera una determinada vía de administración. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden una adición, sustitución o eliminación que aumenta la afinidad de la variante de bG-CSF por su receptor. De manera similar, los polipéptidos bG-CSF pueden comprender secuencias de escisión químicas o enzimáticas, secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (incluyendo pero sin limitación, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en la afinidad (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, poly-His, GST, etc.) o moléculas enlazadas (incluyendo, pero sin limitación, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitación, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación o activación de profármacos, reducción del tamaño de bG-CSF u otros rasgos del

polipéptido.

En algunos casos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos están sustituidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. En algunos casos, el polipéptido bG-CSF incluye además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de uno o más aminoácidos no codificados de forma natural para los aminoácidos de origen natural.

5 El uno o más residuos codificados de forma no natural pueden estar unidos a uno o más PEG lineales o ramificados de menor peso molecular, mejorando así la afinidad de unión y la semivida en suero comparable en relación con la especie unida a un solo PEG de mayor peso molecular.

En algunas realizaciones, hasta dos de los siguientes restos de bG-CSF están sustituidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural.

## 10 **VII. Expresión de no eucariotas y eucariotas**

Para la obtención de una expresión de alto nivel de un polinucleótido bG-CSF clonado, normalmente se subclonian polinucleótidos que codifican un polipéptido bG-CSF descrito aquí en un vector de expresión que contiene un promotor potente para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción y, si se trata de un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son conocidos por los expertos habituales en la materia, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., Ausubel y col.

20 Los sistemas de expresión bacterianos para expresar los polipéptidos bG-CSF de la invención están disponibles en, incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella* (Palva y col., *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach y col., *Nature* 302:543-545 (1983)). Los kits para dichos sistemas de expresión están disponibles en el mercado. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras y células de insectos son conocidos por los expertos en la materia y también se encuentran disponibles en el mercado. En los casos en que se usan ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas (descritos anteriormente) para expresar los polipéptidos bG-CSF de la invención, las células huésped para la expresión se seleccionan en función de su capacidad para usar los componentes ortogonales. Las células huésped ilustrativas incluyen bacterias Gram-positivas (incluyendo, pero sin limitación, *B. brevis*, *B. subtilis* o *Streptomyces*) y bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), así como levadura y otras células eucariotas. Las células que comprenden pares de O-ARNt/O-RS se pueden usar como se describe en el presente documento.

30 Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota descrita aquí proporciona la capacidad de sintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. La composición puede incluir opcionalmente, pero sin limitación, al menos 10 microgramos, al menos 50 microgramos, al menos 75 microgramos, al menos 100 microgramos, al menos 200 microgramos, al menos 250 microgramos, al menos 500 microgramos, al menos 1 milígramo, al menos 10 miligramos, al menos 100 miligramos, al menos un gramo o más de la proteína que comprende un aminoácido no natural o una cantidad que se puede obtener con métodos de producción de proteínas 35 *in vivo* (los detalles sobre la producción de proteínas recombinantes y la purificación se proporcionan en el presente documento). La proteína está opcionalmente presente en la composición a una concentración de, incluyendo, pero sin limitación, al menos 10 microgramos de proteína por litro, al menos 50 microgramos de proteína por litro, al menos 75 microgramos de proteína por litro, al menos 100 microgramos de proteína por litro, al menos 200 microgramos de proteína por litro, al menos 250 microgramos de proteína por litro, al menos 500 microgramos de proteína por litro, al menos 1 milígramo de proteína por litro, o al menos 10 miligramos de proteína por litro o más, en, incluyendo, pero sin limitación, un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (incluyendo, pero sin limitación, en un volumen de, incluyendo, pero sin limitación, en cualquier lugar de aproximadamente 1 nl a 40 aproximadamente 100 l o más).

45 Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota descrita aquí proporciona la capacidad de biosintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. Por ejemplo, se pueden producir proteínas que comprenden un aminoácido no natural a una concentración de, incluyendo, pero sin limitación, al menos 10 µg/litro, al menos 50 µg/litro, al menos 75 µg/litro, al menos 100 µg/litro, al menos 200 µg/litro, al menos 250 µg/litro, o al menos 500 µg/litro, al menos 1 mg/litro, al menos 2 mg/litro, al menos 3 mg/litro, al menos 4 mg/litro, al menos 5 mg/litro, al menos 6 mg/litro, al menos 7 mg/litro, al menos 8 mg/litro, al menos 9 mg/litro, al menos 10 mg/litro, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/litro, 1 g/litro, 5 g/litro, 10 g/litro o más de una proteína en un extracto celular, lisado celular, medio de cultivo, un tampón y/o similares.

55 Hay una serie de vectores adecuados para la expresión de bG-CSF que se encuentran disponibles en el mercado. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, pero sin limitación, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Dichos vectores incluyen pCDNA3.1(+)\Hg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE.UU.) y pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., EE.UU.). Se pueden usar plásmidos bacterianos tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pBR322, pET3a y pET12a, plásmidos de rango de huéspedes más amplio, tales como RP4, ADN de fagos, por ejemplo, los numerosos derivados del fago lambda, por ejemplo, NM989 y otros fagos de ADN, tales como fagos de M13 y de ADN monocatenario filamentosos. El plásmido 2 $\mu$  y sus derivados, el vector POT1 (patente de EE.UU. n.º 4.931.373), el

vector pJSO37 descrito en (Okkels, *Ann. New York Acad. Sci.* 782, 202-207, 1996) y pPICZ A, B o C (Invitrogen) se pueden usar con células huésped de levadura. Para las células de insectos, los vectores incluyen, pero sin limitación, pVL941, pBG311 (Cate y col., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells", *Cell*, 45, pág. 685-698 (1986), pBluebac 4.5 y pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido bG-CSF también puede incluir o no una secuencia que codifica un péptido señal. El péptido señal está presente cuando el polipéptido se va a secretar a partir de las células en las que se expresa. Dicho péptido señal puede ser cualquier secuencia. El péptido señal puede ser procariota o eucariota. Coloma, M (1992) *J. Imm. Methods* 152:89-104) describen un péptido señal para su uso en células de mamífero (péptido señal de cadena ligera kappa de Ig murina). Otros péptidos señal incluyen, pero sin limitación, el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* (patente de EE.UU. n.º 4.870.008), el péptido señal de la amilasa salival de ratón (O. Hagenbuchle y col., *Nature* 289, 1981, pág. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (L. A. Valls y col., *Cell* 48, 1987, pp. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (documento WO 87/02670) y el péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani y col., *Yeast* 6, 1990, pág. 127-137).

Los expertos en la materia conocen ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas. Dichas células huésped pueden ser células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, CHO-K1; ATCC CCL-61), células de mono verde (COS) (por ejemplo, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (por ejemplo, NS/O), estirpes celulares de riñón de bebé de hámster (BHK) (por ejemplo, ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10) y células humanas (por ejemplo, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células vegetales en cultivo de tejidos. Estas estirpes celulares y otras están disponibles en depósitos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Para proporcionar una glicosilación mejorada del polipéptido bG-CSF, se puede modificar una célula huésped de mamífero para expresar sialil transferasa, por ejemplo, 1,6-sialiltransferasa, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.047.335.

Los procedimientos de introducción de ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposoma, vectores víricos y los procedimientos de transfección descritos por Life Technologies Ltd, Paisley, RU, usando Lipofectamin 2000 y Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EE. UU. usando FuGENE 6. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica, y están descritos por Ausbel y col. (eds.), 1996, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, EE.UU. El cultivo de células de mamífero se puede realizar de acuerdo con procedimientos establecidos, por ejemplo, como se divulga en ("Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols", editado por Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., EE.UU. y Harrison Mass. y Rae IF, "General Techniques of Cell Culture", Cambridge University Press 1997).

#### I. Sistemas de expresión, cultivo y aislamiento

Los polipéptidos bG-CSF pueden expresarse en cualquier número de sistemas de expresión adecuados incluyendo, por ejemplo, levadura, células de insecto, células de mamífero y bacterias. A continuación, se proporciona una descripción de sistemas de expresión ilustrativos.

Levadura. Como se usa en el presente documento, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras capaces de expresar un gen que codifica un polipéptido bG-CSF. Dichas levaduras incluyen, pero sin limitación, levaduras ascospórogenas (*Endomycetales*), levaduras basidiospórogenas y levaduras que pertenecen al grupo de hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Las levaduras ascospórogenas se dividen en dos familias, *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. Esta última se compone de cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoideae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* y *Saccharomycoideae* (por ejemplo, géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidiospórogenas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* y *Filobasidiella*. Las levaduras que pertenecen al grupo *Fungi Imperfecti* (*Blastomycetes*) se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, géneros *Sporobolomyces* y *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, género *Candida*).

Son de particular interés las especies de los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenlia*, *Torulopsis* y *Candida*, incluyendo, pero sin limitación, *P. pastoris*, *P. guillermondi*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *C. albicans*, *C. maltosa* y *H. polymorpha*.

La selección de levadura adecuada para la expresión de polipéptidos bG-CSF es competencia de un experto en la materia. Al seleccionar los huéspedes de levadura para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que muestran tener, por ejemplo, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, buena capacidad de secreción, buena producción de proteína soluble y robustez general. En general, las levaduras están disponibles en una variedad de fuentes incluyendo, pero sin limitación, el Centro de Reserva Genética de Levadura, el Departamento de Biofísica y Física Médica de la Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

La expresión "huésped de levadura" o "célula huésped de levadura" incluye levadura que se puede usar, o se ha

usado, como receptor de vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula huésped de levadura original que ha recibido los vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento genómico o de ADN total al progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que es suficientemente similar a la original que se va a caracterizar por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido bG-CSF, se incluye en la progenie prevista por la presente definición.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, incluyendo replicones extracromosómicos o vectores integradores, para la transformación en muchos huéspedes de levadura. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para *S. cerevisiae* (Sikorski y col., GENETICS (1989) 122:19; Ito y col., J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU. (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz y col., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *H. polymorpha* (Gleeson y col., J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp y col., MOL. GENETICS Y GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das y col., J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt y col., J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg y col., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); *P. guillermondii* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *P. pastoris* (patentes de EE.UU. n.º 5.324.639; 4.929.555; y 4.837.148; Cregg y col., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y col., NATURE (1982) 300:706); y *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance y col., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn y col., GENE (1983) 26:205-221; y Yelton y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU. (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesiae* (documento EP 0 244 234); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357).

Las secuencias de control para vectores de levadura son conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, regiones promotoras de genes tales como alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP 0 284 044); enolasa; glucoquinasa; glucosa-6-fosfato isomerasa; gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH); hexoquinasa; fosfofructoquinasa; 3-fosfoglicerato mutasa; y piruvato quinasa (PyK) (documento EP 0 329 203). El gen de la levadura PHO5, que codifica la fosfatasa ácida, también puede proporcionar secuencias promotoras útiles (Miyanohara y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU. (1983) 80:1). Otras secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura pueden incluir los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073); y otras enzimas glicolíticas tales como piruvato descarboxilasa, triosfosfato isomerasa y fosfoglucosa isomerasa (Holland y col., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess y col., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). Los promotores de levadura inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento pueden incluir las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2; isocitocromo C; fosfatasa ácida; metalotioneína; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno; y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen además en el documento EP 0 073 657.

Los potenciadores de levadura también pueden usarse con promotores de levadura. Además, los promotores sintéticos también pueden funcionar como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de activación de cadena arriba (UAS) de un promotor de levadura se pueden unir con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH enlazada a la región de activación de la transcripción GAP. Véanse las patentes de EE.UU. n.º 4.880.734 y 4.876.197. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PHO5, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glicolítica tal como GAP o PyK. Véase el documento EP 0 164 556. Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de origen natural de no levadura que tengan la capacidad de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción.

Otros elementos de control que pueden comprender parte de los vectores de expresión de levadura incluyen terminadores, por ejemplo, de GAPDH o los genes de enolasa (Holland y col., J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385). Además, el origen de la replicación del origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para la levadura. Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen trp1 presente en el plásmido de levadura. Véase Tschumper y col., GENE (1980) 10:157; Kingsman y col., GENE (1979) 7:141. El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos portadores del gen Leu2.

Los expertos en la materia conocen procedimientos de introducción de ADN exógeno en huéspedes de levadura, y normalmente incluyen, pero sin limitación, la transformación de esferoplastos o de células huésped de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Por ejemplo, la transformación de levadura se puede llevar a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Hsiao y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU. (1979) 76:3829 y Van Solingen y col., J. BACT. (1977) 130:946. Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos de introducción de ADN en células, tales como mediante inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplastos, como se describe, en general, en SAMBROOK Y COL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Las células huésped de levadura pueden luego cultivarse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Otros procedimientos para expresar proteínas heterólogas en células huésped de levadura son conocidos por los expertos en la materia. Véase, en general, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20020055169, las patentes de EE.UU. n.º 6.361.969; 6.312.923; 6.183.985; 6.083.723; 6.017.731; 5.674.706; 5.629.203; 5.602.034; y 5.089.398; las patentes reexaminadas de EE.UU. n.º RE37.343 y RE35.749; las solicitudes de patente publicadas PCT WO 5 99/07862; WO 98/37208; y WO 98/26080; las solicitudes de patente europeas EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; y EP 0 164 556. Véase también Gellissen y col., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos y col., YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7.

10 Las cepas huésped de levadura pueden cultivarse en fermentadores durante la etapa de amplificación usando procedimientos de fermentación discontinua de alimentación convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de fermentación pueden adaptarse para tener en cuenta las diferencias en la vía de utilización del carbono de un huésped de levadura particular o el modo de control de la expresión. Por ejemplo, la fermentación de un huésped de levadura *Saccharomyces* puede requerir una alimentación de glucosa única, fuente de nitrógeno complejo (por ejemplo, hidrolizados de caseína) y suplementación con múltiples vitaminas. Por el contrario, la levadura metiltrófica *P. pastoris* puede requerir la alimentación de glicerol, metanol y minerales traza, pero solo sales simples de amonio (nitrógeno) para un crecimiento y una expresión óptimos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.324.639; Elliott y col., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; y Fieschko y col., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113.

20 Tales procedimientos de fermentación, sin embargo, pueden tener ciertas características comunes independientes de la cepa huésped de levadura empleada. Por ejemplo, se puede añadir un nutriente limitante del crecimiento, normalmente carbono, al fermentador durante la fase de amplificación para permitir el crecimiento máximo. Además, los procedimientos de fermentación, en general, emplean un medio de fermentación diseñado para contener cantidades adecuadas de carbono, nitrógeno, sales basales, fósforo y otros nutrientes menores (vitaminas, minerales y sales, etc.). Los ejemplos de medios de fermentación adecuados para su uso con *Pichia* se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.324.639 y 5.231.178.

25 **Células de insecto infectadas con baculovirus.** La expresión "huésped de insecto" o "célula huésped de insecto" incluye un insecto que se puede usar, o se ha usado, como receptor de vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula huésped de insecto original que se ha transferido. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento genómico o de ADN total al progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que es suficientemente similar a la original que se va a caracterizar por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido bG-CSF, se incluye en la progenie prevista por la presente definición.

35 La selección de células de insecto adecuadas para la expresión de polipéptidos bG-CSF es conocida por los expertos en la materia. Hay varias especies de insectos que están bien descritas en la técnica y están disponibles en el mercado, incluyendo *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Al seleccionar huéspedes de insectos para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que muestran, entre otras, una buena capacidad de secreción, una baja actividad proteolítica y una robustez general. En general, hay insectos disponibles en una variedad de fuentes incluyendo, incluyendo, pero sin limitación, el Centro de Reserva Genética de insectos, el Departamento de Biofísica y Física Médica de la Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

40 En general, los componentes de un sistema de expresión de insecto infectado con baculovirus incluyen un vector de transferencia, habitualmente un plásmido bacteriano, que contiene tanto un fragmento del genoma de baculovirus, como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen heterólogo que se vaya a expresar; un baculovirus de tipo natural con secuencias homólogas al fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huésped de insecto apropiadas y medios de crecimiento. Los materiales, procedimientos y técnicas usados en la construcción de vectores, transfección de células, selección de placas, cultivo de células en cultivo, y similares son conocidos en la técnica, y hay manuales disponibles que describen estas técnicas.

45 Tras la inserción del gen heterólogo en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico de tipo natural se transfectan en una célula huésped de insecto en la que el vector y el genoma vírico se recombinan. El virus recombinante empaquetado se expresa, y las placas recombinantes se identifican y purifican. Los materiales y procedimientos para sistemas de expresión de células de baculovirus/insectos están disponibles en el mercado en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Estas técnicas son conocidas en general por los expertos en la materia y se describen completamente en SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN No. 1555 (1987). Véase también, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL Y COL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING Y POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); y O'REILLY Y COL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

50 De hecho, la producción de diversas proteínas heterólogas que usan sistemas de expresión de células de baculovirus/insecto es conocida por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º

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; 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.

Los vectores que son útiles en sistemas de expresión de células de baculovirus/insecto son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, vectores de expresión y transferencia de insectos derivados del baculovirus virus de la poliedrosis nuclear de Autographacalifornica (AcNPV), que es un vector de expresión vírico independiente del auxiliar. Los vectores de expresión víricos derivados de este sistema normalmente usan el potente promotor del gen de polihedrina vírica para dirigir la expresión de genes heterólogos. Véase, en general, O'Reilly Y COL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Antes de insertar el gen foráneo en el genoma de baculovirus, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia codificante de interés y secuencia de terminación de la transcripción, se ensamblan normalmente en una construcción de transposición intermedia (vector de transferencia). Las construcciones de transposición intermedias a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento cromosómico adicional (por ejemplo, plásmidos) capaz del mantenimiento estable en un huésped tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, lo que le permitirá mantenerse en un huésped adecuado para la clonación y la amplificación. Más concretamente, el plásmido puede contener la señal de poliadenilación de la polihedrina (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) y un gen procariota de resistencia a la ampicilina (amp) y el origen de replicación para selección y la propagación en *E. coli*.

Un vector de transferencia comúnmente usado para introducir genes foráneos en AcNPV es pAc373. Se han diseñado también muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, pVL985, que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI de 32 pares de bases cadena abajo de ATT. Véase Luckow y Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Otros vectores disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Tras la inserción del gen heterólogo, se transfecstan conjuntamente el vector de transferencia y el genoma baculoviral de tipo natural en un huésped de célula de insecto. Los procedimientos de introducción de ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus de baculovirus son conocidos en el técnica. Véase SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN n.º 1555 (1987); Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow y Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de polihedrina, mediante recombinación de cruce doble homóloga; la inserción también puede ser en un sitio de enzima de restricción diseñado en el gen de baculovirus deseado. Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11 (4): 91.

La transfección se puede realizar por electroporación. Véase TROTTER Y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Como alternativa, se pueden usar liposomas para transfectar las células de insecto con el vector de expresión recombinante y el baculovirus. Véase, por ejemplo, Liebman y col., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves y col., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura y col., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22):13570; Schmidt y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Sifert y col., NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS Y COL., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin y col., NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost y col., GENE (1997) 190:139; Jakobsson y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley y col., J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk y col., J. VIROL. (1994) 68(2):766; y Peng y col., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Los liposomas disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, Cellfектin® y Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Además, se puede usar la transfección con fosfato de calcio. Véase TROTTER Y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; y Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.

Los vectores de expresión de baculovirus habitualmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de baculovirus también puede tener un segundo dominio denominado potenciador, que, si está presente, en general, es distal al gen estructural. Además, la expresión puede ser regulada o constitutiva.

Los genes estructurales, abundantemente transcritos en los últimos tiempos en el ciclo de infección, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína polihédrica vírica (FRIESEN ET AL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR

BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); documento EP 0 127 839 y 0 155 476) y el gen que codifica la proteína p10 (Vlak y col., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765).

El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta en un baculovirus recombinante infeccioso y las placas desarrolladas posteriormente se pueden purificar mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia.

5 Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección en varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros, *Aedes aegypti* (ATCC n.º CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC n.º CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC n.º 1963), *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Véase Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell y col., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. Véase, en general, Fraser y col., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Más concretamente, las estirpes celulares usadas para sistemas de vectores de expresión de baculovirus comúnmente incluyen, pero sin limitación, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC n.º CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., n.º de cat. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*) y High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*).

10 15 Las células y los medios de cultivo se encuentran disponibles en el mercado tanto para la expresión directa como de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/expresión, y la tecnología de cultivo celular es conocida en general por los expertos en la materia.

20 25 Las técnicas de expresión de *E. Coli*, de especies de *Pseudomonas* y de otras de bacterias procariotas son conocidas por los expertos en la materia. Hay una amplia variedad de vectores disponibles para su uso en huéspedes bacterianos. Los vectores pueden ser de copia única o vectores multicopia bajos o altos. Los vectores pueden servir para la clonación y/o la expresión. En vista de la amplia literatura sobre vectores, la disponibilidad comercial de muchos vectores, e incluso de manuales que describen vectores y sus mapas y características de restricción, no se requiere un análisis extenso en el presente documento. Como es bien sabido, los vectores normalmente implican marcadores que permiten la selección, cuyos marcadores pueden proporcionar resistencia al agente citotóxico, prototrofía o inmunidad. Con frecuencia, hay una pluralidad de marcadores que proporcionan diferentes características.

30 35 Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio denominado operador, que puede solaparse con un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), ya que una proteína represora del gen puede unirse al operador y de ese modo inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede producirse en ausencia de elementos reguladores negativos tales como el operador. Además, la regulación positiva se puede lograr mediante una secuencia de unión a la proteína activadora del gen, que, si está presente, en general, es próxima (5') a la secuencia de unión de la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora del gen es la proteína activadora del catabolito (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Por lo tanto, la expresión regulada puede ser positiva o negativa, aumentando o reduciendo la transcripción.

40 45 50 55 60 Las secuencias que codifican las enzimas de la vía metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col., NATURE (1977) 198:1056] y maltosa. Los ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (trp) [Goeddel y col., Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton y col., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; la patente de EE.UU. n.º 4.738.921; publicaciones EP n.º 036 776 y 121 775]. El sistema promotor de la β-galactosidasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En el interferón 3 (Ed. I. Gresser)], los sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake y col., NATURE (1981) 292:128] y T5 [patente de EE.UU. n.º 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Los procedimientos pueden utilizar promotores potentes, tales como el promotor T7 para inducir polipéptidos bG-CSF a niveles elevados. Los expertos en la materia conocen ejemplos de dichos vectores, e incluyen la serie pET29 de Novagen, y los vectores pPOP descritos en el documento WO99/05297. Dichos sistemas de expresión pueden producir altos niveles de polipéptidos bG-CSF en el huésped sin comprometer la viabilidad de la célula huésped o los parámetros de crecimiento. pET19 (Novagen) es otro vector conocido en la técnica.

Además, los promotores sintéticos que no ocurren en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago se pueden unir con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [patente de EE.UU. n.º 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac compuesto tanto por el promotor trp como por las secuencias del operón lac, que está regulado por el represor lac [Amann y col., GENE (1983) 25:167; de Boer y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores naturales de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano también se puede acoplar con una ARN polimerasa

compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariotas. El sistema de ARN polimerasa/promotor del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier y col., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor y col., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor de bacteriófago y una región de operador de *E. coli* (publicación EP. N.º 267 851).

5 Además de una secuencia promotora funcional, un sitio de unión al ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes foráneos en procariotas. En *E. coli*, el sitio de unión del ribosoma se denomina secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situados de 3 a 11 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación [Shine y col., NATURE (1975) 254:34]. se cree que la secuencia SD potencia la unión del ARNm al ribosoma mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y el ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation y Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariotas con un sitio débil de unión a ribosomas [Sambrook y col. "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

15 La expresión "huésped bacteriano" o "célula huésped bacteriana" incluye una bacteria que se puede usar, o se ha usado, como receptor de vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula huésped de insecto original que se ha transferido. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento genómico o de ADN total al progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que es suficientemente similar a la original que se va a caracterizar por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido bG-CSF, se incluye en la progenie prevista por la presente definición.

20 La selección de bacterias huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos bG-CSF es conocida por los expertos en la materia. Al seleccionar huéspedes bacterianos para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que tienen, entre otras, una buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, una baja actividad proteolítica y una robustez general. En general, hay huéspedes bacterianos disponibles en una variedad de fuentes incluyendo, incluyendo, pero sin limitación, el Centro de Reserva Genética de bacterias, el Departamento de Biofísica y Física Médica de la Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA). La fermentación industrial/farmacéutica generalmente usa cepas K derivadas de bacterias (por ejemplo, W3110) o cepas B derivadas de bacterias (por ejemplo, BL21). Estas cepas son particularmente útiles porque sus parámetros 25 de crecimiento son sumamente conocidos y robustos. Además, estas cepas no son patógenas, lo que es importante desde el punto de vista comercial por razones de seguridad y ambientales. Otros ejemplos de huéspedes de *E. coli* adecuados incluyen, pero sin limitación, cepas de BL21, DH10B o derivados de los mismos. El huésped de *E. coli* puede ser una cepa negativa en proteasa incluyendo, pero sin limitación, OMP- y LON-. La cepa de la célula huésped 30 puede ser una especie de *Pseudomonas*, incluyendo, pero sin limitación, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Se sabe que biovar 1 de *Pseudomonas fluorescens*, cepa designada MB101, es útil para la producción recombinante y está disponible para procesos de producción de proteínas terapéuticas. Los 35 ejemplos de un sistema de expresión de *Pseudomonas* incluyen el sistema disponible de The Dow Chemical Company como cepa huésped (Midland, MI disponible en Internet en dow.com).

40 Una vez que se ha establecido una cepa de célula huésped recombinante (es decir, la construcción de expresión se ha introducido en la célula huésped y se aislan células huésped con la construcción de expresión adecuada), la cepa de la célula huésped recombinante se cultiva en condiciones apropiadas para la producción de polipéptidos bG-CSF. Como será evidente para los expertos en la materia, el procedimiento de cultivo de la cepa de células huésped recombinantes dependerá de la naturaleza de la construcción de expresión utilizada y de la identidad de la célula huésped. Las cepas huésped recombinantes normalmente se cultivan usando procedimientos que son conocidos por 45 los expertos en la materia. Las células huésped recombinantes se cultivan normalmente en medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas y, opcionalmente, que contienen vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y otros suplementos de cultivo proteínico conocidos por los expertos en la materia. Los medios líquidos para el cultivo de células huésped pueden contener opcionalmente antibióticos o 50 antifúngicos para prevenir el crecimiento de microorganismos y/o compuestos no deseados incluyendo, pero sin limitación, antibióticos para seleccionar las células huésped que contienen el vector de expresión.

Las células huésped recombinantes pueden cultivarse en formatos discontinuos o continuos, bien con cosecha de células (en caso de que el polipéptido bG-CSF se acumula intracelularmente) o cosecha del sobrenadante de cultivo en formatos discontinuo o continuo. Para la producción en células huésped procariotas, se prefieren el cultivo discontinuo y la cosecha celular.

55 Los polipéptidos bG-CSF de la presente invención normalmente se purifican después de la expresión en sistemas recombinantes. El polipéptido bG-CSF puede purificarse a partir de células huésped o medio de cultivo mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las patentes de EE.UU. nº 5.849.883 y WO 89/10932 describen la clonación de b-GCSF y sus análogos en células huésped y procedimientos de aislamiento y purificación. Los polipéptidos bG-CSF producidos en células huésped bacterianas pueden ser poco solubles o insolubles (en forma de 60 cuerpos de inclusión). En una realización de la presente invención, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos fácilmente en el polipéptido bG-CSF que se seleccionan con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína producida

de forma recombinante utilizando los procedimientos desvelados en el presente documento así como los conocidos en la técnica. En el caso de la proteína insoluble, la proteína puede recogerse de lisados de células huésped mediante centrifugación y pueden complementarse con la homogeneización de las células. En el caso de una proteína escasamente soluble, se pueden añadir compuestos incluyendo, pero sin limitación, polietilenimina (PEI) para inducir la precipitación de proteína parcialmente soluble. La proteína precipitada se puede recoger convenientemente mediante centrifugación. Las células huésped recombinantes se pueden interrumpir u homogenizar para liberar los cuerpos de inclusión dentro de las células usando una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La interrupción u homogenización de la célula huésped puede realizarse usando técnicas bien conocidas incluyendo, pero sin limitación, la interrupción celular enzimática, sonicación, homogenización Dounce o interrupción de la liberación a alta presión. Se puede usar la técnica de liberación a alta presión para romper las células huésped de *E. coli* para liberar los cuerpos de inclusión de los polipéptidos bG-CSF. Cuando se manipulan cuerpos de inclusión del polipéptido bG-CSF, puede ser ventajoso minimizar el tiempo de homogenización en las repeticiones con el fin de maximizar el rendimiento de los cuerpos de inclusión sin pérdida debida a factores tales como solubilización, cizalla mecánica o proteólisis.

15 El polipéptido bG-CSF insoluble o precipitado se puede disolver a continuación usando cualquiera de una serie de agentes de solubilización adecuados conocidos en la técnica. El polipéptido bG-CSF puede disolverse con urea o clorhidrato de guanidina. El volumen del polipéptido bG-CSF disuelto debe minimizarse de modo que puedan producirse grandes lotes usando tamaños de lotes manejables convenientemente. Este factor puede ser significativo en un entorno comercial a gran escala en el que el huésped recombinante pueda crecer en lotes que tengan un volumen de miles de litros. Además, cuando se fabrica polipéptido bG-CSF en un entorno comercial a gran escala, en particular, para usos farmacéuticos en seres humanos, se debe evitar, si es posible, evitar productos químicos agresivos que puedan dañar la maquinaria y el recipiente, o el propio producto proteico. Se ha demostrado en el procedimiento divulgado que el agente desnaturalizante más suave que es la urea puede usarse para disolver los cuerpos de inclusión del polipéptido bG-CSF en lugar del agente desnaturalizante más fuerte que es el del clorhidrato de guanidina. El uso de urea reduce significativamente el riesgo de daño al equipo de acero inoxidable usado en el procedimiento de fabricación y purificación del polipéptido bG-CSF mientras que disuelve eficazmente los cuerpos de inclusión del polipéptido bG-CSF.

30 En el caso de la proteína bG-CSF soluble, la bG-CSF se puede secretar en el espacio periplásmico o en el medio de cultivo. Además, bG-CSF soluble puede estar presente en el citoplasma de las células huésped. Se puede desear concentrar bG-CSF soluble antes de realizar las etapas de purificación. Se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para concentrar la bG-CSF soluble a partir de, por ejemplo, lisados celulares o medio de cultivo. Además, se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para romper las células huésped y liberar bG-CSF soluble del citoplasma o espacio periplásmico de las células huésped.

35 Cuando el polipéptido bG-CSF se produce como una proteína de fusión, la secuencia de fusión puede eliminarse. La eliminación de una secuencia de fusión se realizar mediante escisión enzimática o química. La eliminación enzimática de las secuencias de fusión puede realizarse usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La elección de la enzima para la eliminación de la secuencia de fusión se determinará por la identidad de la fusión, y las condiciones de reacción se especificarán mediante la elección de la enzima, como será evidente para un experto habitual en la materia. La escisión química se puede realizar usando reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, bromuro de cianógeno, proteasa de TEV y otros reactivos. El polipéptido bG-CSF escindido se puede purificar a partir de la secuencia de fusión escindida mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos estarán determinados por la identidad y las propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido bG-CSF, como será evidente para un experto en la materia. Los procedimientos para la purificación pueden incluir, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de intercambio iónico o diálsis, o cualquier combinación de los mismos.

40 El polipéptido bG-CSF también se puede purificar para eliminar el ADN de la solución de proteína. El ADN puede eliminarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, tal como precipitación o cromatografía de intercambio iónico, pero puede eliminarse mediante precipitación con un agente precipitante de ácido nucleico, tal como, pero sin limitación, sulfato de protamina. El polipéptido bG-CSF se puede separar del ADN precipitado usando procedimientos convencionales bien conocidos incluyendo, pero sin limitación, centrifugación o filtración. La eliminación de moléculas de ácido nucleico del huésped es un factor importante en un entorno en el que el polipéptido bG-CSF se va a usar para tratar animales o seres humanos, y los procedimientos descritos aquí reducen el ADN de la célula huésped a niveles farmacéuticamente aceptables.

45 También se pueden usar procedimientos de fermentación a pequeña escala o a gran escala en la expresión de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, fermentadores, matraces agitados, biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, sistemas de cultivo en botella giratoria y sistemas de biorreactor de tanque agitado. Cada uno de estos procedimientos se puede realizar en un procedimiento discontinuo, alimentado por lotes o continuo.

50 Los polipéptidos bG-CSF de la invención, en general, se pueden recuperar usando procedimientos convencionales en la técnica. Por ejemplo, se puede centrifugar o filtrar el medio de cultivo o lisado celular para retirar los restos celulares. El sobrenadante puede concentrarse o diluirse a un volumen deseado o diafiltrarse en un tampón adecuado para acondicionar la preparación para una purificación adicional. La purificación adicional del polipéptido bG-CSF de la

presente invención incluye separar las formas desamidadas y recortadas de la variante del polipéptido bG-CSF de la forma intacta.

Se puede emplear cualquiera de los siguientes procedimientos a modo de ejemplo para la purificación de los polipéptidos bG-CSF de la invención: cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo, pero sin limitación, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo, pero sin limitación SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de metal-quelato; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatoenfoque; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo pero sin limitación, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (incluyendo, pero sin limitación, la precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

Las proteínas descritas aquí, incluyendo, pero sin limitación, proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, péptidos que comprenden aminoácidos no naturales, anticuerpos frente a proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, parejas de unión para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, etc., pueden purificarse parcial o sustancialmente hasta la homogeneidad, de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos y usados por los expertos en la materia. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención pueden recuperarse y purificarse mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido o base, cromatografía en columna, columna de afinidad cromatografía, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de lectina, electroforesis en gel y similares. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteínas, como se deseé, para preparar proteínas maduras plegadas correctamente. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de afinidad u otros procedimientos adecuados se pueden emplear en etapas de purificación final en las que se deseé una alta pureza. Los anticuerpos creados contra aminoácidos no naturales (o proteínas o péptidos que comprenden aminoácidos no naturales) se pueden usar como reactivos de purificación, incluyendo, pero sin limitación, purificación basada en afinidad de proteínas o péptidos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se deseé, los polipéptidos se usan opcionalmente para una amplia variedad de utilidades, incluyendo, pero sin limitación, como componentes de ensayo, agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico, reactivos de investigación y/o inmunógenos para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención se pueden obtener administrando los polipéptidos o fragmentos portadores de epítopo, o células a un animal, preferentemente un animal no humano, usando protocolos habituales. Un experto habitual en la materia podría generar anticuerpos usando una variedad de técnicas conocidas. Además, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden emplear para aislar o identificar clones que expresen el polipéptido o para purificar los polipéptidos.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden usarse como vacunas. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero con un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir anticuerpos y/o respuesta inmune de linfocitos T, incluyendo, para ejemplo, linfocitos T productores de citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho animal de la enfermedad, ya sea que esa enfermedad ya esté establecida dentro del individuo o no. También se puede inducir una respuesta inmunológica en un mamífero mediante un procedimiento que comprende administrar un polipéptido de la presente invención a través de un vector que dirija la expresión del polinucleótido y codifique el polipéptido *in vivo* para inducir dicha respuesta inmunológica para producir anticuerpo para proteger dicho animal de las enfermedades de la invención. Una forma de administrar el vector es acelerándolo en las células deseadas como un revestimiento sobre partículas o de otro modo. Dicho vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, un ácido nucleico modificado o un híbrido de ADN/ARN. Para usarlo como una vacuna, normalmente se proporcionará un polipéptido o un vector de ácido nucleico como una formulación (composición) de vacuna. La formulación puede comprender además un vehículo adecuado. Dado que un polipéptido puede descomponerse en el estómago, se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación que son conocidos por los expertos en la materia. La dosis dependerá de la actividad específica de la vacuna, y puede determinarse fácilmente mediante experimentación rutinaria.

Además de otras referencias indicadas en el presente documento, los expertos en la materia conocen una variedad de procedimientos de purificación/plegamiento de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, los expuestos en 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 y col. (1996) *Protein Methods*, 2<sup>a</sup> edición Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) "The Protein Protocols Handbook", Humana Press, NJ, Harris y Angal, (1990) "Protein Purification Applications: A Practical Approach", IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal, "Protein Purification Methods: A Practical Approach", IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) "Protein Purification: Principles and Practice", 3<sup>a</sup> edición, Springer Verlag, NY; Janson

y Ryden, (1998) "Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications", Segunda edición, Wiley-VCH, NY; y Walker (1998), "Protein Protocols on CDROM", Humana Press, NJ; y las referencias citadas en los mismos.

Una ventaja de producir una proteína o un polipéptido de interés con un aminoácido no natural en una célula huésped eucariota o una célula huésped no eucariota es que normalmente las proteínas o los polipéptidos se plegarán en sus configuraciones nativas. Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención, los expertos en la materia reconocerán que, después de la síntesis, expresión y/o purificación, las proteínas o los péptidos pueden poseer una configuración diferente de las configuraciones deseadas de los polipéptidos relevantes. La proteína o el polipéptido expresado,

5 opcionalmente, se puede desnaturalizar y luego se vuelve a naturalizar. Esto se realiza usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la adición de una chaperonina a la proteína o al polipéptido de interés, la disolución de las proteínas en un agente caotrópico tal como HCl de guanidina, la utilización de proteína disulfuro isomerasa, etc.

En general, en ocasiones es deseable desnaturalizar y reducir los polipéptidos expresados, y luego hacer que los polipéptidos vuelvan a plegarse en la configuración preferida. Por ejemplo, se puede añadir guanidina, urea, DTT, DTE y/o una chaperonina a un producto de traducción de interés. Los expertos en la materia conocen procedimientos para 10 reducir, desnaturalizar y volver a naturalizar proteínas (véanse, las referencias anteriores, y Debinski, y col. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; y Buchner, y col., (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270). Debinski, y col., por ejemplo, describen la desnaturalización y la reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. Las proteínas se pueden volver a plegar en un tampón redox que contiene, incluyendo, pero sin limitación, glutatión oxidado y L-arginina. Los reactivos de replegamiento pueden hacerse fluir o 15 ponerse de otra manera en contacto con uno o más polipéptidos u otro producto de expresión, o viceversa.

En el caso de la producción procariótica del polipéptido bG-CSF, el polipéptido bG-CSF así producido puede estar mal 20 plegado y, por lo tanto, no tener o tener una actividad biológica reducida. La bioactividad de la proteína puede restablecerse mediante "replegamiento". En general, el polipéptido bG-CSF mal plegado se repliega mediante disolución (cuando el polipéptido bG-CSF también es insoluble), desplegamiento y reducción de la cadena polipeptídica usando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (por ejemplo, urea y/o guanidina) y un agente 25 reductor capaz de reducir enlaces disulfuro (por ejemplo, ditiotreitol, DTT o 2-mercaptoetanol, 2-ME). A una concentración moderada de caótropo, se añade un agente oxidante (por ejemplo, oxígeno, cistina o cistamina), lo que permite la reformación de enlaces disulfuro. El polipéptido bG-CSF puede replegarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n.º 4.511.502, 4.511.503 30 y 4.512.922. El polipéptido bG-CSF también se puede plegar junto con otras proteínas para formar heterodímeros o heteromultímeros.

Después del replegamiento, el bG-CSF puede purificarse más. La purificación de bG-CSF puede realizarse usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cromatografía de interacción hidrofoba, 35 cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, cromatografía de afinidad y similares o cualquier combinación de las mismos. La purificación adicional también puede incluir una etapa de secado o precipitación de la proteína purificada.

Después de la purificación, bG-CSF puede intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, diafiltración y 40 diálisis. El bG-CSF que se proporciona como una sola proteína purificada puede someterse a agregación y precipitación.

El bG-CSF purificado puede tener al menos un 90 % de pureza (medida por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, RP-HPLC o electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida, SDS-PAGE) o al menos 45 95 % de pureza, o al menos 98 % de pureza, o al menos 99 % o más de pureza. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza del bG-CSF, el bG-CSF es suficientemente puro para usarlo como un producto farmacéutico o para un procesamiento adicional, tal como la conjugación con un polímero hidrosoluble tal como PEG.

Ciertas moléculas de bG-CSF se pueden usar como agentes terapéuticos en ausencia de otros principios activos o proteínas (distintos de excipientes, vehículos y estabilizantes, albúmina de suero y similares), o pueden complejarse con otra proteína o un polímero.

Procedimientos de purificación general. Se puede realizar cualquiera de una variedad de etapas de aislamiento en el 50 lisado celular, extracto, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células huésped, citoplasma de las células huésped u otro material, que comprenden polipéptido bG-CSF o en cualquier mezcla de polipéptidos bG-CSF resultante de cualquier etapa de aislamiento incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC"), HPLC de fase inversa ("RP-HPLC), adsorción de lecho expandido, o cualquier combinación y/o repetición de las mismas y en cualquier orden apropiado.

El equipo y otros materiales necesarios usados en la realización de las técnicas descritas en el presente documento están disponibles en el mercado. Hay bombas, colectores de fracciones, monitores, grabadoras y sistemas completos disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y

Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ). Los materiales cromatográficos incluyendo, pero sin limitación, materiales de matriz de intercambio, medios y tampones también están disponibles en dichas compañías.

La equilibración y otras etapas de los procedimientos de cromatografía en columna descritos en el presente documento, tales como lavado y elución, se pueden realizar más rápidamente usando un equipo especializado tal como una bomba. Las bombas disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, la bomba HILOAD® Pump P-50, la bomba peristáltica P-1, la bomba P-901 y la bomba P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Los ejemplos de colectores de fracciones incluyen el Colector de fracciones RediFrac, los colectores de fracciones FRAC-100 y FRAC-200 y el colector de fracciones SUPERFRAC® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). También se dispone de mezcladores para formar gradientes de pH y concentración lineal. Los mezcladores disponibles en el mercado incluyen el mezclador de gradiente GM-1 y los mezcladores en línea (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El procedimiento cromatográfico se puede controlar usando cualquier monitor disponible en el mercado. Dichos monitores se pueden usar para recopilar información como UV, pH y conductividad. Los ejemplos de detectores incluyen Monitor UV-1, UVICORD® S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 y monitor de conductividad (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). De hecho, hay sistemas completos disponibles en el mercado, incluyendo los diversos sistemas AKTA® de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Por ejemplo, el polipéptido bG-CSF puede reducirse y desnaturalizarse desnaturizando primero el polipéptido bG-CSF purificado resultante en urea, seguido de la dilución en tampón TRIS que contiene un agente reductor (tal como DTT) a un pH adecuado. El polipéptido bG-CSF se puede desnaturalizar en urea en un intervalo de concentraciones de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 9 M, seguido de la dilución en tampón TRIS a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. A continuación, se puede incubar la mezcla de replegamiento de la presente realización. La mezcla de replegamiento se puede incubar a temperatura ambiente durante cuatro a veinticuatro horas. La mezcla de polipéptido bG-CSF reducida y desnaturizada puede aislarse o purificarse adicionalmente.

Como se establece en el presente documento, el pH de la primera mezcla de polipéptido bG-CSF puede ajustarse antes de realizar cualquier etapa de aislamiento posterior. Además, la primera mezcla de polipéptido bG-CSF o cualquier mezcla posterior de la misma se puede concentrar usando técnicas conocidas en la materia. Además, el tampón de elución que comprende la primera mezcla de polipéptidos bG-CSF o cualquier mezcla posterior de la misma puede intercambiarse por un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Cromatografía de intercambio iónico. Como una etapa adicional, opcional, se puede realizar una chromatografía de intercambio iónico en la primera mezcla de polipéptido bG-CSF. Véase, en general, ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (n.º de cat. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Las columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado incluyen las columnas HITRAP®, HIPREP® y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Dichas columnas utilizan intercambiadores de aniones fuertes tales como Q SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance y Q SEPHAROSE® XL; intercambiadores de cationes fuertes tales como SP SEPHAROSE® High Performance, SP SEPHAROSE® Fast Flow y SP SEPHAROSE® XL; intercambiadores de aniones débiles tales como DEAE SEPHAROSE® Fast Flow; e intercambiadores de cationes débiles tales como CM SEPHAROSE® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La chromatografía en columna de intercambio aniónico o catiónico puede realizarse en el polipéptido bG-CSF en cualquier etapa del procedimiento de purificación para aislar el polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado. La etapa de chromatografía de intercambio catiónico puede realizarse usando cualquier matriz de intercambio catiónico adecuada. Las matrices de intercambio catiónico útiles incluyen, pero sin limitación, materiales de matriz de intercambio catiónico fibrosos, porosos, no porosos, microgranulados, con perlas o reticulados. Dichos materiales de matriz de intercambio catiónico incluyen, pero sin limitación, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice, poliéster o compuestos de cualquiera de los anteriores.

La matriz de intercambio catiónico puede ser cualquier intercambiador de cationes adecuado incluyendo intercambiadores de cationes fuertes y débiles. Los intercambiadores de cationes fuertes pueden permanecer ionizados en un amplio intervalo de pH y, por lo tanto, pueden ser capaces de unirse a bG-CSF en un amplio intervalo de pH. Los intercambiadores de cationes débiles, sin embargo, pueden perder la ionización en función del pH. Por ejemplo, un intercambiador de cationes débiles puede perder carga cuando el pH cae por debajo de aproximadamente pH 4 o pH 5. Los intercambiadores de cationes fuertes adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos funcionales cargados tales como sulfopropilo (SP), sulfonato de metilo (S) o sulfoetilo (SE). La matriz de intercambio de cationes puede ser un intercambiador de cationes fuertes que tenga preferentemente un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,0. Como alternativa, el intercambiador de cationes fuertes puede tener un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,5. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador de cationes fuertes que tenga un pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 3,0. Como alternativa, la matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador de cationes fuertes que tenga preferentemente un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador de cationes fuertes que tenga

preferentemente un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,5. Como alternativa, el intercambiador de cationes fuertes puede tener un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 12,0.

5 Antes de cargar el bG-CSF, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse, por ejemplo, usando varios volúmenes de columna de un ácido diluido, débil, por ejemplo, cuatro volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3. Despues del equilibrado, puede añadirse bG-CSF y la columna puede lavarse una o varias veces, antes de la elución de bG-CSF sustancialmente purificado, usando tambien una solución de ácido débil tal como una solución de ácido acético débil o de ácido fosfórico débil. Por ejemplo, se pueden usar aproximadamente 2-4 volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3, para lavar la columna. Se pueden usar también lavados adicionales usando, por ejemplo, 2-4 volúmenes de columna de acetato sódico 0,05 M, pH 5,5 o acetato sódico 0,05 M mezclado con cloruro sódico 0,1 M, pH 5,5. Como alternativa, usando procedimientos conocidos en la técnica, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse usando varios volúmenes de columna de una base débil, diluida.

10 15 Como alternativa, el bG-CSF sustancialmente purificado se puede eluir poniendo en contacto la matriz del intercambiador de cationes con un tampón que tenga un pH o una fuerza iónica suficientemente bajos para desplazar el bG-CSF de la matriz. El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 6,0. Más concretamente, el pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,5, de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 5,0. El tampón de elución puede tener un pH de aproximadamente 3,0. Además, la cantidad de tampón de elución puede variar ampliamente y, en general, estará en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 volúmenes de columna.

20 25 Después de la adsorción del polipéptido bG-CSF a la matriz del intercambiador de cationes, se puede eluir el polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado poniendo en contacto la matriz con un tampón que tenga un pH o una fuerza iónica suficientemente altos para desplazar el polipéptido bG-CSF de la matriz. Los tampones adecuados para su uso en la elución a pH alto de polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado pueden incluir, pero sin limitación, tampones de citrato, fosfato, formiato, acetato, HEPES y MES que varían en una concentración de al menos aproximadamente 5 mM a al menos aproximadamente 100 mM.

30 35 Cromatografía en fase inversa. Se puede realizar RP-HPLC para purificar proteínas siguiendo protocolos adecuados que son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson y col., ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier y col., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani y col., J. CHROM. (1986) 359:391-402. Se puede realizar una RP-HPLC en el polipéptido bG-CSF para aislar el polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado. En este sentido, se pueden usar las resinas derivadas de sílice con funcionalidades de alquilo con una amplia variedad de longitudes incluyen, pero sin limitación, resinas de al menos aproximadamente C<sub>3</sub> a al menos aproximadamente C<sub>30</sub>, de al menos aproximadamente C<sub>3</sub> a al menos aproximadamente C<sub>20</sub>, o de al menos aproximadamente C<sub>3</sub> a al menos aproximadamente C<sub>18</sub>. Como alternativa, se puede usar una resina polimérica. Por ejemplo, se puede usar resina Tosohas Amberchrome CG1000sd, que es una resina de polímero de estireno. También se pueden usar resinas ciano o poliméricas con una amplia variedad de longitudes de cadenas de alquilo. Además, la columna de RP-HPLC se puede lavar con un disolvente tal como etanol. La columna Source RP es otro ejemplo de una columna RP-HPLC.

40 45 Puede usarse un tampón de elución adecuado que contenga un agente de emparejamiento de iones y un modificador orgánico tal como metanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo o etanol, para eluir el polipéptido bG-CSF de la columna de RP-HPLC. Los agentes de emparejamiento de iones más comúnmente usados incluyen, pero sin limitación, ácido acético, ácido fórmico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido heptafluorobutírico, trietilamina, tetrametilamonio, tetrabutilamonio y acetato de trietilamonio. La elución puede realizarse usando uno o más gradientes o condiciones isocráticas, prefiriéndose condiciones de gradiente para reducir el tiempo de separación y disminuir el ancho máximo. Otro procedimiento implica el uso de dos gradientes con diferentes intervalos de concentración de disolventes. Los ejemplos de tampones de elución adecuados para su uso en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, soluciones de acetato de amonio y acetonitrilo.

50 55 Técnicas de purificación por cromatografía de interacción hidrófoba La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se puede realizar en el polipéptido bG-CSF. Véase, en general, HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (n.º de cat. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Las matrices HIC adecuadas pueden incluir, pero sin limitación, matrices sustituidas con alquilo o arilo, tales como matrices sustituidas con butilo, hexilo, octilo o fenilo, incluyendo agarosa, agarosa reticulada, sefarosa, celulosa, sílice, dextrano, poliestireno, matrices de poli(metacrilato) y resinas en modo mixto, incluyendo, pero sin limitación, una resina de polietilenoamina o una matriz de poli(metacrilato) sustituida con butilo o fenilo. Las fuentes disponibles en el mercado para la cromatografía en columna de interacción hidrófoba incluyen, pero sin limitación, columnas HITRAP®, HIPREP® y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

60 En resumen, antes de la carga, la columna de HIC puede equilibrarse usando tampones convencionales conocidos por los expertos en la materia, tales como una solución de ácido acético/cloruro de sodio o sulfato de amonio que contiene HEPES. El sulfato de amonio se puede usar como tampón para cargar la columna de HIC. Despues de cargar el polipéptido bG-CSF, la columna se puede lavar usando tampones convencionales y condiciones para eliminar materiales no deseados pero que retengan el polipéptido bG-CSF en la columna de HIC. El polipéptido bG-CSF puede

eluirse con aproximadamente 3 a aproximadamente 10 volúmenes de columna de un tampón convencional, tal como un tampón HEPES que contiene EDTA y una concentración menor de sulfato de amonio que el tampón de equilibrado, o un tampón de ácido acético/cloruro sódico, entre otros. También se puede usar un gradiente de sal lineal decreciente usando, por ejemplo, un gradiente de fosfato de potasio para eluir las moléculas de bG-CSF. El eluyente puede concentrarse entonces, por ejemplo, mediante filtración tal como diafiltración o ultrafiltración. La diafiltración se puede utilizar para retirar la sal usada para eluir el polipéptido bG-CSF.

**Otras técnicas de purificación.** Se puede realizar otra etapa más de aislamiento usando, por ejemplo, filtración en gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (n.º de cat. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), cromatografía de hidroxiapatita (las matrices adecuadas incluyen, pero sin limitación, HA-Ultrogel, alta resolución (Calbiochem), hidroxiapatita de cerámica CHT (BioRad), hidroxiapatita HTP Bio-Gel (BioRad)), HPLC, adsorción de lecho expandido, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, y similares, en la primera mezcla de polipéptido bG-CSF o cualquier mezcla posterior de las mismas, para eliminar cualquier exceso de sales y reemplazar el tampón con un tampón adecuado para la próxima etapa de aislamiento o incluso formulación del producto farmacéutico final.

El rendimiento del polipéptido bG-CSF, incluyendo el polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado, se puede controlar en cada etapa descrita en el presente documento usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas también pueden usarse para evaluar el rendimiento del polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado después de la última etapa de aislamiento. Por ejemplo, el rendimiento del polipéptido bG-CSF puede controlarse usando cualquiera de varias columnas de cromatografía líquida a alta presión de fase inversa, que tienen una variedad de longitudes de cadena de alquilo tales como RP-HPLC ciano, RP-HPLC C18; así como HPLC de intercambio catiónico y HPLC por filtración en gel.

El rendimiento de bG-CSF después de cada etapa de purificación puede ser del al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,9 %, o al menos aproximadamente 99,99 %, del bG-CSF en el material de partida para cada etapa de purificación.

La pureza se puede determinar usando técnicas convencionales tales como SDS-PAGE o mediante la medición del polipéptido bG-CSF usando transferencia Western y ensayos ELISA. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos policlonales contra proteínas aisladas de la fermentación de levadura de control negativo y la recuperación de intercambio catiónico. Los anticuerpos también pueden usarse para sondar la presencia de proteínas de células huésped contaminantes.

El material de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, cuyas superficies portan cadenas de alquilo C<sub>4</sub>. La separación del polipéptido bG-CSF de las impurezas proteináceas se basa en las diferencias en la intensidad de las interacciones hidrófobas. La elución se realiza con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. La HPLC preparativa se realiza usando una columna de acero inoxidable (llena con 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluato de Hidroxiapatita Ultrogel se acidifica mediante la adición de ácido trifluoroacético y se carga en la columna Vydac C4. Para el lavado y la elución, se usa un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Las fracciones se recogen y se neutralizan inmediatamente con tampón de fosfato. Se agrupan las fracciones de polipéptido bG-CSF que están dentro de los límites de IPC.

El material de DEAE Sefarosa (Pharmacia) consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE) que están unidos covalentemente a la superficie de perlas de Sefarosa. La unión del polipéptido bG-CSF a los grupos DEAE está mediada por interacciones iónicas. El acetonitrilo y el ácido trifluoroacético pasan a través de la columna sin ser retenidos. Una vez retiradas estas sustancias por lavado, las impurezas traza se retiran lavando la columna con tampón de acetato a un pH bajo. A continuación, se lava la columna con tampón de fosfato neutro, y el polipéptido bG-CSF se eluye con un tampón con una fuerza iónica aumentada. La columna está empaquetada con DEAE Sefarosa de flujo rápido. El volumen de la columna se ajusta para garantizar una carga de polipéptido bG-CSF en el intervalo de 3 a 10 mg de polipéptido bG-CSF/ml de gel. La columna se lava con agua y tampón de equilibrado (fosfato de sodio/potasio). Se cargan las fracciones combinadas del eluato de HPLC y la columna se lava con tampón de equilibrado. A continuación, se lava la columna con tampón de lavado (tampón de acetato de sodio) seguido del lavado con tampón de equilibrado. Posteriormente, se eluye el polipéptido bG-CSF de la columna con tampón de elución (cloruro de sodio, fosfato de sodio/potasio) y se recoge en una sola fracción de acuerdo con el perfil de elución principal. El eluato de la columna de DEAE Sepharose se ajusta a la conductividad especificada. Se filtra la sustancia farmacológica resultante en condiciones estériles en botes de teflón y se almacena a -70 °C.

Los procedimientos adicionales que pueden emplearse incluyen, pero sin limitación, etapas de eliminación de endotoxinas. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) que se ubican en la membrana externa de células huésped Gram-negativas, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*. Los procedimientos de reducción de los niveles de

endotoxina son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, técnicas de purificación que usan soportes de sílice, polvo de vidrio o hidroxiapatita, fase inversa, afinidad, exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una combinación de estos procedimientos y similares.

5 Se pueden requerir modificaciones o procedimientos adicionales para eliminar contaminantes tales como proteínas que migran conjuntamente del polipéptido de interés. Los procedimientos de medición de los niveles de endotoxina son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, ensayos de lisado de amebocitos de Limulus (LAL). El ensayo Endosafe™ -PTS es un sistema colorimétrico de un solo tubo que utiliza cartuchos precargados con reactivo LAL, sustrato cromogénico y endotoxina convencional de control junto con un espectrofotómetro de mano. Los procedimientos alternativos incluyen, pero sin limitación, un procedimiento Kinetic

10 LAL que es turbidimétrico y usa un formato de 96 pocillos.

Se puede usar una amplia variedad de métodos y procedimientos para evaluar el rendimiento y la pureza de una proteína bG-CSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural, incluyendo, pero sin limitación, el ensayo de Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE teñido con plata, SDS-PAGE teñido con Coomassie, 15 espectrometría de masas (incluyendo pero sin limitación, MALDI-TOF) y otros procedimientos de caracterización de proteínas conocidas por los expertos en la materia.

Otros procedimientos adicionales incluyen, pero sin limitación: SDS-PAGE acoplado con procedimientos de tinción de 20 proteínas, inmunotransferencia, espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz (EM-MALDI), cromatografía líquida/espectrometría de masas, isoelectroenfoque, intercambio analítico de aniones, cromatoenfoque y dicroísmo circular.

## 20 **VIII. Expresión de sistemas alternos**

Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas de células huésped no recombinantes, células huésped mutagenizadas o en sistemas exentos de células. Estos sistemas también son adecuados para su uso en la fabricación de los polipéptidos bG-CSF de la presente invención. La derivatización de aminoácidos con cadenas laterales reactivas tales como Lys, Cys y Tyr produjo la conversión de lisina en N<sup>2</sup>-acetil-

25 lisina. La síntesis química también proporciona un procedimiento directo de incorporación de aminoácidos no naturales. Con el reciente desarrollo de la ligadura enzimática y la ligadura química nativa de fragmentos de péptidos, es posible producir proteínas de mayor tamaño. Véase, por ejemplo, P. E. Dawson y S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000). La ligadura de péptidos químicos y la ligadura química nativa se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.184.344, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2004/0138412, la publicación de patente de EE.UU. n.º

30 2003/0208046, el documento WO 02/098902 y el documento WO 03/042235. Se ha usado un procedimiento biosintético *in vitro* general en el que un ARNt supresor acilado químicamente con el aminoácido no natural deseado se agrega a un extracto *in vitro* capaz de soportar la biosíntesis de proteínas para incorporar específicamente más de 100 aminoácidos no naturales en una variedad de proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véase, por ejemplo,

35 V. W. Cornish, D. Mendel y 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); y, J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, "Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acids into a polypeptide", *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989). Se ha introducido una amplia selección de grupos funcionales en proteínas para estudios de estabilidad de proteínas, 40 plegamiento de proteínas, mecanismo enzimático y transducción de señales.

45 40 Se desarrolló un procedimiento *in vivo*, denominado incorporación de presión selectiva, para aprovechar la promiscuidad de las sintetasas de tipo natural. Véase, por ejemplo, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder y R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Se cultiva una cepa auxotrófica, en la que se desactiva la vía metabólica relevante que suministra a la célula un determinado aminoácido natural en un medio mínimo que contiene concentraciones limitadas del aminoácido natural, mientras que la transcripción del gen diana se reprime. En el inicio de una fase de crecimiento estacionario, el aminoácido natural se agota y se reemplaza con el análogo de aminoácido no natural. La inducción de la expresión de la proteína recombinante produce la acumulación de una proteína que contiene el análogo no natural. Por ejemplo, usando esta estrategia, se han incorporado o-, m- y p-fluorofenilalaninas en proteínas, y presentan dos hombros característicos en el espectro de UV que se pueden identificar fácilmente, véase, por ejemplo, C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000);

50 50 la trifluorometionina se ha usado para reemplazar metionina en la lisozima del bacteriófago T4, con el fin de estudiar su interacción con ligandos de chitooligosacárido mediante RMN de <sup>19</sup>F, véase, por ejemplo, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); y la trifluoroleucina se ha incorporado en lugar de leucina, produciendo una mayor estabilidad térmica y química de una proteína de cremallera de leucina. Véase, por ejemplo,

55 Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado y D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Además, la selenometionina y la telurometionina se incorporan en varias proteínas recombinantes para facilitar la solución de las fases en la cristalografía de rayos X. Véase, por ejemplo, W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda y M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann y R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); y, N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L.

60 Moroder y R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). También se han incorporado análogos de metionina con funcionalidades alqueno o alquino de manera eficaz, lo que permite la modificación adicional de proteínas por medios químicos. Véase, por ejemplo, J. C. van Hest y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick y D.

A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:1282 (2000); y, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); la patente de EE.UU. n.º 6.586.207; publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0042097.

El éxito de este procedimiento depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por las aminoacil-ARNt sintetasas, que, en general, requieren una alta selectividad para garantizar la fidelidad de la traducción de proteínas. Una forma de ampliar el alcance de este procedimiento es relajar la especificidad del sustrato de las aminoacil-ARNt sintetasas, lo que se ha logrado en un número limitado de casos. Por ejemplo, la sustitución de Ala<sup>294</sup> por Gly en fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) de *Escherichia coli* aumenta el tamaño de la bolsa de unión al sustrato, y produce la acilación de ARNtPhe por p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe). Véase M. Ibba, P. Kast y H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). Una cepa de *Escherichia coli* que alberga esta PheRS mutante permite la incorporación de p-Cl-fenilalanina o p-Br-fenilalanina en lugar de fenilalanina. Véase, por ejemplo, M. Ibba y H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); y, N. Sharma, R. Furter, P. Kast y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). De forma similar, se demostró que una mutación puntual Phel30Ser, cerca del sitio de unión de aminoácidos de la tirosil-ARNt sintetasa de *Escherichia coli*, permite que la azatirosina se incorpore más eficazmente que la tirosina. Véase, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil y S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275: 40324 (2000).

Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales a las proteínas *in vivo* es modificar las sintetasas que tienen mecanismos de corrección. Estas sintetasas no pueden diferenciar ni, por lo tanto, activar aminoácidos que sean estructuralmente similares a los aminoácidos naturales afines. Este error se corrige en un sitio aparte, que desacila el aminoácido mal cargado del ARNt para mantener la fidelidad de la traducción de proteínas. Si la actividad de corrección de la sintetasa está desactivada, los análogos estructurales que se desactivan incorrectamente pueden escapar de la función de edición e incorporarse. Este enfoque se ha demostrado recientemente con la valil-ARNt sintetasa (ValRS). Véase V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001). ValRS puede misaminoacilar ARNtVal con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no afines son hidrolizados posteriormente por el dominio de edición. Después de la mutagénesis aleatoria del cromosoma de *Escherichia coli*, se seleccionó una cepa mutante de *Escherichia coli* que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Este ValRS de edición defectuosa carga incorrectamente ARNtVal con Cys. Debido a que Abu se asemeja estéticamente a Cys (el grupo -SH de Cys se reemplaza por -CH<sub>3</sub> en Abu), el ValRS mutante también incorpora Abu a las proteínas cuando esta cepa mutante de *Escherichia coli* se cultiva en presencia de Abu. El análisis de espectrometría de masas muestra que aproximadamente el 24 % de las valinas se reemplazan por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.

La síntesis en fase sólida y los procedimientos semisintéticos también han permitido la síntesis de una serie de proteínas que contienen nuevos aminoácidos. Por ejemplo, véanse las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas, que son las siguientes: 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 replacement 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 y proteins including enzymes", *Acc. Chem. Res.*, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E. T. "Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin", *J. Am. Chem. Soc.*, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S. B. H. "Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease", *Science*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I. M. "Semisynthetic peptides and proteins", *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 11(3):255-301 (1981); Offord, R. E. "Proteins engineering by chemical means?" *Protein Eng.*, 1(3):151-157 (1987); y, 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).

Se ha usado la modificación química para introducir una variedad de cadenas laterales no naturales, incluyendo cofactores, marcadores de espín y oligonucleótidos en proteínas *in vitro*. Véase, por ejemplo, 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 enzymatic 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); y, Pollack, S. J., Nakayama, G. Schultz, P. G. "Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites", *Science*, 242(4881):1038-1040 (1988).

Como alternativa, se han usado procedimientos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt modificados químicamente para incorporar varias sondas biofísicas a proteínas sintetizadas *in vitro*. Véanse las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas: Brunner, J. "New Photolabeling and crosslinking methods", *Annu. Rev. Biochem.*, 62:483-514 (1993); y, Krieg, U. C., Walter, P., Johnson, 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).

Previamente, se ha demostrado que los aminoácidos no naturales pueden incorporarse con especificidad de sitio a proteínas *in vitro* mediante la adición de ARNt supresores químicamente aminoacilados a reacciones de síntesis de proteínas programadas con un gen que contiene una mutación sin sentido ámbar deseada. Usando estos enfoques,

se puede sustituir un número de los veinte aminoácidos comunes con homólogos estructurales cercanos, por ejemplo, fluorofenilalanina por fenilalanina, usando cepas auxotrópicas para un determinado aminoácido. Véase, por ejemplo, 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, y col., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.

- 5 D., Glabe, C. G., Dix, T. A., Chamberlin, A. R., Diala, E. S. "Biosynthetic sitespecific Incorporation of a non-natural amino acids into a polypeptide", *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa y col., *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); y, Mendel, D., Cornish, V. W. y Schultz, P. G. "Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code", *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de parada UAG y fue aminoacilado químicamente con un aminoácido no natural. Se usó la mutagénesis convencional dirigida para introducir el codón de parada TAG, en el sitio de interés del gen de la proteína. Véase, por ejemplo, Sayers, J. R., Schmidt, W. Eckstein, F. "5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis", *Nucleic Acid Res.* 16(3):791-802 (1988). Cuando se combinaron el ARNt supresor acilado y el gen mutante en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, se incorporó el aminoácido no natural en respuesta al codón UAG que dio una proteína que contenía ese aminoácido en la posición especificada. Los experimentos que usan [<sup>3</sup>H]-Phe y experimentos con α-hidroxíácidos demostraron que solo el aminoácido deseado es incorporado en la posición especificada por el codón UAG, y que este aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio de la proteína. Véase, por ejemplo, Noren y col, *supra*; Kobayashi y col., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; y, Ellman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G. "Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins", *Science*, 255(5041):197-200 (1992).

Un ARNt puede aminoacilarse con un aminoácido deseado mediante cualquier procedimiento o técnica, incluyendo, pero sin limitación, la aminoacilación química o enzimática.

La aminoacilación puede realizarse mediante aminoacil ARNt sintetasas o mediante otras moléculas enzimáticas, incluyendo, pero sin limitación: ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y colaboradores (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle y col., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) demostraron la presencia de ARN naturales que podían actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque estos catalizadores de ARN natural solo han demostrado actuar sobre sustratos de ácido ribonucleico para la escisión, y el corte y empalme, el desarrollo reciente de la evolución artificial de ribozimas ha ampliado el repertorio de la catálisis a diversas reacciones químicas. Los estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces de aminoacil-ARN en sus propios extremos (2')3' (Illangakekare y col., 1995 *Science* 267:643-647), y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido de una molécula de ARN a otra (Lohse y col., 1996, *Nature* 381:442-444).

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0228593, describe procedimientos para construir ribozimas y su uso en la aminoacilación de los ARNt con aminoácidos codificados de forma natural y no codificados de forma natural. Las formas inmovilizadas en sustratos de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar ARNt, incluyendo pero sin limitación, las ribozimas, pueden permitir la purificación de afinidad eficaz de los productos aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sefarosa y perlas magnéticas. La producción y el uso de una forma de ribozima inmovilizada en sustrato para la aminoacilación se describe en *Chemistry and Biology* 2003, 10: 1077-1084 y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0228593.

40 Los procedimientos de aminoacilación química incluyen, pero sin limitación, los introducidos por Hecht y colaboradores (Hecht, S. M. *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. *Biochemistry* 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 4517) y por Schultz, Chamberlin, Dougherty y otros (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. y col. *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti, y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. y col. *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. y col. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), para evitar el uso de sintetasas en la aminoacilación. Dichos procedimientos u otros procedimientos de aminoacilación química pueden usarse para aminoacilar moléculas de ARNt.

Los procedimientos de generación de ARN catalítico pueden implicar la generación de combinaciones separadas de secuencias de ribozimas aleatorizadas, la realización de la evolución dirigida en las combinaciones, la exploración de las combinaciones para determinar la actividad de aminoacilación deseada y la selección de secuencias de esas ribozimas que muestran la actividad de aminoacilación deseada.

55 Las ribozimas pueden comprender motivos y/o regiones que facilitan la actividad de acilación, tales como un motivo GGU y una región rica en U. Por ejemplo, se ha informado de que las regiones ricas en U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácido, y que un motivo de GGU puede formar pares de bases con los extremos 3' de un ARNt. En combinación, el motivo GGU y la región rica en U facilitan el reconocimiento simultáneo tanto del aminoácido como del ARNt simultáneamente, y de ese modo facilitan la aminoacilación del extremo 3' del ARNt.

- Las ribozimas pueden generarse mediante selección *in vitro* usando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con ARNt<sup>Asn</sup><sub>CCG</sub> seguido de un diseño sistemático de una secuencia consenso encontrada en los clones activos. Una ribozima ilustrativa obtenida mediante este procedimiento se denomina "ribozima Fx3", y que se describe en la solicitud de publicación de EE.UU. n.º 2003/0228593, actúa como un catalizador versátil para la síntesis de varios aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales afines.
- La inmovilización sobre un sustrato se puede usar para permitir la purificación por afinidad eficaz de los ARNt aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen, pero sin limitación, agarosa, sefarosa y perlas magnéticas. Las ribozimas se pueden inmovilizar sobre resinas aprovechando la estructura química del ARN, tal como el 3'-cis-diol en la ribosa del ARN se puede oxidar con peryodato para producir el dialdehído correspondiente para facilitar la inmovilización del ARN en la resina. Se pueden usar diversos tipos de resinas incluyendo resinas de hidrazida económicas en las que la aminación reductiva hace que la interacción entre la resina y la ribozima sea un enlace irreversible. La síntesis de aminoacil-ARNt puede facilitarse significativamente mediante esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis y col. *Methods* 2005; 36:239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.
- El aislamiento de los ARNt aminoacilados se puede realizar de varias formas. Un procedimiento adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón tal como una solución de acetato de sodio con EDTA 10 mM, un tampón que contiene ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(3-propanosulfónico) 50 mM, KCl 12,5 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM, o simplemente agua tamponada con EDTA (pH 7,0).
- Los ARNt aminoacilados se pueden añadir a reacciones de traducción para incorporar el aminoácido con el que el ARNt se aminoacila en una posición escogida de un polipéptido preparado mediante la reacción de traducción. Los ejemplos de sistemas de traducción en los que se pueden usar los ARNt aminoacilados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, lisados celulares. Los lisados celulares proporcionan componentes de reacción necesarios para la traducción *in vitro* de un polipéptido a partir de un ARNm de entrada. Los ejemplos de dichos componentes de reacción incluyen, pero sin limitación, proteínas ribosómicas, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de inicio y elongación de la traducción y factores adicionales asociados con la traducción. Además, los sistemas de traducción pueden ser traducciones por lotes o traducción compartimentada. Los sistemas de traducción por lotes combinan los componentes de la reacción en un solo compartimento, mientras que los sistemas de traducción compartimentados separan los componentes de la reacción de traducción de los productos de reacción que pueden inhibir la eficacia de la traducción. Dichos sistemas de traducción se encuentran disponibles en el mercado.
- Además, se puede usar un sistema de transcripción/traducción acoplado. Los sistemas de transcripción/traducción acoplados permiten la transcripción de un ADN de entrada en un ARNm correspondiente, que a su vez es traducido por los componentes de la reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplada disponible en el mercado es el Sistema de Traducción Rápida (RTS, Roche Inc.). El sistema incluye una mezcla que contiene el lisado de *E. coli* para proporcionar componentes de traducción tales como ribosomas y factores de traducción. Además, se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN de entrada en un molde de ARNm para su uso en la traducción. RTS puede usar la compartimentación de los componentes de reacción por medio de una membrana interpuesta entre los compartimentos de reacción, incluyendo un compartimiento de suministro/desecho y un compartimento de transcripción/traducción.
- La aminoacilación de ARNt puede ser realizada por otros agentes, incluyendo, pero sin limitación, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.
- Stephan en *Scientist*, 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe procedimientos adicionales para incorporar aminoácidos no codificados de forma natural a las proteínas. Lu y col. en *Mol Cell.*, octubre de 2001; 8(4):759-69 describen un procedimiento en el que una proteína se liga químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (ligadura de proteína expresada).
- Las técnicas de microinyección también se han usado para incorporar aminoácidos no naturales a proteínas. Véase, por ejemplo, M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Lengloba, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Science*, 268:439 (1995); y, D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000). Se injectó un ovocito de *Xenopus* junto con dos especies de ARN preparadas *in vitro*: un ARNm codificante de la proteína diana con un codón de parada UAG en la posición de interés de aminoácido y un ARNt supresor ámbar aminoacilado con el aminoácido no natural deseado. A continuación, la maquinaria de traducción del ovocito insertó el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este procedimiento ha permitido estudios de estructura-función *in vivo* de proteínas de membrana integral, que, en general, no son susceptibles a los sistemas de expresión *in vitro*. Los ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente al receptor de taququinina neuroquinina-2 para medir distancias por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, véase, por ejemplo, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel y A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271:19991 (1996); la incorporación de aminoácidos biotinilados para identificar los restos expuestos a la superficie en canales iónicos, véase, por ejemplo, J. P. Gallivan, H. A. Lester y D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997); el uso de análogos de tirosina curados para controlar los cambios de configuración en un canal iónico en tiempo real; véanse, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Neuron*, 20:619 (1998); y, el uso de alfa-hidroxi-aminoácidos para cambiar

las estructuras principales del canal de iones para sondar sus mecanismos de activación. Véase, por ejemplo P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty y H. A. Lester, *Cell*, 96:89 (1999); y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz y J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001).

5 La capacidad de incorporar aminoácidos no naturales directamente a las proteínas *in vivo* ofrece una amplia variedad de ventajas incluyendo, pero sin limitación, altos rendimientos de proteínas mutantes, facilidad técnica, el potencial de estudiar las proteínas mutantes en las células o posiblemente en organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos de diagnóstico. La capacidad de incluir aminoácidos no naturales con diversos tamaños, acidez, nucleofilicidades, hidrofobicidad y otras propiedades en proteínas puede expandir en gran medida nuestra capacidad de manipular racional y sistemáticamente las estructuras de las proteínas, tanto para investigar la función proteica como para crear nuevas proteínas u organismos con nuevas propiedades.

10 En un intento de incorporar para-F-Phe de manera específica del sitio, se usó un supresor ámbar de levadura ARNtPheCUA/fenilalanil-ARNt sintetasa en una cepa de *Escherichia coli* Phe auxotrófica resistente a p-F-Phe. Véase, por ejemplo, R. Furter, *Protein Sci.*, 7:419 (1998).

15 También puede ser posible obtener la expresión de un polinucleótido bG-CSF de la presente invención usando un sistema de traducción exento de células (*in vitro*). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o sin células, y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celular incluyen, pero sin limitación, preparados de células entrañas tales como células permeabilizadas o cultivos celulares en los que una secuencia de ácido nucleico deseada se puede transcribir a ARNm y se puede traducir el ARNm. Los sistemas de traducción sin células se encuentran disponibles en el mercado, y se conocen muchos tipos y sistemas diferentes. Los ejemplos de sistemas 20 exentos de células incluyen, pero sin limitación, lisados procariotas tales como lisados de *Escherichia coli* y lisados eucariotas tales como extractos de germen de trigo, lisados de células de insecto, lisados de reticulocitos de conejo, lisados de ovocitos de conejo y lisados de células humanas. Se pueden preferir los extractos o lisados eucariotas cuando la proteína resultante está glicosilada, fosforilada o modificada de otro modo, porque muchas de dichas modificaciones solo son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles en el 25 mercado (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). También se encuentran disponibles extractos membranosos, como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsómicas, que son útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que 30 pueden incluir ARNm como molde (traducción *in vitro*) o ADN como molde (transcripción y traducción combinadas *in vitro*), la síntesis *in vitro* está dirigida por los ribosomas. Se ha aplicado un esfuerzo considerable para el desarrollo de sistemas de expresión de proteínas exentas de células. Véase, por ejemplo, Kim, D. M. y J. R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74:309-316 (2001); Kim, D. M. y J. R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D. M. y J. R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D. M. y J. R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); y Patnaik, R. y J. R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); la patente de EE.UU. n.º 6.337.191; la publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0081660; el documento WO 00/55353; el 35 documento WO 90/05785. Otro enfoque que se puede aplicar a la expresión de polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de manera natural incluye la técnica de fusión de ARNm-péptido. Véase, por ejemplo, R. Roberts y J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci.* (EE.UU.) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, y col., *Chemistry Biology* 10:1043-1050 (2003). En este enfoque, se traduce un molde de ARNm enlazado a puromicina en péptido en el 40 ribosoma. Si se han modificado una o más moléculas de ARNt, también se pueden incorporar aminoácidos no naturales al péptido. Una vez leído el último codón de ARNm, la puromicina captura el extremo C del péptido. Si el conjugado de ARNm-péptido resulta tener propiedades interesantes en un ensayo *in vitro*, se puede revelar fácilmente su identidad a partir de la secuencia de ARNm. De esta forma, se pueden explorar bibliotecas de polipéptidos bG-CSF que comprenden uno o más aminoácidos codificados de manera no natural para identificar los polipéptidos que tengan las 45 propiedades deseadas. Más recientemente, se ha informado de traducciones de ribosomas *in vitro* con componentes purificados que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos no codificados de forma natural. Véase, por ejemplo, A. Forster y col., *Proc. Natl Acad. Sci.* (EE.UU.) 100:6353 (2003).

También se pueden usar sistemas de traducción reconstituidos. También se han usado mezclas de factores de traducción purificados con éxito para traducir el ARNm en proteínas, así como combinaciones de lisados o lisados complementados con factores de traducción purificados tales como factor de iniciación-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α o β), 50 factor de elongación T (EF-Tu) o factores de terminación. También se pueden acoplar sistemas exentos de células a sistemas de transcripción/traducción en los que el ADN se introduce en el sistema, se transcribe en ARNm y el ARNm se traduce como se describe en "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col. editores, Wiley Interscience, 1993). El ARN transcripto en el sistema de transcripción eucariota puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARNnh) o capuchones del extremo 5' (7-metil-guanina) y ARNm maduro de cola poli A en el extremo 55 3', que puede ser una ventaja en ciertos sistemas de traducción. Por ejemplo, los ARNm protegidos con capuchón se traducen con alta eficacia en el sistema de lisado de reticulocitos.

#### **IX. Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos de bG-CSF**

Se pueden efectuar diversas modificaciones de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento usando las composiciones, los procedimientos, las técnicas y las estrategias que se describen en el 60 presente documento. Estas modificaciones incluyen la incorporación de funcionalidad adicional sobre el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, hidroxietilalmidón (HAS); hidroxietilalmidón

(HES); un marcador; un colorante; un polímero; un polímero hidrosoluble; un derivado de polietilenglicol; un agente fotorreticulante; un radionucleido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína, o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un hidrato de carbono; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero hidrosoluble; una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo; una fracción que contiene metal; una fracción radioactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas; una fracción fotocurada; una fracción excitable por radiación actínica; una fracción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo escindible químicamente; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente activo redox; un aminoácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso de electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones; o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. Como un ejemplo ilustrativo y no limitante de las composiciones, los procedimientos, las técnicas y las estrategias que se describen en el presente documento, la siguiente descripción se centrará en la adición de polímeros macromoleculares al polipéptido de aminoácidos no natural con el conocimiento de que las composiciones, los procedimientos, las técnicas y las estrategias que se describen también son aplicables (con las modificaciones apropiadas, si es necesario y para lo que un experto en la materia podría hacer con las divulgaciones del presente documento) a la adición de otras funcionalidades, incluyendo, pero sin limitación, las enumeradas anteriormente.

Una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas se pueden enlazar a los polipéptidos bG-CSF de la presente invención para modular las propiedades biológicas del polipéptido bG-CSF y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas a la molécula de bG-CSF. Estos polímeros macromoleculares se pueden enlazar al polipéptido bG-CSF a través de un aminoácido codificado de forma natural, mediante un aminoácido no codificado de forma natural, o cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural, o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede ser de un amplio intervalo, incluyendo, pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100,000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100,000 Da, incluyendo, pero sin limitación, 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50,000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40,000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1,000 Da y aproximadamente 40,000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5,000 Da y aproximadamente 40,000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10,000 Da y aproximadamente 40,000 Da.

La presente invención proporciona preparados sustancialmente homogéneos de conjugados de polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo", como se usa en el presente documento, significa que se observa que las moléculas de conjugado de polímero:proteína son superiores a la mitad de la proteína total. El conjugado de polímero:proteína tiene actividad biológica, y los presentes preparados de polipéptido bG-CSF PEGilados "sustancialmente homogéneos" proporcionados en el presente documento son aquellos que son lo suficientemente homogéneos para mostrar las ventajas de un preparado homogéneo, por ejemplo, facilidad en la aplicación clínica en la predictibilidad de la farmacocinética de lote a lote.

También se puede optar por preparar una mezcla de moléculas de conjugado de polímero:proteína, y la ventaja proporcionada en el presente documento es que se puede seleccionar la proporción de conjugado de mono-polímero:proteína para incluirla en la mezcla. De este modo, si se desea, se puede preparar una mezcla de diversas proteínas con diversos números de fracciones poliméricas unidas (es decir, di-, tri-, tetra-, etc.) y combinar dichos conjugados con el conjugado de mono-polímero:proteína preparado usando los procedimientos descritos aquí, y tener una mezcla con una proporción predeterminada de conjugados de mono-polímero:proteína.

El polímero seleccionado puede ser hidrosoluble de modo que la proteína a la que está unido no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para el uso terapéutico del preparado del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de polímeros incluyen, pero sin limitación, éteres de polialquilo y análogos con terminación alcoxi de los mismos (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietileno/propilenglicol y análogos con terminación metoxi o etoxi de los mismos, en especial, polioxietilenglicol, este último también conocido como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; polivinilalquiléteres; polioxazolinas, polialquilogoxazolininas y polihidroxialquiloxazolininas; poliacrilamidas, polialquilacrilamidas y polihidroxialquilacrilamidas (por ejemplo, polihidroxipropilmactrilamida y derivados de la misma); polihidroxialquilacrilatos; ácidos polisálicos y análogos de los mismos; secuencias de péptidos hidrófilos;

- polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo, carboximetildextrano, sulfatos de dextrano, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroxialquilcelulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosano, succiniquitosano, carboximetilquitina, carboximetilquitosano; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; sulfato de condroitina; albúmina, 5 pululano y carboximetilpululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo, ácidos poliglutámicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de anhídrido maleico y estireno, copolímero de anhídrido maleico y diviniletiléter; alcoholes polivinílicos; copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; hidroxialquilalmidón (HAS), incluyendo, pero sin limitación, hidroxietilalmidón (HES); y derivados de los anteriores.
- 10 La proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a las moléculas de proteína variará, al igual que sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la proporción óptima (en términos de eficacia de reacción en tanto en cuanto haya un exceso mínimo de proteína o polímero sin reaccionar) puede determinarse por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y en el número de grupos reactivos disponibles. En cuanto al peso molecular, normalmente cuanto mayor es el peso molecular del polímero, menor es el número de moléculas de 15 polímero que pueden unirse a la proteína. De manera similar, la ramificación del polímero debe tenerse en cuenta al optimizar estos parámetros. En general, cuanto mayor es el peso molecular (o más ramificaciones hay) mayor es la proporción de polímero:proteína.
- 20 Como se usa en el presente documento, y cuando se contemplan conjugados de PEG:polipéptido bG-CSF, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona el beneficio deseado a un animal. La cantidad variará de un individuo a otro, y dependerá de una serie de factores, incluyendo el estado físico general del paciente y la causa subyacente de la afección que se va a tratar. La cantidad de polipéptido bG-CSF usada para la terapia proporciona una tasa aceptable de cambio y mantiene la respuesta deseada a un nivel beneficioso. El experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones usando materiales y procedimientos disponibles para el público en general.
- 25 El polímero hidrosoluble puede ser de cualquier forma estructural incluyendo, pero sin limitación, lineal, bifurcada o ramificada. El polímero hidrosoluble comprende una fracción de poli(etilenglicol) (PEG), pero también se pueden emplear otros polímeros hidrosolubles. A modo de ejemplo, el PEG se usa para describir ciertas realizaciones de la presente invención.
- 30 El PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que está disponible en el mercado o se puede preparar mediante polimerización con apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia (Sandler y Karo, "Polymer Synthesis", Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para englobar cualquier molécula de polietilenglicol, sin importar el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y se puede representar como enlazada al polipéptido bG-CSF por la fórmula:
- $$\text{XO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-Y}$$
- 35 en la que n es 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo, pero sin limitación, un alquilo C<sub>1-4</sub>, un grupo protector o un grupo funcional terminal.
- 40 En algunos casos, un PEG usado en la invención termina en un extremo con hidroxi o metoxi, es decir, X es H o CH<sub>3</sub> ("metoxi-PEG"). Como alternativa, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando así un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir aquellos grupos reactivos que se usan comúnmente para reaccionar con los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, grupos maleimida, carbonatos activados (incluyendo, pero sin limitación, p-nitrofeniléster), ésteres activados (incluyendo, pero sin limitación, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofeniléster) y aldehídos), así como grupos funcionales que son inertes a los 45 20 aminoácidos comunes, pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos no codificados de forma natural (incluyendo, pero sin limitación, grupos azida, grupos alquino). Se observa que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior por Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido bG-CSF a través de un aminoácido no codificado de forma natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace de amida, carbamato o urea a un grupo amina (incluyendo, pero sin limitación, épsilon-amina de lisina o el extremo N) del polipéptido. Como alternativa, Y puede ser un enlace de maleimida con un grupo tiol (incluyendo, pero sin limitación, el grupo tiol de cisteína). Como alternativa, Y puede ser un enlace a un resto no comúnmente accesible a través de los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un grupo azida del PEG con un grupo 50 alquino del polipéptido bG-CSF para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Como alternativa, se puede hacer reaccionar un grupo alquino del PEG con un grupo azida presente en un aminoácido no codificado de forma natural para formar un producto similar. En algunas realizaciones, se puede hacer reaccionar un nucleófilo fuerte (incluyendo, pero sin limitación, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido no codificado de forma natural para formar una hidrazone, oxima o semicarbazona, según corresponda, que, en algunos casos, puede reducirse aún más mediante el tratamiento con un agente reductor apropiado. Como alternativa, el nucleófilo fuerte puede incorporarse al polipéptido bG-CSF a través de un aminoácido 55 no codificado de forma natural y usarse para reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero hidrosoluble.

Se puede usar cualquier masa molecular para un PEG como prácticamente se deseé, incluyendo, pero sin limitación, de aproximadamente 100 Dalton (Da) a 100.000 Da o más según se deseé (limitado a 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). En algunas realizaciones, el PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones,

- 5 PEG es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. También se pueden usar PEG de cadena ramificada, incluyendo, pero sin limitación, moléculas de PEG teniendo cada cadena un PM que varía de 1 a 100 kDa limitado a, 1-50 kDa o 5-20 kDa) En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Se
- 10 describe una amplia selección de moléculas de PEG, incluyendo, pero sin limitación, el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., catálogo de Nektar Therapeutics.
- 15

En general, al menos un extremo de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no codificado de forma natural. Por ejemplo, se pueden usar los derivados de PEG portadores de fracciones alquino y azida para la reacción con cadenas laterales de aminoácidos para unir PEG a aminoácidos no codificados de forma

- 20 natural como se describe en el presente documento. Si el aminoácido no codificado de forma natural comprende una azida, entonces el PEG contendrá normalmente una fracción alquino para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato) que contenga un grupo fosfina para efectuar la formación del enlace amida. Como alternativa, si el aminoácido no codificado de forma natural comprende un alquino, entonces el PEG normalmente contendrá una fracción azida para efectuar la formación del producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Si el aminoácido no codificado de forma natural comprende un grupo carbonilo, el PEG
- 25 normalmente comprenderá un nucleófilo potente (incluyendo, pero sin limitación, una funcionalidad de hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida) con el fin de efectuar la formación de los correspondientes enlaces de hidrazone, oxima y semicarbazona, respectivamente. En otras alternativas, puede usarse un inverso de la orientación de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, se puede hacer reaccionar una fracción azida en el
- 30 aminoácido no codificado de forma natural con un derivado de PEG que contenga un alquino.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido bG-CSF con un derivado de PEG contiene una funcionalidad química que es reactiva con la funcionalidad química presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural.

- 35 La columna vertebral del polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). El término PEG incluye, pero sin limitación, poli(etilen glicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG multiramificado, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes de la estructura principal del polímero) o PEG con enlaces degradables en el mismo.

- 40 El PEG normalmente es transparente, incoloro, inodoro, hidrosoluble, estable al calor, inerte para muchos agentes químicos, no se hidroliza ni se deteriora, y, en general, no es tóxico. El poli(etilenglicol) se considera biocompatible, lo que quiere decir que el PEG es capaz de coexistir con tejidos u organismos vivos sin causar daños. Más concretamente, el PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que quiere decir que el PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el organismo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el organismo, tal como un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente, y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de modo que un organismo pueda tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG tienden a no producir una respuesta inmune sustancial ni causar coagulación u otros efectos no deseados. El PEG que tiene la fórmula  $--\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}--(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2--$ , en la que n es de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.000, normalmente de aproximadamente 20 a aproximadamente 2.000, es adecuado para su uso en la presente invención. El peso molecular del PEG puede incluir 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000
- 45 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. El peso molecular del PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso
- 50 molecular del PEG es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.
- 55

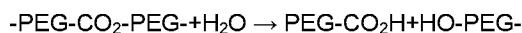
La estructura principal del polímero puede ser lineal o ramificada. Las cadenas principales poliméricas ramificadas se conocen en general en la materia. Por lo general, un polímero ramificado tiene una fracción de núcleo de ramificación central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales enlazadas al núcleo de ramificación central. El PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de la ramificación central también puede derivarse de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse

en forma general como R-(PEG-OH)<sub>m</sub>, en el que R se deriva de una fracción de núcleo, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramificaciones. También se pueden usar moléculas de PEG multiramificadas, tales como las descritas en las patentes de EE.UU. n.º 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0143596; el documento WO 96/21469; y el documento WO 93/21259, como estructura principal polimérica.

5 El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por PEG(-YCHZ<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, en el que Y es un grupo de enlace y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

Otra forma ramificada más, el PEG colgante, tiene grupos reactivos tales como carboxilo, a lo largo de la estructura principal de PEG en lugar de al final de las cadenas de PEG.

10 Además de estas formas de PEG, el polímero también se puede preparar con enlaces débiles o degradables en la estructura principal. Por ejemplo, el PEG se puede preparar con enlaces de éster en la estructura principal del polímero que estén sometidos a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da lugar a la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular:



15 Los expertos en la materia entenderán que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, las desveladas en el presente documento.

Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, las 20 cadenas principales poliméricas que son hidrosolubles, con de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros polímeros tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de los mismos (incluyendo pero sin limitación, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura principal del polímero puede variar, normalmente está en el intervalo de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 6.000 Da a 25 aproximadamente 80.000 Da. El peso molecular de cada cadena de la estructura principal del polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero sin limitación, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura 30 principal polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal polimérica es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal polimérica es de entre aproximadamente 5.000 Da y 35 aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal polimérica es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior para estructuras principales sustancialmente hidrosolubles no es de ningún modo exhaustiva y que es meramente ilustrativa, y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso en la presente invención.

40 En algunas realizaciones de la presente invención, los derivados del polímero son "multifuncionales", lo que significa que la estructura principal del polímero tiene al menos dos extremos y, posiblemente, tantos como aproximadamente 300 extremos, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados poliméricos multifuncionales incluyen, pero sin limitación, polímeros lineales que tienen dos extremos, estando cada extremo unido a un grupo funcional que puede ser igual o diferente.

45 En una realización, el derivado polimérico tiene la estructura:



en la que:

N=N=N es una fracción azida;

B es una fracción de engarce, que puede estar presente o ausente;

50 POLY es un polímero no antigénico hidrosoluble;

A es una fracción de engarce, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y

X es un segundo grupo funcional.

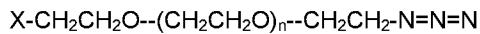
Los ejemplos de una fracción de engarce para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo múltiplemente funcionalizado que contiene hasta 18 y puede contener entre 1 y 10 átomos de carbono. Se puede incluir un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de engarce para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo múltiplemente funcionalizado, que contiene hasta 10 y puede contener de 5 a 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de engarce adecuados incluyen los grupos de engarce descritos en las patentes de EE.UU. n.º 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior de fracciones de engarce no es de ningún modo exhaustiva y que es meramente ilustrativa, y que todas las fracciones de engarce que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuadas para su uso en la presente invención.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo tales como *N*-hidroxisuccinimidilésteres y 1-benzotriazolilésteres, carbonato activo tal como *N*-hidroxisuccinimidilcarbonatos y 1-benzotriazolil-carbonatos, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminoxy, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, gioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y azida. Como es entendido por los expertos en la materia, la fracción X seleccionada debería ser compatible con el grupo azida, por lo que la reacción con el grupo azida no ocurre. Los derivados poliméricos que contienen azida pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción azida o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo protector o de una fracción que evite la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará según el tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de *terc*-butiloxicarbonilo (*t*-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o *terc*-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también pueden usarse en la presente invención.

Los ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la literatura incluyen, pero sin limitación, carbonato de *N*-succinimidilo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.281.698, 5.468.478), amina (véanse, por ejemplo, Buckmann y col. *Makromol. Chem.* 182:1379 (1981), Zalipsky y col. *Eur. Polym. J.* 19:1177 (1983)), hidrazida (véanse, por ejemplo, Andresz y col. *Makromol. Chem.* 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson y col. en "Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications", pág. 170-181, Harris y Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la patente de EE.UU. n.º 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Abuchowski y col. *Cancer Biochem. Biophys.* 7:175 (1984) y Joppich y col. *Makromol. Chem.* 180:1381 (1979)), succinimidiléster (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase también la patente de EE.UU. n.º 5.650.234), glicidiléter (véase, por ejemplo, Pitha y col. *Eur. J. Biochem.* 94:11 (1979), Elling y col., *Biotech. Appl. Biochem.* 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, por ejemplo, Beauchamp, y col., *Anal. Biochem.* 131:25 (1983), Tondelli y col. *J. Controlled Release* 1:251 (1985)), carbonato de *p*-nitrofenilo (véase, por ejemplo, Veronese, y col., *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141 (1985); y Sartore y col., *Appl. Biochem. Biotech.*, 27:45 (1991)), aldehído (véase, por ejemplo, Harris y col. *J. Polym. Sci. Chem. Ed.* 22:341 (1984), la patente de EE.UU. n.º 5.824.784, la patente de EE.UU. n.º 5.252.714), maleimida (véase, por ejemplo, Goodson y col. *Biotechnology* (NY) 8:343 (1990), Romani y col. en "Chemistry of Peptides and Proteins" 2:29 (1984)) y Kogan, *Synthetic Comm.* 22:2417 (1992)) otopiridil-disulfuro (véase, por ejemplo, Woghiren, y col. *Bioconj. Chem.* 4:314(1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney y col., "Macromolecules", 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.900.461).

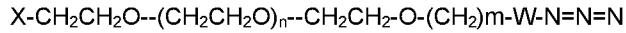
En ciertas realizaciones de la presente invención, los derivados poliméricos de la invención comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura:



en la que:

X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y  
n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4.000.

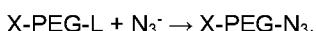
En otra realización, los derivados poliméricos de la invención comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura:



en la que:

W es una fracción de engarce alifática o aromática que comprende entre 1 y 10 átomos de carbono; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4.000; y X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; m es de entre 1 y 10.

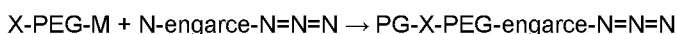
- 5 Los derivados de PEG que contienen azida de la invención se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. En un procedimiento, mostrado a continuación, se hace reaccionar una estructura principal polimérica hidrosoluble que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura principal del polímero un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo saliente adecuado, con un anión azida (que puede combinarse con cualquiera de una serie de contraiones adecuados, incluyendo sodio, potasio, *terc*-butilamonio, etc.). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción azida, proporcionando el polímero de PEG que contiene azida deseado.
- 10



- 15 Como se muestra, una estructura principal polimérica adecuada para su uso en la presente invención tiene la fórmula X-PEG-L, en la que el PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado. Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alquenilo, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina y vinilpiridina, y cetona. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato.

- 20 En otro procedimiento de preparación de los derivados poliméricos que contienen azida de la presente invención, se pone en contacto un agente de engarce portador de una funcionalidad azida con una estructura principal polimérica hidrosoluble que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, en la que el agente de engarce porta una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química del polímero de PEG, para formar un producto derivado de polímero que contiene azida en el que la azida se separa de la estructura principal del polímero mediante un grupo de engarce.

- 25 A continuación, se muestra un esquema de reacción ilustrativo:



en el que:

- PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de terminación tal como alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y  
30 M es un grupo funcional que no es reactivo con la funcionalidad azida, pero que reaccionará de manera eficaz y selectiva con el grupo funcional N.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, siendo M un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; siendo M una cetona si N es una fracción hidrazida o aminooxi; siendo M un grupo saliente si N es un nucleófilo.

- 35 La purificación del producto en bruto se puede realizar mediante procedimientos conocidos incluyendo, pero sin limitación, precipitación del producto seguida de cromatografía, si es necesario.

A continuación, se muestra un ejemplo más específico en el caso de PEG-diamina, en el que una de las aminas está protegida por un grupo protector tal como *terc*-butil-Boc y la PEG-diamina monoprotegida resultante se hace reaccionar con una fracción de engarce portadora de funcionalidad azida:



- En este caso, el grupo amina se puede acoplar al grupo ácido carboxílico usando una variedad de agentes de activación tales como cloruro de tionilo o reactivos de carbodiimida y N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace de amida entre el derivado de monoamina-PEG y la fracción de engarce portadora de azida. Después de la formación exitosa del enlace de amida, el derivado que contiene azida protegida con *N-terc*-butil-Boc resultante puede usarse directamente para modificar moléculas bioactivas o puede elaborarse más para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo *N-t*-Boc se puede hidrolizar mediante el tratamiento con ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante puede usarse como un mango sintético para instalar otras funcionalidades útiles tales como grupos maleimida, disulfuros activados, ésteres activados, etc., para la creación de valiosos reactivos heterobifuncionales.

- 50 Los derivados heterobifuncionales son particularmente útiles cuando se desea unir diferentes moléculas a cada extremo del polímero. Por ejemplo, el omega-N-amino-N-azido-PEG permitiría la unión de una molécula que tiene un grupo electrófilo activado, tal como un aldehído, cetona, éster activado, carbonato activado, etc., a un extremo del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo del PEG.

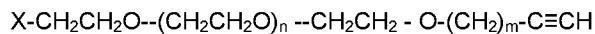
En otra realización de la invención, el derivado polimérico tiene la estructura:

X-A-POLY- B-C≡C-R

en la que:

- R puede ser bien H o un grupo alquilo, alqueno, alquioxi o arilo o arilo sustituido;  
 B es una fracción de engarce, que puede estar presente o ausente;  
 5 POLY es un polímero no antigenógeno hidrosoluble;  
 A es una fracción de engarce, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y  
 X es un segundo grupo funcional.

- Los ejemplos de una fracción de engarce para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo múltiplemente funcionalizado que contiene hasta 18 y puede contener entre 1 y 10 átomos de carbono. Se puede incluir un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de engarce para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo múltiplemente funcionalizado, que contiene hasta 10, y puede contener de 5 a 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de engarce adecuados incluyen los grupos de engarce descritos en las patentes de EE.UU. n.º 10 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior de fracciones de engarce no es de ningún modo exhaustiva y que es meramente ilustrativa, y que una amplia variedad de fracciones de engarce que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuadas para su uso en la presente invención.
- 20 Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo tal como N-hidroxisuccinimidilésteres y 1-benzotriazolilésteres, carbonato activo tal como N-hidroxisuccinimidilcarbonatos y 1-benzotriazolil-carbonatos, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminoxy, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glixoles, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno, cetona y acetileno.
- 25 Como se comprenderá, la fracción X seleccionada debería ser compatible con el grupo acetileno de modo que no se produzca la reacción con el grupo acetileno. Los derivados del polímero que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción de acetileno o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.
- 30 En otra realización de la presente invención, los derivados poliméricos comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura:

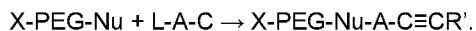


en la que:

- X es un grupo funcional como se ha descrito anteriormente;  
 n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4.000; y  
 35 m es de entre 1 y 10.

A continuación, se muestran los ejemplos específicos de cada uno de los polímeros de PEG heterobifuncionales.

- Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia y/o desvelados en el presente documento. En un procedimiento, se hace reaccionar una estructura principal polimérica hidrosoluble que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 40 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura principal del polímero un primer extremo unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo unido a un grupo nucleófilo adecuado, con un compuesto que porta tanto una funcionalidad de acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando el polímero de PEG portador de la fracción nucleófila y la molécula portadora del grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y es reemplazado por la fracción nucleófila, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado.



Como se muestra, una estructura principal polimérica preferida para su uso en la reacción tiene la fórmula X-PEG-Nu, en la que el PEG es poli(etilenglicol), Nu es una fracción nucleófila y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad de acetileno.

- 50 Los ejemplos de Nu incluyen, pero sin limitación, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxy que reaccionarían principalmente a través de un mecanismo de tipo SN2. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen aquellos grupos funcionales que reaccionarían principalmente a través de una reacción de adición nucleófila. Los ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato, y otros grupos que se espera que sufren desplazamiento nucleófilo, así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se esperan someter a la adición de
- 55

nucleófilos.

En otra realización de la presente invención, A es un engarce alifático de entre 1 y 10 átomos de carbono o un anillo de arilo sustituido de entre 6 y 14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

- 5 En otro procedimiento de preparación de los derivados poliméricos que contienen acetileno de la invención, un polímero de PEG que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, portador de un grupo funcional protegido o un agente de terminación en un extremo y un grupo saliente adecuado en el otro extremo se pone en contacto con un anión de acetileno.

A continuación, se muestra un esquema de reacción ilustrativo:



en la que:

PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de terminación tal como alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y

R' es bien H, un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi, o un grupo alquilo, alcoxilo, arilo o ariloxi sustituido.

- 15 En el ejemplo anterior, el grupo saliente L debe ser suficientemente reactivo para experimentar un desplazamiento de tipo SN2 cuando se pone en contacto con una concentración suficiente del anión acetileno. Las condiciones de reacción requeridas para realizar el desplazamiento de SN2 de grupos salientes mediante aniones de acetileno son conocidas por los expertos en la materia.

- 20 La purificación del producto en bruto normalmente se puede realizar mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, precipitación del producto seguida de cromatografía, si es necesario.

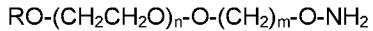
En algunos casos, los polipéptidos bG-CSF de la invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos no naturales, en los que uno o más aminoácidos no codificados de forma natural están enlazados a polímeros hidrosolubles (incluyendo, pero sin limitación, PEG y/u oligosacáridos). En algunos casos, los polipéptidos bG-CSF de la invención comprenden además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales enlazados a polímeros hidrosolubles. En algunos casos, los polipéptidos bG-CSF de la invención comprenden uno o más aminoácidos no codificados de forma natural enlazados a polímeros hidrosolubles y uno o más aminoácidos de origen natural enlazados a polímeros hidrosolubles. En algunas realizaciones, los polímeros hidrosolubles usados en la presente invención potencian la semivida en suero del polipéptido bG-CSF con relación a la forma no conjugada.

25 El número de polímeros hidrosolubles enlazados a un polipéptido bG-CSF (es decir, el grado de PEGilación o glicosilación) de la presente invención puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (incluyendo, pero sin limitación, aumentada o reducida) tal como la semivida *in vivo*. En algunas realizaciones, la semivida de bG-CSF aumenta al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 35 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces frente a un polipéptido no modificado.

**Derivados de PEG que contienen un grupo nucleófilo fuerte (es decir, hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida)**

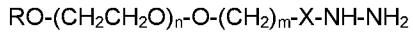
- 40 En una realización de la presente invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal que está directamente enlazada a la estructura principal de PEG.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de hidroxilamina tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

- 45 En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C = O) que puede estar presente o ausente.

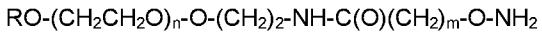
En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene semicarbazida tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal que está enlazada a la estructura principal de PEG por medio de un enlace de amida.

- 5 En algunas realizaciones, los derivados de PEG con terminación de hidroxilamina tendrá la estructura:



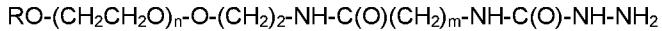
en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen hidrazina o hidrazida tendrán la estructura:

- 10  $\text{RO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-O-(CH}_2)_2\text{-NH-C(O)(CH}_2)_m\text{-X-NH-NH}_2$

en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen semicarbazida tendrán la estructura:



- 15 en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

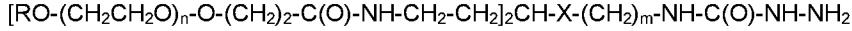
En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10 a 40 kDa, y que puede ser de 5 a 20 kDa.

- 20 En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural se modifica con un derivado de PEG que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación hidrazina o hidrazida tendrá la siguiente estructura:



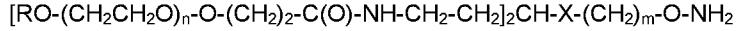
- 25 en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo de semicarbazida tendrán la estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000.

- 30 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo de hidroxilamina tendrán la estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000.

- 35 El grado y los sitios en los que los polímeros hidrosolubles están enlazados al polipéptido bG-CSF pueden modular la unión del polipéptido bG-CSF a un receptor. En algunas realizaciones, los enlaces están dispuestos de manera que el polipéptido bG-CSF se une al receptor con una  $K_d$  de aproximadamente 400 nM o inferior, con una  $K_d$  de 150 nM o inferior y, en algunos casos, con una  $K_d$  de 100 nM o inferior, según lo medido por un ensayo de unión en equilibrio, tal como el descrito en Spencer y col., *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867 (1988).

- 40 Los procedimientos y la química para la activación de polímeros, así como para la conjugación de péptidos se describen en la literatura y son conocidos en la técnica. Los procedimientos comúnmente usados para la activación de polímeros incluyen, pero sin limitación, la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (véase, 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;

- 45 G. T. Hermanson y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N. Y.; Dunn, R. L., y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Se dispone de varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y la conjugación de PEG. Véase, por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong y col., *Enzyme Micron. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado y col., "Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems" 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995).

- 5 También se pueden encontrar métodos de activación de polímeros en el documento WO 94/17039; la patente n.º 5.324.844; el documento WO 94/18247, el documento WO 94/04193, la patente de EE.UU. n.º 5.219.564, la patente de EE.UU. n.º 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de EE.UU. n.º 5.281.698 y el documento WO 93/15189; y para la conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo, pero sin limitación, factor VIII de coagulación (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (la patente de EE.UU. n.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-52 (1985)).

La PEGilación (es decir, la adición de cualquier polímero hidrosoluble) de los polipéptidos bG-CSF que contienen un aminoácido no codificado de forma natural, tal como *p*-azido-L-fenilalanina, se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento conveniente. Por ejemplo, el polipéptido bG-CSF se PEGila con un derivado de mPEG con terminación alquino. En resumen, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH sólido, con agitación, a una solución acuosa de polipéptido bG-CSF que contiene *p*-azido-L-Phe a temperatura ambiente. Por lo general, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene una pK<sub>a</sub> cerca del pH al que se va a llevar a cabo la reacción (en general, a pH 4-10). Los ejemplos de tampones adecuados para la PEGilación a pH 7,5 incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS y TES. El pH se controla de manera continua y se ajusta si es necesario. La reacción normalmente se deja proseguir durante aproximadamente 1-48 horas.

Se someten los productos de reacción subsiguientemente a cromatografía de interacción hidrófoba para separar las variantes del polipéptido bG-CSF PEGilado de mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH libre y cualquier complejo de alto peso molecular del polipéptido bG-CSF pegilado que pueda formarse cuando el PEG desbloqueado se active en ambos extremos de la molécula, reticulando de este modo las moléculas de variantes del polipéptido bG-CSF. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrófoba son tales que el mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH libre fluye a través de la columna, mientras que cualquier complejo de variantes de polipéptido bG-CSF PEGilado reticulado se eluye después de las formas deseadas, que contienen una molécula de variante de polipéptido bG-CSF conjugada con uno o más grupos PEG. Las condiciones adecuadas varían dependiendo de los tamaños relativos de los complejos reticulados frente a los conjugados deseados, y son determinadas fácilmente por los expertos en la materia. Se concentra el eluyente que contiene los conjugados deseados por ultrafiltración y se desaliniza mediante diafiltración.

Si es necesario, el polipéptido bG-CSF PEGilado obtenido a partir de la cromatografía hidrófoba puede purificarse adicionalmente mediante uno o más procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo, pero sin limitación, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice; HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo, pero sin limitación, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión portamano; cromatografía de metal-quelato; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatofoco; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo, pero sin limitación, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (incluyendo, pero sin limitación, la precipitación con sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar mediante GPC en comparación con los patrones de proteína globular (Preneta, A. Z. en "PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH" (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado de bG-CSF-PEG puede evaluarse mediante degradación proteolítica (incluyendo, pero sin limitación, escisión con tripsina) seguida del análisis de espectrometría de masas. Pepinsky RB., y col., *J. Pharmcol. & Exp. Ther.* 297(3):109-66 (2001).

#### Derivados de PEG que contienen azida

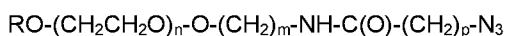
45 En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido bG-CSF con un derivado de PEG que contiene una fracción azida que reaccionará con una fracción alquino presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10 a 40 kDa.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de azida tendrá la estructura:



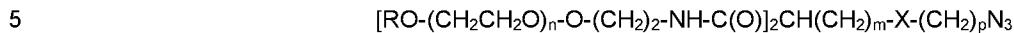
en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

En otra realización, el derivado de PEG con terminación de azida tendrá la estructura:



55 en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción azida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10 a 40 kDa, y que puede ser de 5 a 20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de azida tendrá la siguiente estructura:

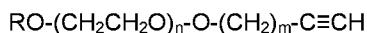


en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), en cada caso, que puede estar presente o ausente.

#### Derivados de PEG que contienen alquino

10 En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido bG-CSF con un derivado de PEG que contiene una fracción alquino que reaccionará con una fracción azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural.

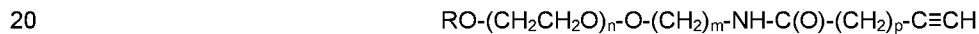
En algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de alquino tendrá la siguiente estructura:



15 en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

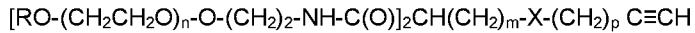
En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción azida terminal o alquino terminal que está enlazada a la estructura principal de PEG por medio de un enlace de amida.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de alquino tendrá la siguiente estructura:



en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000.

25 En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene azida se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción alquino terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10 a 40 kDa, y que puede ser de 5 a 20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con terminación de alquino tendrá la siguiente estructura:

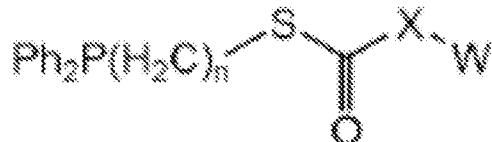


en la que R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

#### Derivados de PEG que contienen fosfina

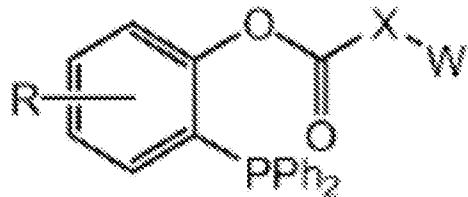
30 En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF se modifica con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (incluyendo, pero sin limitación, éster, carbonato) que comprende además un grupo arilfosfina que reaccionará con una fracción azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

35 En algunas realizaciones, el derivado de PEG tendrá la estructura:



en la que n es 1-10; X puede ser O, N, S o no estar presente, Ph es fenilo y W es un polímero hidrosoluble.

En algunas realizaciones, el derivado de PEG tendrá la estructura:



en la que X puede ser O, N, S o no estar presente, Ph es fenilo, W es un polímero hidrosoluble y R puede ser H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y grupos arilo sustituidos. Los ejemplos de grupos R incluyen, pero sin limitación, -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN y -NO<sub>2</sub>. R', R'', R''' y R'''' se refieren independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando hay más de uno de estos grupos presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la descripción anterior de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y similares).

## 15 Otros derivados de PEG y técnicas generales de PEGilación

Otras moléculas de PEG ilustrativas que se pueden enlazar a polipéptidos bG-CSF, así como los procedimientos de PEGilación incluyen, pero sin limitación, las descritas en, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 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; la patente de EE.UU. n.º 6.646.110; 5.824.778; 5.476.653; 5.219.564; 5.629.384; 5.736.625; 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.473.034; 5.516.673; 5.382.657; 6.552.167; 6.610.281; 6.515.100; 6.461.603; 6.436.386; 6.214.966; 5.990.237; 5.900.461; 5.739.208; 5.672.662; 5.446.090; 5.808.096; 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339; 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 5.559.213; 5.747.646; 5.834.594; 5.849.860; 5.980.948; 6.004.573; 6.129.912; WO 97/32607, EP 229.108, EP 402.378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 30 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en el presente documento se puede usar en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, cadena simple, cadena ramificada, cadena multiramificada, funcional única, bifuncional, multifuncional o cualquiera de sus combinaciones.

En las siguientes solicitudes de patente, se describen polímeros adicionales y derivados de PEG incluyendo, pero sin limitación, derivados de hidroxilamina(aminooxi)PEG: la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0194256, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0217532, la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0217289, la patente provisional de EE.UU. n.º 60/755.338; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/755.711; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/755.018; la solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/49397; el documento WO 2006/069246; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/743.041; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/743.040; la solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/47822; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/882.819; la patente provisional de EE.UU. n.º 60/882.500; y la patente provisional de EE.UU. n.º 60/870.594.

## **Proteínas de fusión de Fc heterólogas**

Los compuestos de bG-CSF descritos anteriormente pueden fusionarse directamente o mediante un engarce peptídico a la parte Fc de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas son moléculas que contienen cadenas polipeptídicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro, que normalmente tienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. En cada cadena, un dominio (V) tiene una secuencia de aminoácidos variable dependiendo de la especificidad del anticuerpo de la molécula. Los otros dominios (C) tienen una secuencia bastante constante común a las moléculas de la misma clase.

Como se usa en el presente documento, la parte Fc de una inmunoglobulina tiene el significado comúnmente dado al término en el campo de la inmunología. En concreto, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene al eliminar las dos regiones de unión al antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. Una forma de eliminar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con la proteasa papaína. Por lo tanto, la parte Fc se forma a partir

de fragmentos de tamaño aproximadamente igual de la región constante de ambas cadenas pesadas, que se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro. La parte Fc puede incluir las regiones bisagra y extenderse a través de los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> hasta el extremo C del anticuerpo. Se pueden encontrar regiones bisagra representativas para inmunoglobulinas humanas y de ratón en "Antibody Engineering, A Practical Guide", Borrebaeck, C. A. K., ed., W. H. Freeman y Co., 1992. La parte Fc puede incluir además uno o más sitios de glicosilación. Las secuencias de aminoácidos de numerosas proteínas Fc representativas que contienen una región bisagra, dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, y un sitio de N-glicosilación son bien conocidas en la materia.

Hay cinco tipos de regiones de Fc de inmunoglobulina humana con diferentes funciones efectoras y propiedades farmacocinéticas: IgG, IgM de IgA5, IgD e IgE. IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero. IgG también tiene la semivida más larga en suero de cualquier inmunoglobulina (23 días). A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgG se recircula eficazmente después de unirse a un receptor de Fc. Hay cuatro subclases IgG G1, G2, G3 y G4, cada una de las cuales tiene diferentes funciones efectoras. G1, G2 y G3 puede unirse a C1q y fijar el complemento mientras que G4 no. A pesar de que G3 es capaz de unirse a C1q más eficazmente que G1, G1 es más eficaz para mediar la lisis celular dirigida al complemento. G2 se fija al complemento muy inefficientemente. El sitio de unión a C1q de IgG está situado en la región carboxi terminal del dominio CH<sub>2</sub>.

Todas las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64), siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de unión a receptor de Fc de IgG está formada por restos situados tanto en la bisagra como en las regiones carboxi terminales del dominio CH<sub>2</sub>.

IgA puede existir tanto en forma monomérica como dimérica unida por una cadena en J. La IgA es la segunda Ig más abundante en suero, pero tiene una semivida de solo 6 días. IgA tiene tres funciones efectoras. Se une a un receptor específico de IgA en macrófagos y eosinófilos, que conduce a la fagocitosis y desgranulación, respectivamente. También puede fijar el complemento a través de una vía alternativa desconocida.

IgM se expresa bien como un pentámero o un hexámero, y ambos se mantienen unidos por una cadena J. IgM tiene una semivida en suero de 5 días. Se une débilmente a C1q a través de un sitio de unión ubicado en su dominio CH<sub>3</sub>. IgD tiene una semivida de 3 días en suero. No está claro qué funciones efectoras son atribuibles a esta Ig. IgE es una Ig monomérica y tiene una semivida en suero de 2,5 días. IgE se une a dos receptores de Fc que conducen la desgranulación y producen la liberación de agentes proinflamatorios.

Dependiendo del efecto *in vivo* deseado, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isotipos descritos anteriormente o pueden contener regiones Fc mutadas, en las que se hayan modificado las funciones de unión al complemento y/o al receptor de Fc. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener la parte Fc completa de una inmunoglobulina, fragmentos de la parte Fc de una inmunoglobulina o análogos de la misma fusionados a un compuesto bG-CSF.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden consistir en proteínas monocatenarias o como polipéptidos multicadena. Pueden producirse dos o más proteínas de fusión Fc de modo que interactúen a través de enlaces disulfuro que se formen de forma natural entre las regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con respecto al compuesto bG-CSF o pueden contener diferentes compuestos de bG-CSF fusionados en el extremo N de la parte Fc de la proteína de fusión.

Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región de tipo Fc o Fc puede servir para prolongar la semivida en plasma *in vivo* del compuesto de bG-CSF fusionado en el extremo N. Además, el componente bG-CSF de un compuesto de proteína de fusión debe conservar al menos una actividad biológica de bG-CSF. Puede demostrarse un aumento en la semivida terapéutica o en circulación usando el procedimiento descrito en el presente documento o conocido en técnica, en el que la semivida de la proteína de fusión se compara con la semivida del compuesto de bG-CSF solo. La actividad biológica puede determinarse mediante procedimientos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica.

Dado que la región Fc de IgG producida por proteólisis tiene la misma semivida *in vivo* que la molécula de IgG intacta y los fragmentos Fab se degradan rápidamente, se cree que la secuencia relevante para prolongar la semivida reside en los dominios CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub>. Además, se ha demostrado en la bibliografía que las velocidades catabólicas de las variantes de IgG que no se unen al receptor de Fc de alta afinidad o C1q son indistinguibles de la velocidad de eliminación del anticuerpo precursor de tipo natural, lo que indica que el sitio catabólico es distinto de los sitios implicados en el receptor Fc o unión a C1q. [Wawrzynczak y col., (1992) *Molecular Immunology* 29:221]. Los estudios de mutagénesis dirigidos usando una región Fc de IgG1 murina sugirieron que el sitio de la región Fc de IgG1 que controla la velocidad catabólica está situado en la superficie de contacto del dominio CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>. Las regiones Fc se pueden modificar en el sitio catabólico para optimizar la semivida de las proteínas de fusión. La región Fc usada para las proteínas de fusión de la presente invención se puede derivar de una región Fc de IgG1 o IgG4, y puede contener tanto las regiones CH<sub>2</sub> como CH<sub>3</sub> incluyendo la región bisagra.

#### **Proteínas de fusión de albúmina heterólogas**

El bG-CSF descrito en el presente documento se puede fusionar directamente o mediante un engarce peptídico, un polímero hidrosoluble o un engarce de profármaco a la albúmina o un análogo, fragmento o derivado del mismo. En

general, las proteínas de albúmina que forman parte de las proteínas de fusión de la presente invención pueden derivarse de la albúmina clonada de cualquier especie, incluyendo la humana. La albúmina sérica humana (HSA) consiste en una única cadena polipeptídica no glicosilada de 585 aminoácidos con un peso molecular de fórmula de 66.500. La secuencia de aminoácidos de HSA humana es conocida [véase Meloun y col (1975) FEBS Letters 58:136;

- 5 Behrens, y col. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn y col. (1981) *Nucleic Acid Research* 9:6102-6114; Minghetti y col. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747]. Se ha descrito una variedad de variantes polimórficas, así como análogos y fragmentos de albúmina. [Véase Weitkamp, y col., (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219]. Por ejemplo, en el documento EP 322.094, diversas formas más cortas de HSA. Se divulan algunos de estos fragmentos de HSA, incluyendo HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) y HSA(1-419) y los fragmentos entre 1-369 y 1-419. El documento EP 399.666 desvela fragmentos de albúmina que incluyen HSA(1-177) y HSA(1-200), y los fragmentos entre HSA(1-177) y HSA(1-200).

10 Se entiende que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención incluyen compuestos de bG-CSF que están acoplados a cualquier proteína de albúmina incluyendo fragmentos, análogos y derivados en los que dicha proteína de fusión es biológicamente activa y tiene una semivida en plasma más larga que el compuesto de bG-CSF solo. Por lo tanto, la parte de albúmina de la proteína de fusión no necesita tener una semivida en plasma igual a la de la albúmina humana nativa. Se conocen o se pueden generar fragmentos, análogos y derivados que tienen semivididas más largas o que tienen semivididas intermedias a las de la albúmina humana nativa y el compuesto de bG-CSF de interés.

15 Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención engloban proteínas que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos en el compuesto de bG-CSF y/o la parte Fc o de albúmina de la proteína de fusión. Una "sustitución conservativa" es el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene la misma carga electrónica neta y aproximadamente el mismo tamaño y la misma forma. Los aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos alifáticos o alifáticos sustituidos tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos de sus cadenas laterales difiere en no más de aproximadamente cuatro. Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramificaciones de sus cadenas laterales difiere en no más de uno. Se considera que los aminoácidos con grupos fenilo o fenilo sustituido en sus cadenas laterales tienen aproximadamente el mismo tamaño y la misma forma. A menos que se proporcione de otro modo específicamente en el presente documento, las sustituciones conservativas se hacen preferentemente con aminoácidos de origen natural.

20 Las proteínas de albúmina e inmunoglobulina de tipo natural se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes. Por ejemplo, estas proteínas se pueden obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido o células que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Las bibliotecas pueden explorarse con sondas diseñadas usando la secuencia de ADN o de proteína publicada para la proteína particular de interés. Por ejemplo, las regiones constantes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se describen en Adams, y col. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet y col. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:6027-6031; Rice y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 79:7862-7862; Falkner y col. (1982) *Nature* 298:286-288; y Morrison y col. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Algunas referencias que desvelan secuencias de proteínas albúmina y de ADN incluyen Meloun y col. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens y col. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn y col. (1981) *Nucleic Acid Research* 9:6102-6114; y Minghetti y col. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747.

#### **Caracterización de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención**

25 Existen numerosos procedimientos de caracterización de las proteínas de fusión de la presente invención. Algunos de estos procedimientos incluyen, pero sin limitación: SDS-PAGE acoplado con procedimientos de tinción de proteínas o inmunotransferencia usando anticuerpos anti-IgG o anti-HSA. Otros procedimientos incluyen la espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (EM-MALDI), la cromatografía líquida/espectrometría de masas, el enfoque isoeléctrico, el intercambio aniónico analítico, el cromatoenfoque y el dicroísmo circular, por ejemplo.

#### **Mejora de la afinidad por la albúmina sérica**

30 También se pueden fusionar diversas moléculas a los polipéptidos bG-CSF de la invención para modular la semivida de los polipéptidos bG-CSF en suero. En algunas realizaciones, las moléculas se enlazan o fusionan a los polipéptidos bG-CSF de la invención para potenciar la afinidad por la albúmina sérica endógena en un animal.

35 40 45 Por ejemplo, en algunos casos, se realiza una fusión recombinante de un polipéptido bG-CSF y una secuencia de unión a la albúmina. Los ejemplos de secuencias de unión a albúmina incluyen, pero sin limitación, el dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica por ejemplo, Makrides y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) y Sjolander y col., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997) o péptidos de unión a la albúmina tales como los descritos en, por ejemplo, Dennis, y col., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002).

40 45 50 En otras realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la presente invención se acilan con ácidos grasos. En algunos casos, los ácidos grasos potencian la unión a la albúmina sérica. Véase, por ejemplo, Kurtzhals y col., *Biochem. J.* 312:725-731 (1995).

55 En otras realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la invención se fusionan directamente con albúmina sérica

(incluyendo, pero sin limitación, albúmina de suero humano). Los expertos en la materia reconocerán que hay una amplia variedad de otras moléculas que también se puede unir a bG-CSF en la presente invención para modular la unión a la albúmina sérica u otros componentes del suero.

#### **X. Glicosilación de polipéptidos de bG-CSF**

- 5 La invención incluye polipéptidos bG-CSF que incorporan uno o más aminoácidos no codificados de forma natural portadores de restos de sacáridos. Los restos de sacáridos pueden ser naturales (incluyendo, pero sin limitación, N-acetilglucosamina) o no naturales (incluyendo, pero sin limitación, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos se pueden enlazar a los aminoácidos no codificados de forma natural mediante un enlace glucosídico unido a N u O (incluyendo, pero sin limitación, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (incluyendo, pero sin limitación una oxima o el glucósido enlazado a C o S correspondiente).

10 Las fracciones sacárido (incluyendo, pero sin limitación, glicosilo) se pueden añadir a los polipéptidos bG-CSF *in vivo* o *in vitro*. Un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se puede modificar con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxi para generar el polipéptido glicosilado correspondiente enlazado mediante un enlace oxima. Una vez unido al aminoácido no codificado de manera natural, el sacárido puede elaborarse más mediante el tratamiento con glicosiltransferasas y otras enzimas para generar un oligosacárido unido al bG-CSF. Véase, por ejemplo, H. Liu y col. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

15 Un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se puede modificar directamente con un glicano con una estructura definida preparada como un derivado de aminooxi. Un experto en la materia reconocerá que se pueden usar otras funcionalidades, incluyendo azida, alquino, hidrazida, hidrazina y semicarbazida, para enlazar el sacárido al aminoácido no codificado de forma natural.

20 Un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene azida o alquinilo puede modificarse después, incluyendo, pero sin limitación, una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen con, incluyendo pero sin limitación, derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Este procedimiento permite que las proteínas se modifiquen con una selectividad extremadamente alta.

#### **XI. Dímeros y multímeros de bG-CSF**

25 La presente invención también proporciona combinaciones de bG-CSF y análogo de bG-CSF tales como homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrámeros, etc.) donde bG-CSF que contiene uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se une a otra variante de bG-CSF o bG-CSF del mismo o cualquier otro polipéptido que no sea bG-CSF o una variante bG-CSF del mismo, ya sea directamente a la estructura principal del polipéptido o a través de un engarce. Debido a su mayor peso molecular en comparación con los monómeros, el dímero de bG-CSF o los conjugados multiméricos pueden presentar propiedades nuevas o deseables, incluyendo, pero sin limitación, diferentes semivididas farmacológica, farmacocinética, farmacodinámica, terapéutica modulada o semivida en plasma modulada con respecto al bG-CSF monomérico. En algunas realizaciones, los dímeros de bG-CSF de la invención modularán la transducción de señales del receptor de G-CSF.

30 En otras realizaciones, los dímeros o multímeros de bG-CSF de la presente invención actuarán como un antagonista, agonista o modulador del receptor.

35 Una o más de las moléculas de bG-CSF presentes en un dímero o multímero que contiene bG-CSF comprenden un aminoácido no codificado de forma natural enlazado a un polímero hidrosoluble como se define en la reivindicación 1.

40 En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF están enlazados directamente, incluyendo, pero sin limitación, a través de un enlace amida Asn-Lys o un enlace disulfuro Cys-Cys. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF y/o la molécula no bG-CSF enlazada comprenderán diferentes aminoácidos no codificados de forma natural para facilitar la dimerización, incluyendo, pero sin limitación, un alquino de un aminoácido no codificado de forma natural de un primer polipéptido bG-CSF y una azida de un segundo aminoácido no codificado de forma natural de una segunda molécula se conjugarán a través de una cicloadición [3+2] de Huisgen. Como alternativa, bG-CSF y/o la molécula no bG-CSF enlazada que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona se pueden conjugar con un segundo polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene hidroxilamina, y los polipéptidos se hacen reaccionar a través de la formación de la oxima correspondiente.

45 Como alternativa, los dos polipéptidos bG-CSF y/o la molécula no bG-CSF enlazada están enlazados a través de un engarce. Se puede usar cualquier engarce hetero- u homobifuncional para enlazar las dos moléculas y/o las moléculas no bG-CSF enlazadas, que pueden tener la misma o diferente secuencia primaria. En algunos casos, el engarce usado para unir el bG-CSF y/o las moléculas no bG-CSF enlazadas entre sí puede ser un reactivo de PEG bifuncional. El engarce puede tener un amplio intervalo de peso molecular o longitud molecular. Se pueden usar engarces de peso molecular mayor o menor para proporcionar una relación espacial o configuración deseada entre bG-CSF y la entidad enlazada o entre bG-CSF y su receptor, o entre la entidad enlazada y su pareja de unión, si existe. También se pueden usar engarces que tengan una longitud molecular mayor o menor para proporcionar un espacio deseado o una flexibilidad deseada entre bG-CSF y la entidad enlazada, o entre la entidad enlazada y su pareja de unión, si existe.

50 En algunas realizaciones, la invención proporciona engarces bifuncionales hidrosolubles que tienen una estructura de

5 mancuerna que incluye: a) una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, una hidroxilamina o una fracción que contiene carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura principal polimérica; y b) al menos un segundo grupo funcional de un segundo extremo de la estructura principal polimérica. El segundo grupo funcional puede ser el mismo o diferente que el primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional. La invención proporciona, en algunas realizaciones, compuestos hidrosolubles que comprenden al menos un brazo de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona multímeros que comprenden uno o más polipéptidos bG-CSF, formados mediante reacciones con polímeros activados hidrosolubles que tienen la estructura:



15 en la que n es de aproximadamente 5 a 3.000, m es 2-10, X puede ser una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, un grupo aminooxi, una hidroxilamina, un acetilo o una fracción que contiene carbonilo, y R es un grupo de terminación, un grupo funcional, o un grupo saliente que puede ser igual o diferente que X. R puede ser, por ejemplo, un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, N-  
20 hidroxisuccinimidiléster y 1-benzotriazoliléster, N-hidroxisuccinimidcarbonato y 1-benzotriazolil-carbonato, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glixoles, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno y cetona.

25 **XII. Medición de la actividad del polipéptido bG-CSF y la afinidad de bG-CSF por un receptor**

20 La actividad del polipéptido bG-CSF puede determinarse usando ensayos convencionales o conocidos *in vitro* o *in vivo*. Los polipéptidos bG-CSF pueden analizarse para determinar su actividad biológica mediante procedimientos adecuados conocidos en la técnica. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, los descritos en Hedari y col. "Veterinary Immunology and Immunopathology" (2001) 81:45-57 y ensayos que evalúan las actividades biológicas de hG-CSF.

25 Los polipéptidos bG-CSF pueden analizarse por su capacidad para regular positivamente CD11a, CD11b, CD11c y/o CD18 en los neutrófilos. La medición de esta actividad se puede medir mediante FACS según lo descrito por Hedari y col (*supra*). Otros ensayos adicionales conocidos por los expertos en la materia miden la activación de los neutrófilos, incluyendo, pero sin limitación, ensayos que miden L-selectina. Otros ensayos que pueden realizarse evalúan la proliferación y/o diferenciación de las células por los polipéptidos bG-CSF de la invención.

30 Los polipéptidos bG-CSF pueden analizarse para determinar su capacidad para unirse a un receptor. Se puede preparar un receptor de G-CSF usando técnicas y procedimientos que son conocidos por los expertos en la materia. El receptor de hG-CSF se puede preparar como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.574.136. Por ejemplo, se pueden usar células o estirpes celulares que actúan en respuesta a G-CSF o se unen a G-CSF (incluyendo, pero sin limitación, células que contienen receptores de G-CSF activos tales como células productoras de receptor de G-CSF recombinante) para controlar la unión al receptor de bG-CSF. Para un polipéptido bG-CSF no PEGilado o PEGilado que comprende un aminoácido no natural, la afinidad de bG-CSF por su receptor o por otro receptor de G-CSF se puede medir usando un biosensor BIACore™ (Pharmacia). Los ensayos de unión adecuados incluyen, pero sin limitación, ensayos BIACore (Pearce y col., *Biochemistry* 38:81-89 (1999)) y ensayos AlphaScreen™ (PerkinElmer).  
35 AlphaScreen™ es un ensayo de proximidad luminiscente no radiactivo basado en perlas en el que las perlas donantes son excitadas por un láser a 680 nm para liberar oxígeno singlete. El oxígeno singlete se difunde y reacciona con el derivado de tioxeno en la superficie de las esferas aceptoras, lo que conduce a la emisión de fluorescencia a -600 nm. La emisión de fluorescencia ocurre solamente cuando las perlas donantes y aceptoras se ponen en proximidad cercana por interacciones moleculares que ocurren cuando cada una está enlazada al ligando y al receptor, respectivamente. Esta interacción ligando-receptor puede competirse usando variantes de unión al receptor, mientras que las variantes no de unión no competirán.

40 La actividad del polipéptido bG-CSF puede determinarse usando ensayos convencionales o conocidos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se pueden usar células o estirpes celulares que proliferan en presencia de hG-CSF o se unen a hG-CSF (incluyendo, pero sin limitación, células que contienen receptores de G-CSF activos, tales como células de médula ósea de ratón, WEHI-3B (D+), AML-193 (ATCC), o células productoras de receptor de G-CSF recombinante) para controlar la unión al receptor de bG-CSF. Véase, por ejemplo, King y col., *Exp. Hematol.* 20:223 (1992); la patente de EE.UU. n.º 6.385.505. Los modelos animales *in vivo*, así como los ensayos clínicos en seres humanos para analizar la actividad de hG-CSF incluyen los descritos en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.166.183; 6.565.841; 6.162.426; 5.718.893. Dichos modelos se pueden usar para evaluar la actividad de bG-CSF.

45 55 Independientemente de qué procedimientos se usen para crear los presentes análogos de bG-CSF, los análogos se someten a ensayos de actividad biológica. Se pueden realizar ensayos de timidina tritiada para determinar el grado de división celular. Sin embargo, se pueden usar otros ensayos biológicos para determinar la actividad deseada. Los ensayos biológicos tales como el ensayo de la capacidad para inducir la diferenciación terminal en la estirpe celular

leucémica WEHI-3B (D+) de ratón también proporcionan una indicación de la actividad de G-CSF. Véase Nicola y col., *Blood* 54: 614-27 (1979). Se pueden usar otros ensayos *in vitro* para determinar la actividad biológica. Véase Nicola, *Ann. Rev. Biochem.* 58: 45-77 (1989). En general, el ensayo de actividad biológica debe proporcionar análisis para el resultado deseado, tal como un aumento o una reducción de la actividad biológica (en comparación con G-CSF no alterado), actividad biológica diferente (en comparación con G-CSF no alterado), análisis de afinidad del receptor o de la pareja de unión, cambios conformacionales o estructurales del bG-CSF en sí mismo o su receptor (en comparación con el bG-CSF modificado) o análisis de la semivida en suero.

Se ha informado previamente que las células WEHI-3BD<sup>+</sup> y las células leucémicas humanas de leucemias recién diagnosticadas se unirán a G-CSF murino marcado con <sup>125</sup>I y que esta unión puede competir por la adición de G-CSF sin marcar o CSF-β humano. Se ensaya la capacidad del G-CSF natural y del bG-CSF para competir por la unión de <sup>125</sup>I-G-CSF a células leucémicas humanas y murinas. El G-CSF natural altamente purificado (> 95 % de pureza, 1 µg) es yodado [Tejedor y col., *Anal. Biochem.*, 127, 143 (1982)], y se separa de los reactivos mediante filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La actividad específica de <sup>125</sup>I-G-CSF natural es de aproximadamente 100 µ Ci/µg de proteína.

La compilación anterior de referencias para metodologías de ensayo no es exhaustiva, y los expertos en la materia reconocerán otros ensayos útiles para ensayar el resultado final deseado. Las modificaciones de dichos ensayos son conocidas por los expertos en la materia.

### **XIII. Medición de la potencia, de la semivida *in vivo* funcional y de parámetros farmacocinéticos**

Un aspecto importante de la invención es la semivida biológica prolongada que se obtiene mediante la construcción del polipéptido b-GCSF con conjugación del polipéptido a una fracción polimérica hidrosoluble. La reducción rápida posterior a la administración de las concentraciones en suero del polipéptido bG-CSF ha hecho que sea importante evaluar las respuestas biológicas al tratamiento con el polipéptido bG-CSF conjugado y no conjugado y sus variantes. El polipéptido bG-CSF conjugado y las variantes del mismo de la presente invención pueden tener semivididas en suero prolongadas también después de la administración, por ejemplo, subcutánea o i.v., lo que permite realizar la medición, por ejemplo, mediante el procedimiento ELISA o mediante un ensayo de detección primaria. Se pueden usar kits de ELISA o RIA de fuentes comerciales. Otro ejemplo de un ensayo para la medición de la semivida *in vivo* de hG-CSF o sus variantes se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.824.778. La medición de la semivida biológica *in vivo* se lleva a cabo como se describe en el presente documento.

La potencia y la semivida funcional *in vivo* de un polipéptido hG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural se puede determinar de acuerdo con el protocolo descrito en las patentes de EE.UU. n.º 6.646.110; 6.555.660; 6.166.183; 5.985.265; 5.824.778; 5.773.581. Estos protocolos también se pueden usar para bG-CSF.

Los parámetros farmacocinéticos para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural se pueden evaluar en ratas macho Sprague-Dawley normales (N = 5 animales por grupo de tratamiento). Los animales recibirán una sola dosis de 25 ug/rata i.v. o 50 ug/rata s.c., y se tomarán aproximadamente de 5 a 7 muestras de sangre de acuerdo con un ciclo de tiempo predefinido, en general, cubriendo aproximadamente 6 horas para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural no conjugado con un polímero hidrosoluble y aproximadamente 4 días para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural y conjugado con un polímero hidrosoluble. Los datos farmacocinéticos para bG-CSF sin un aminoácido no codificado de forma natural se pueden comparar directamente con los datos obtenidos para los polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural.

Los estudios farmacocinéticos de los polipéptidos bG-CSF pueden realizarse en ratones, ratas o en un primate, por ejemplo, monos *cynomolgus*. Por lo general, se administra una sola inyección por vía subcutánea o intravenosa, y se controlan los niveles de bG-CSF en suero a lo largo del tiempo.

La patente de EE.UU. n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932 describen una serie de modelos animales que pueden usarse para evaluar los polipéptidos bG-CSF de la invención. Los estudios en animales que pueden realizarse incluyen ganado expuesto a *Pasteurella hemolytica*, ganado con exposición bacteriana de la infección de las glándulas mamarias/mastitis (*Klebsiella pneumonia*). Otros estudios que se pueden realizar evalúan el control, la incidencia y la duración de la enfermedad respiratoria bovina, o la prevención de la mastitis coliforme. Los procedimientos para evaluar la salud de los animales, la producción de leche, el recuento de neutrófilos y otros parámetros son conocidos por los expertos en la materia. Otros modelos que se pueden usar para evaluar polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen, pero sin limitación, modelos animales de infección o exposición a infección tales como un modelo de hámster de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*, un modelo de pielonefritis por *Candida albicans* en ratas, modelos que implican potros neonatales y modelos que implican cerdos en crecimiento. Algunos de estos modelos se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932. Modelos tales como estos son conocidos por los expertos en la materia.

Se describen ejemplos adicionales de ensayos para la medición de la actividad biológica *in vivo* de hG-CSF o variantes de los mismos en las patentes de EE.UU. n.º 5.681.720; 5.795.968; 5.824.778; 5.985.265; y Bowen y col., *Experimental Hematology* 27:425-432 (1999).

**XIV. Administración y composiciones farmacéuticas**

- Los polipéptidos o las proteínas de la invención se emplean opcionalmente para usos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Dichas composiciones, por ejemplo, comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo o excipiente incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y/o combinaciones de los mismos. La formulación está hecha para adaptarse al modo de administración. En general, los expertos en la materia conocen procedimientos de administración de proteínas, y se pueden aplicar a la administración de los polipéptidos de la invención. Las composiciones pueden estar en una forma hidrosoluble, tal como estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables, que se entiende que incluyen sales tanto de adición de ácido como de base. La patente de EE.UU. n.º 6.497.869 trata formulaciones y la administración de polipéptidos G-CSF, incluyendo, pero sin limitación, hG-CSF y bG-CSF. Se describen las sales que comprenden iones sulfato tales como sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio y mezclas de los mismos, así como agentes de tamponamiento tales como acetato, citrato, fosfato, HEPES, BES, TAPS, EPPS, TES y mezclas de los mismos.
- Las composiciones terapéuticas que comprenden uno o más polipéptidos de la invención se ensayan opcionalmente en uno o más modelos animales de la enfermedad *in vitro* y/o *in vivo*, para confirmar la eficacia, el metabolismo tisular y para estimar las dosis, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos habituales en la materia. En particular, las dosis pueden determinarse inicialmente por la actividad, estabilidad u otras medidas adecuadas de aminoácidos no naturales del presente documento en comparación con homólogos naturales de aminoácidos (incluyendo, pero sin limitación, la comparación de un polipéptido bG-CSF modificado para incluir uno o más aminoácidos no naturales en un polipéptido bG-CSF de aminoácidos natural y la comparación de un polipéptido bG-CSF modificado para incluir uno o más aminoácidos no naturales para un tratamiento con bG-CSF actualmente disponible), es decir, en un ensayo relevante.
- La administración se realiza mediante cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir una molécula en contacto definitivo con células sanguíneas o de tejido. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales de la invención se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Se dispone de procedimientos adecuados para administrar dichos polipéptidos en el contexto de la presente invención a un paciente y, aunque se puede usar más de una vía para administrar una determinada composición, una vía particular suele poder proporcionar una acción o reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición que se administra en particular, así como también por el procedimiento usado en particular para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención.
- Los polipéptidos bG-CSF de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía convencional adecuada para proteínas o péptidos, incluyendo, pero sin limitación, vía parenteral, por ejemplo, inyecciones incluyendo, pero sin limitación, vía subcutánea o intravenosa, o cualquier otra forma de inyecciones o infusiones. Las composiciones polipeptídicas pueden administrarse mediante varias vías incluyendo, pero sin limitación, los medios oral, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, transdérmico, subcutáneo, tópico, sublingual, intravascular, intramamario o rectal. Las composiciones que comprenden polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificado, también se pueden administrar a través de liposomas. Dichas vías de administración y formulaciones apropiadas son conocidas en general por los expertos en la materia. El polipéptido bG-CSF puede usarse solo o en combinación con otros componentes adecuados tales como un vehículo farmacéutico. El polipéptido bG-CSF se puede usar en combinación con otros agentes o agentes terapéuticos.
- El polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no natural, solo o en combinación con otros componentes adecuados, también se puede preparar en formulaciones en aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para administrarse por inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.
- Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones de bG-CSF pueden presentarse en envases sellados monodosis o multidosis, tales como ampollas y viales.
- La administración parenteral y la administración intravenosa son procedimientos de administración preferidos. En particular, las vías de administración que ya están en uso para terapias de homólogos de aminoácidos naturales (incluyendo, pero sin limitación, aquellas normalmente usadas para EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, interleucinas, anticuerpos, FGF y/o cualquier otra proteína administrada farmacéuticamente), junto con las formulaciones en uso

actual, proporcionan vías de administración y formulación preferidas para los polipéptidos de la invención.

La dosis administrada a un animal, en el contexto de la presente invención, es suficiente para tener una respuesta terapéutica beneficiosa en el animal a lo largo del tiempo, u otra actividad apropiada, dependiendo de la aplicación.

5 La dosis se determina por la eficacia del vector o la formulación en particular, y la actividad, estabilidad o semivida en suero del polipéptido de aminoácidos no naturales empleado, y el estado del animal, así como el peso corporal o el área superficial del animal que se va a tratar. El tamaño de la dosis también está determinado por la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un vector, una formulación o similar en particular en un determinado animal.

10 Al determinarse la cantidad eficaz del vector o de la formulación que se administrará en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad, el veterinario evalúa los niveles circulantes en plasma, las toxicidades de la formulación, la progresión de la enfermedad y/o cuando sea relevante, la producción de anticuerpos anti-polipéptido de aminoácidos no naturales.

15 La dosis administrada está normalmente en el intervalo equivalente a la dosis de proteínas terapéuticas usadas en la actualidad, ajustadas para la actividad alterada o la semivida en suero de la composición relevante. Los vectores o las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden complementar las condiciones del tratamiento mediante cualquier terapia convencional conocida, incluyendo la administración de anticuerpos, la administración de vacunas, la administración de agentes citotóxicos, polipéptidos de aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, modificadores de la respuesta biológica y similares.

20 Para la administración, las formulaciones de la presente invención se administran a una velocidad determinada por la DL<sub>50</sub> o la DE<sub>50</sub> de la formulación relevante, y/o la observación de cualquier efecto secundario de los polipéptidos de aminoácidos no naturales a diversas concentraciones, incluyendo, pero sin limitación, como se aplica a la masa y la salud general del animal. La administración puede realizarse a través de dosis únicas o divididas.

25 Si un animal que se somete a infusión de una formulación desarrolla fiebre, escalofríos o dolores musculares, puede recibir la dosis adecuada de aspirina, ibuprofeno, acetaminofeno u otro fármaco para el control del dolor/fiebre apropiado para los animales. Los animales que experimentan reacciones a la infusión, tales como fiebre, dolores musculares y escalofríos, se medicaron previamente 30 minutos antes de las futuras infusiones con aspirina, acetaminofeno o, incluyendo, pero sin limitación, difenhidramina u otro fármaco apropiado para animales. La meperidina puede usarse para los escalofríos y los dolores musculares más severos que no responden rápidamente a los antipiréticos ni a los antihistamínicos. La infusión celular se ralentiza o se interrumpe dependiendo de la gravedad 30 de la reacción.

35 Los polipéptidos bG-CSF de la invención se pueden administrar directamente a un sujeto animal. La administración se realiza mediante cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir el polipéptido bG-CSF en un sujeto. Las composiciones de polipéptido bG-CSF de acuerdo con las realizaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, inhalación (incluyendo, pero sin limitación, a través de un aerosol), bucal (incluyendo, pero sin limitación, sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo, pero sin limitación, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intrarradicular, intraarterial o intravenosa), tópica (es decir, superficies de la piel y de la mucosa, incluyendo las superficies de las vías respiratorias), pulmonar, intraocular, intranasal y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la afección que se trate. La administración puede ser local o sistémica. Las 40 formulaciones de compuestos se pueden presentar en envases sellados monodosis o multidosis, tales como ampollas y viales. Los polipéptidos bG-CSF de la invención se pueden preparar en una mezcla en una forma inyectable de dosificación unitaria (incluyendo, pero sin limitación, solución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos bG-CSF de la invención también se pueden administrar mediante infusión continua (usando, incluyendo, pero sin limitación, minibombas tales como bombas osmóticas), formulaciones 45 en depósito único o de depósito de liberación lenta.

50 Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las soluciones y suspensiones se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

55 La criodesecación es una técnica comúnmente empleada para presentar proteínas, que sirve para eliminar el agua del preparado de proteínas de interés. La criodesecación o liofilización es un procedimiento mediante el que el material que se va a secar se congela primero, y luego se elimina el hielo o el disolvente congelado por sublimación en un entorno de vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones previamente liofilizadas para mejorar la estabilidad durante el procedimiento de criodesecación y/o para mejorar la estabilidad del producto liofilizado durante el almacenamiento. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9):26-30 (1990) y Arakawa y col. *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

- El secado por pulverización de productos farmacéuticos también es conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, véase Broadhead, J. y col., "The Spray Drying of Pharmaceuticals", en *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18 (11 y 12), 1169-1206 (1992). Además de productos farmacéuticos de molécula pequeña, se ha secado por pulverización una variedad de materiales biológicos, y estos incluyen: enzimas, sueros, plasma, microorganismos y levaduras. El secado por pulverización es una técnica útil, porque puede convertir un preparado farmacéutico líquido en una un polvo fino, de no espolvoreo o aglomerado en un procedimiento de una sola etapa. La técnica básica comprende las cuatro siguientes etapas: a) atomización de la solución de alimentación en un pulverizado; b) contacto de aire de pulverización; c) secado del pulverizado; y d) separación del producto seco del aire de secado. Las patentes de EE.UU. n.º 6.235.710 y 6.001.800 describen la preparación de eritropoyetina recombinante mediante secado por pulverización.
- Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente comprende además un excipiente o estabilizante. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición que se administre en particular; así como por el procedimiento usado en particular para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (incluyendo vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales) de la presente invención (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17<sup>a</sup> ed. 1985)).
- Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, tampones que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina, imidazol, acetato, bicarbonato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo, pero sin limitación, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular incluyendo, pero sin limitación, los de menos de aproximadamente 10 restos; proteínas, incluyendo, pero sin limitación, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos incluyendo, pero sin limitación, polivinilpirrolidona; aminoácidos incluyendo, pero sin limitación, glicina, glutamina, asparagina, arginina, histidina o derivados de histidina, metionina, glutamato o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo, pero sin limitación, trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes incluyendo, pero sin limitación, EDTA y edentato disódico; iones metálicos divalentes incluyendo, pero sin limitación, cinc, cobalto o cobre; alcoholes de azúcar incluyendo, pero sin limitación, manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal incluyendo, pero sin limitación, sodio y cloruro de sodio; cargas tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; agentes colorantes; y/o tensioactivos no iónicos incluyendo pero sin limitación Tween™ (incluyendo, pero sin limitación, Tween 80 (polisorbato 80) y Tween 20 (polisorbato 20), Pluronics™ y otros ácidos plurónicos, incluyendo, pero sin limitación, ácido plurónico F68 (poloxámero 188) o PEG. Los tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, poliéteres basados en polí(óxido de etileno)-polí(óxido de propileno)-polí(óxido de etileno), es decir, (PEO-PPO-PEO), o polí(óxido de propileno)-polí(óxido de etileno)-polí(óxido de propileno), es decir, (PPO-PEO-PPO), o una combinación de los mismos. PEO-PPO-PEO y PPO-PEO-PPO están disponibles en el mercado con los nombres comerciales Pluronics™, R-Pluronics™, Tetrosics™ y R-Tetrosics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) y se describen con más detalle en la patente de EE.UU. n.º 4.820.352. Otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno pueden ser tensioactivos adecuados. Se puede usar un tensioactivo o una combinación de tensioactivos para estabilizar el bG-CSF PEGilado contra uno o más estreses incluyendo, pero sin limitación, el estrés como resultado de la agitación. Algunos de los anteriores pueden denominarse "agentes de carga". Algunos también pueden denominarse "modificadores de la tonicidad". También se pueden aplicar conservantes adecuados incluyendo, pero sin limitación, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, metacresol, metil/propil-parabeno, cresol y fenol, o una combinación de los mismos. La patente de EE.UU. n.º 7.144.574 describe materiales adicionales que pueden ser adecuados en composiciones farmacéuticas y formulaciones de la invención, así como otros preparados de administración.
- Los polipéptidos bG-CSF de la invención, también pueden administrarse por o como parte de sistemas de liberación sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, incluyendo, pero sin limitación, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen materiales biocompatibles tales como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982), acetato de etilenvinilo (Langer y col., supra) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988), polilactidas (ácido poliláctico) (patente de EE.UU. n.º 3.773.919; documento EP 58.481), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polianhídridos de polilactida-co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etyl-L-glutamato (Sidman y col., *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)), poli (orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen el compuesto se preparan mediante procedimientos conocidos en sí: documento DE 3.218.121; Eppstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 4030-4034 (1980); documento EP 52.322; documento EP 36.676; la patente de EE.UU. n.º 4.619.794; el documento EP 143.949; la patente de EE.UU. n.º 5.021.234; la solicitud de patente japonesa 83-118008; las patentes de EE.UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento EP 102.324.
- Los polipéptidos bG-CSF atrapados en liposomas pueden prepararse mediante los procedimientos descritos en, por ejemplo, el documento DE 3.218.121; Eppstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:3688-3692 (1985); Hwang y

col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 77: 4030-4034 (1980); documento EP 52.322; documento EP 36.676; la patente de EE.UU. n.º 4.619.794; el documento EP 143.949; la patente de EE.UU. n.º 5.021.234; la solicitud de patente japonesa 83-118008; las patentes de EE.UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento EP 102.324. . La composición y el tamaño de los liposomas son bien conocidos o pueden ser fácilmente determinados empíricamente por un experto en la materia. Algunos ejemplos de liposomas spm como se describen en, por ejemplo, Park J. W., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 92:1327-1331 (1995); Lasic D. y Papahadjopoulos D. (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998); Drummond DC y col., "Liposomal drug delivery systems for cancer therapy", en Teicher B. (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002); Park J. W., y col., *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C. y col., *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003). Se ha descrito una serie de formulaciones de hG-CSF y son conocidas por los expertos en la materia.

La dosis administrada a un animal en el contexto de la presente invención debe ser suficiente para causar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. En general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total del polipéptido bG-CSF de la presente invención administrada por vía parenteral por dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,01 µg/kg/día a aproximadamente 100 µg/kg, o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, del peso corporal del animal, aunque esto está sujeto a discreción terapéutica. La frecuencia de dosificación también está sujeta a la discreción terapéutica, y puede ser más frecuente o menos frecuente que los productos de polipéptido bG-CSF disponibles en el mercado aprobados para su uso en animales. En general, un polipéptido bG-CSF PEGilado de la invención se puede administrar mediante cualquiera de las vías de administración descritas anteriormente.

#### **20 XV. Usos terapéuticos de los polipéptidos bG-CSF de la invención**

Los polipéptidos b-GCSF de la invención son útiles para tratar una amplia selección de trastornos. La administración de productos de hG-CSF produce la formación de glóbulos blancos en seres humanos. Por lo tanto, la administración de los polipéptidos bG-CSF de la presente invención puede ser útil para prevenir la infección en animales que están en riesgo de infección. Los polipéptidos bG-CSF de la presente invención se pueden administrar a animales que tienen una infección. Las infecciones que pueden tratarse con polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen, pero sin limitación, mastitis y fiebre del transporte. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal entre dos semanas y un día antes del parto. En una realización de la presente invención, un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra a un animal entre dos semanas y un día antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre dos semanas y un día antes del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre dos semanas y un día antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto.

En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre dos semanas antes y el día del transporte. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del transporte. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal entre una semana y un día antes del transporte, y además, se administra el día del transporte o hasta una semana después del transporte.

En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal siete días antes del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal siete días antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a un animal siete días antes del parto, y además, se administra el día del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal siete días antes del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal una semana antes del parto, y además, se administra el día del parto o hasta una semana después del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a un animal una semana antes del parto, y además, se administra el día del parto. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a una vaca antes o el día del parto para evitar una enfermedad en el ternero. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a una vaca antes o el día del parto para evitar una enfermedad en el ternero. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a una vaca antes del día del parto para evitar una enfermedad en el ternero. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF de la presente invención a una vaca antes del día del parto para evitar una enfermedad en el ternero. En una realización de la presente invención, se administra un polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención a una vaca antes

del día del parto para evitar una enfermedad en el ternero. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; 0,13; 0,14; 0,15; 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20; 0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25; 0,26; 0,27; 0,28; 0,29; 0,30; 0,31; 0,32; 0,33; 0,34; 0,35; 0,36; 0,37; 0,38; 0,39; 0,40; 0,41; 0,42; 0,43; 0,44; 0,45; 0,46; 0,47; 0,48; 0,49; o 0,50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; 0,13; 0,14; 0,15; 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20; 0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25; 0,26; 0,27; 0,28; 0,29; 0,30; 0,31; 0,32; 0,33; 0,34; 0,35; 0,36; 0,37; 0,38; 0,39; 0,40; 0,41; 0,42; 0,43; 0,44; 0,45; 0,46; 0,47; 0,48; 0,49; o 0,50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención es PEGilado y se administra en una dosis de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; 0,13; 0,14; 0,15; 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20; 0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25; 0,26; 0,27; 0,28; 0,29; 0,30; 0,31; 0,32; 0,33; 0,34; 0,35; 0,36; 0,37; 0,38; 0,39; 0,40; 0,41; 0,42; 0,43; 0,44; 0,45; 0,46; 0,47; 0,48; 0,49; o 0,50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención es PEGilado y se administra en una dosis de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,10; 0,11; 0,12; 0,13; 0,14; 0,15; 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20; 0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25; 0,26; 0,27; 0,28; 0,29; 0,30; 0,31; 0,32; 0,33; 0,34; 0,35; 0,36; 0,37; 0,38; 0,39; 0,40; 0,41; 0,42; 0,43; 0,44; 0,45; 0,46; 0,47; 0,48; 0,49; o 0,50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,01 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,01 µg/kg.

En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; o 1,0 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; o 1,0 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención es PEGilado y se administra en una dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; o 1,0 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención es PEGilado y se administra en una dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; o 1,0 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,1 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,1 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,2 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,2 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,3 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,3 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,4 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,4 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 0,5 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 0,5 µg/kg.

En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 10 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 10 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 20 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 20 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 30 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 30 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 40 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 40 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis de 50 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis superior a 0,5 µg/kg. En una realización, el polipéptido bG-CSF PEGilado de la presente invención se administra en una dosis superior a 0,5 µg/kg.

Las composiciones farmacéuticas que contienen bG-CSF pueden formularse a una concentración eficaz para su administración por diversos medios a un animal que experimenta trastornos caracterizados por la producción de glóbulos blancos baja o defectuosa, ya sean solos o como parte de una afección o enfermedad. Las cantidades medias de bG-CSF pueden variar y, en particular, deben basarse en las recomendaciones y prescripciones de un veterinario calificado. La cantidad exacta de bG-CSF es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de afección que se está tratando, el estado del animal que se está tratando, así como el resto de ingredientes en la composición. La invención también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. La cantidad que debe administrarse puede ser determinada fácilmente por un experto habitual en la materia basándose en la terapia con bG-CSF. El bG-CSF de la presente invención se puede usar, por lo tanto, para estimular la producción de glóbulos blancos y corregir los niveles deprimidos de glóbulos rojos. Más comúnmente, los

niveles de glóbulos blancos disminuyen debido al cáncer, a una infección o a la quimioterapia. También se pueden tratar las afecciones que pueden conducir a la neutropenia en un animal sano, tales como un tratamiento anticipado con agentes anticancerosos. En general, cualquier afección que se pueda tratar con hG-CSF también se puede tratar con bG-CSF y/o conjugados de PEG:bG-CSF de la presente invención. La invención también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo tal como un agente quimioterapéutico anticancerígeno. La cantidad que debe administrarse puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia basándose en la terapia con bG-CSF.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de una manera convencional.

#### **Ejemplos ilustrativos**

##### **10 Ejemplo 1**

###### **Selección del sitio para la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en bG-CSF**

El presente ejemplo describe algunos de los muchos posibles conjuntos de criterios para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural en bG-CSF.

15 Se generó un modelo teórico de GCSF bovino usando la estructura cristalina de GCSF humano unido a receptores (ID PDB n.º 2D9Q). Las coordenadas para esta estructura de GCSF humano están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Bernstein y col., *J. Mol. Biol.* 1997, 112, pág. 535). Los posibles restos para la sustitución incluyen, pero sin limitación, sitios de sustitución conservativa y restos con la mayor accesibilidad al disolvente usando el programa Cx (Pintar y col. (2002) *Bioinformatics*, 18(7):980-4). Los sitios de sustitución conservativa identificados para sustitución con *para*-acetilfenilalanina incluyen, pero sin limitación, restos de tirosina, fenilalanina y arginina que contienen un núcleo hidrófobo con carga o sin carga. Los restos que podían ser estructuralmente relevantes no se seleccionaron para la sustitución, incluyendo, pero sin limitación, glicinas, prolinas y restos implicados en la protección terminal helicoidal. Los restos de las regiones de unión al receptor conocidas tampoco se seleccionaron para la sustitución. La posición 123 (Asp) y 141 (Thr) de SEQ ID NO: 1 pueden ser fundamentales para la interacción con un receptor. La posición 7 (Arg) puede ser fundamental para el plegamiento del polipéptido. La posición 133 (Thr) es el sitio de glicosilación enlazado a O en G-CSF humano.

##### **Ejemplo 2**

###### **Clonación y expresión de un polipéptido bG-CSF que contiene un aminoácido no codificado de forma natural y producido en *E. coli***

30 El presente ejemplo detalla la clonación y la expresión de un polipéptido bG-CSF incluyendo un aminoácido no codificado de forma natural en *E. coli* y los procedimientos de evaluación de la actividad biológica de polipéptidos bG-CSF modificados.

35 Los procedimientos de clonación de bG-CSF son conocidos por los expertos en la materia. Las secuencias polipeptídicas y de polinucleótidos para bG-CSF y la clonación de bG-CSF en células huésped, así como la purificación de bG-CSF se detallan en la patente de EE.UU. n.º 5.849.883, y Heidari y col. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57.

El ADNc que codifica bG-CSF maduro se muestra como SEQ ID NO: 3. El polipéptido codificado por esta secuencia se muestra como SEQ ID NO: 1.

El ADNc que codifica bG-CSF maduro con una metionina en el extremo N se muestra como SEQ ID NO: 4. El polipéptido codificado por esta secuencia se muestra como SEQ ID NO: 2.

40 Se usa un sistema de traducción introducido que comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) para expresar bG-CSF que contiene un aminoácido no codificado de forma natural. La O-RS aminoacila preferentemente el O-ARNt con un aminoácido no codificado de forma natural. A su vez, el sistema de traducción inserta el aminoácido no codificado de forma natural en bG-CSF, en respuesta a un codón selector codificado. Las secuencias adecuadas de O-RS y O-ARNt se describen en el documento WO 2006/068802 titulado "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9 -- SEQ ID NO: 22 y D286R mutante de E9 -- SEQ ID NO: 24 en dicha solicitud) y el documento WO 2007/021297 titulado "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEQ ID NO: 23 en dicha solicitud).

Tabla 2: Secuencias O-RS y O-ARNT

SEQ ID NO: 5	<i>ARNtm</i> de <i>M. jannaschii</i>	ARNT
SEQ ID NO: 6	<i>HLAD03; un ARNt supresor ámbar optimizado</i>	ARNT
SEQ ID NO: 7	<i>HL325A; un ARNt supresor del desplazamiento de fase de lectura AGGA optimizado</i>	ARNT
SEQ ID NO: 8	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)</i>	RS
SEQ ID NO: 9	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina p-BpaRS(1)</i>	RS
SEQ ID NO: 10	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 11	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 12	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 13	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(1)</i>	RS
SEQ ID NO: 14	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(3)</i>	RS
SEQ ID NO: 15	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)</i>	RS
SEQ ID NO: 16	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(2)</i>	RS
SEQ ID NO: 5	<i>ARNtm</i> de <i>M. jannaschii</i>	ARNT
SEQ ID NO: 17	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación p-acetyl-fenilalanina (LW1)</i>	RS
SEQ ID NO: 18	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación p-acetyl-fenilalanina (LW5)</i>	RS
SEQ ID NO: 19	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación p-acetyl-fenilalanina (LW6)</i>	RS
SEQ ID NO: 20	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-5)</i>	RS
SEQ ID NO: 21	<i>Aminoacil ARNT sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-6)</i>	RS

- 5 La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen la secuencia de polinucleótido bG-CSF modificada y el par aminoacil ARNT sintetasa ortogonal/ARNT (específico del aminoácido no codificado de forma natural deseado) permite la incorporación específica del sitio de aminoácidos no codificados de forma natural en el polipéptido bG-CSF. El plásmido usado para la expresión de bG-CSF se muestra como la Figura 1. El gen de interés que se muestra como ejemplo es bG-CSF con un codón selector (ámbar) que reemplaza al codón que codifica T133. El polipéptido con para-acetylfenilalanina en la posición 133 se denomina bG-CSF T133pAF. Plpp - promotor constitutivo de *E. coli*; Agrupamiento Pro - copias en tandem de ARNT de prolina de *E. coli*; agrupamiento FA13 - copias en tandem de un ARNT de tirosina de *Methanococcus jannaschi* modificado del documento WO 2007/021297; E9 RS (D286R) tirosil ARNT sintetasa de *Methanococcus jannaschi* del documento WO 2006/068802; pro T7 - promotor T7; Terminador T7; ori - origen de replicación; secuencia bla (ap) - gen de resistencia a la ampicilina.
- 10 Se clonaron los polinucleótidos codificantes de bG-CSF de tipo natural o uno de los 15 polipéptidos mutantes y,

posteriormente, fueron clonados en el vector pVK6 por Codon Devices, Inc. Cada construcción generada tenía un codón selector, un codón ámbar, en diferentes posiciones. Los polipéptidos bG-CSF resultantes tenían el aminoácido no codificado de forma natural, *para*-acetilfenilalanina(pAF; pAcF), sustituyendo al aminoácido codificado de forma natural en una de las siguientes posiciones: L3, R7, E33, H43, Q58, S62, Q67, L69, L99, D123, L124, T133, Q134, 5 T141 y R166 (los números de posición se refieren a SEQ ID NO: 1). Dado que cada uno de los polipéptidos b-GCSF mutantes generados tenía cada uno una metionina en el extremo N (véase SEQ ID NO: 2 para la secuencia de tipo natural de G-CSF bovino con la metionina en el extremo N), los polipéptidos b-GCSF expresados tenían sustituciones de aminoácidos no naturales en la posición número +1 (por ejemplo, un mutante tenía la leucina en la posición 4 de SEQ ID NO: 2 sustituida con pAF). Tras la verificación de la secuencia, los plásmidos se transformaron en células 10 W3110 B2, y las colonias crecieron en placas de ampicilina. La información de la estirpe celular de *E. coli* se muestra como la Figura 2. Estas colonias se usaron para inocular 5 ml de LB con una dilución 1:1000 de cultivos de ampicilina, que se cultivaron a 37 °C hasta una  $D_{600}$  = 0,8. A continuación, se añadió pAF (*para*-acetilfenilalanina) a los 15 cultivos diferentes hasta una concentración final de 4 mM. Después de aproximadamente 30 minutos, se indujeron los cultivos con L-arabinosa a una concentración final del 0,2 %, y los cultivos se incubaron a 37 °C durante otras 5 horas. 15 En este momento, se tomó una muestra de 500  $\mu$ l de cada cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 4 minutos. Se desechó el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en 150  $\mu$ l de B-PER con 1  $\mu$ l de ADNasa, y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. A la mañana siguiente, se añadió tampón de muestra 4 x LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA), se calentaron las muestras a 95 °C durante 5 minutos y se añadió 10 x agente reductor de muestra (Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación, se resolvieron las muestras mediante SDS-PAGE en geles de gradiente 20 del 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) en tampón MES y se visualizaron usando Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). La Figura 3 presenta las muestras generadas a partir de los cultivos mutantes de bG-CSF y de tipo natural después del análisis en geles con gradiente del 4-12 % y tinción con Coomassie.

#### Solubilización prep de cuerpos de inclusión

Se volvió a suspender la pasta celular mezclando hasta un 10 % de sólido final en tampón de cuerpos de inclusión I (IB) a 4 °C (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 %, 4 °C). Las células se lisaron pasando el material resuspendido a través de un microfluidizador un total de dos veces. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C, y se decantó el sobrenadante. Se lavó el sedimento de cuerpos de inclusión (IB) resuspendiendo en un volumen adicional de tampón de IB I (Tris 5 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 %, 4 °C) y se pasó el material resuspendido a través de un microfluidizador un total de dos veces. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C, y se decantó el sobrenadante. Se volvió a suspender el sedimento de cuerpos de inclusión IB en un volumen adicional de tampón II (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 4 °C). Despues de la resuspensión, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C, y se decantó el sobrenadante. A continuación, se volvió a suspender el sedimento de IB en 1/2 volumen de tampón II (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 4 °C). Despues, se tomaron alícuotas de IB en recipientes apropiados. 35 Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se decantó. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron o se almacenaron a -8 °C hasta su uso posterior.

#### Solubilización de cuerpos de inclusión

Se solubilizaron los cuerpos de inclusión a una concentración final de entre 10-15 mg/ml en tampón de solubilización (Tris 20 mM, pH 8,0; Guanidina 8 M; β-ME 1 mM). Se incubaron los IB disueltos a temperatura ambiente bajo mezcla constante durante 1 hora o hasta que se disolvieron por completo. Se ajustó la concentración de proteína por dilución con tampón de solubilización adicional si la concentración de proteína era alta.

#### Replegamiento

El replegamiento se realizó diluyendo las muestras hasta una concentración de proteína final de 0,5 mg/ml en arginina 0,5 M, pH 8,0; 4 °C. Las muestras se dejaron volver a plegar durante 48 a 72 horas a 4 °C.

#### 45 Purificación

Se añadió  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido a las muestras hasta una concentración final del 20 % bajo mezcla suave. Las muestras se mezclaron suavemente a 4 °C durante 30 minutos. Se aglomeró la proteína precipitada (que contenía bG-CSF) mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante, y se volvió a suspender el sedimento en un volumen de replegamiento de 1/2 de NaAc 20 mM, pH 4,5. No volvió a la solución todo el sedimento. Solo el 50 bG-CSF volvió a la solución. Se aglomeró el material no disuelto por centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. Se decantaron las muestras, y el sobrenadante se reservó. Se filtró el material de bG-CSF a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se cargó entonces el material sobre una columna CM FF (GE Healthcare) equilibrada en Tampón A (NaAc 20 mM, pH 4,5). El material era <10 m/S antes de cargarlo en la columna. Se eluyó el bG-CSF de la columna con un gradiente lineal en 10 volúmenes de columna hasta el 100 % de tampón B (NaAc 20 mM, pH 4,5; NaCl 50 mM). La 55 Figura 4 muestra el análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie de las fracciones máximas de la columna CM FF realizado con bG-CSF-T133pAF.

### PEGilación y purificación

Se ajustó el pH de la combinación de CM a pH 4,0 con ácido acético glacial al 50 %. Se concentró la combinación hasta aproximadamente 4,0 mg/ml de proteína. Se añadió hidroxilamina-PEG:bG-CSF en exceso molar de 12:1 u 8:1 a la combinación. La mezcla se incubó a 28 °C durante 48-72 horas. A continuación, se diluyó la mezcla 8-10 veces

5 con agua (< 8 m/S) y luego se cargó sobre una columna de SP HP (GE Healthcare) equilibrada en Tampón A (NaAc 20 mM, pH 4,5). Se eluyó el bG-CSF PEGilado con un gradiente lineal en 40 volúmenes de columna hasta el 100 % de tampón B (NaAc 20 mM, pH 4,5; NaCl 50 mM). Figura 5 muestra el análisis de SDS-PAGE de las fracciones máximas de la columna de SP HP para bG-CSF-T133pAF PEGilado. También se puede usar, por ejemplo, etilenglicol al 5 % en el tampón de elución.

10 Se combinaron las fracciones de bG-CSF pegiladas y se dializaron frente a tampón de formulación de bG-CSF (NaAc 4,26 mM, pH 4,0, NaCl 0,565 mM, Tween 20 al 0,0033 %, Sorbitol al 5 %). Se concentró el material de PEG a entre 6-8 mg/ml de proteína y se esterilizó por filtración usando un filtro de PES de 0,22 µm. La proteína se almacenó a 4 °C o se congeló instantáneamente y se almacenó a -80 °C para un almacenamiento prolongado. La Figura 6 muestra el análisis de SDS-PAGE de b-GCSF antes y después de la PEGilación. Carril 1: bG-CSF-T133pAF; Carril 2: bG-CSF-T133pAF-20KPEG; Carril 3: marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2.

### Cartografía de péptidos (tripsina/endoproteinasa Glu-C) de bG-CSF

20 Se realizó una cartografía de péptidos para confirmar la incorporación de *para*-acetilfenilalanina (pAF) en un polipéptido bG-CSF. El bG-CSF T133pAF purificado antes de la PEGilación y el bG-CSF de tipo natural se diluyó hasta una guanidina-HCl 6 M final, Tris 50 mM, pH 7,8 y se redujo con DTT 10 mM a 37 °C durante una hora. Se sometió la muestra a alquilación con IAA 20 mM durante 40 minutos a oscuras a temperatura ambiente, y se inactivó la reacción con la adición de DTT 20 mM final. Se dializó el material en bicarbonato de amonio 100 mM a pH 7,7 y se trató con tripsina 1:50 (proteína:enzima) durante cuatro horas a 37 °C. Se prosiguió esta reacción con la adición de Glu-C 1:20 durante la noche a 25 °C. Se inactivó la digestión con la adición de TFA para una concentración final del 0,1 %. Se aplicó la muestra en una columna de fase inversa Grace Vydac C8 en tandem con un espectrómetro de masas con trampa de iones ThermoFinnigan LCQ Deca. El gradiente comenzó en fase móvil A al 98 % (TFA al 0,05 % en agua) isocráticamente durante ocho minutos y luego se amplificó hasta fase móvil B al 60 % (TFA al 0,05 % en acetonaítrilo) durante 90 minutos con detección a 214 nm y 250 nm. Se aplicó un caudal de 0,2 ml/min y una temperatura de columna de 40 °C. Se ajustó la tensión capilar a 15 V con un intervalo de exploración completo de 100-2000 m/z. La tensión de colisión para EM/EM fue el 42 % del normalizado.

25 30 La Figura 7a muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm). La Figura 7b muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm). Se muestra el aumento de hidrofobicidad desde la sustitución de treonina con pAF (*para*-acetilfenilalanina). Para bG-CSF de tipo natural, el tiempo de retención del péptido que contiene T133 fue de 42,79 minutos; para bG-CSF T133pAF, el péptido que contiene T133 pAF se desplazó y tuvo un tiempo de retención de 46,89 minutos.

35 40 La Figura 8a muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm). La Figura 8b muestra el producto de la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm). Con el análisis a 250 nm, las señales de proteína/péptido son bajas, pero la señal debida a pAF es potente. El péptido que contiene T133 pAF se indica en la Figura 8b con un tiempo de retención de 46,89 minutos.

### Cartografía de péptidos (endoproteinasa Glu-C) de bG-CSF

45 50 Se diluyó bG-CSF T133pAF purificado antes de la PEGilación hasta una guanidina-HCl 6 M final, Tris 50 mM, pH 7,8 y se redujo con DTT 10 mM a 37 °C durante una hora. Se sometió la muestra a alquilación con IAA 20 mM durante 40 minutos a oscuras a temperatura ambiente, y se inactivó la reacción con la adición de DTT 20 mM final. Se dializó el material en bicarbonato de amonio 100 mM a pH 7,7 y se trató con Glu-C 1:20 (proteína:enzima) durante una noche a 25 °C. Se inactivó la digestión con la adición de TFA para una concentración final del 0,1 %. Se aplicó la muestra en una columna de fase inversa Grace Vydac C8 en tandem con un espectrómetro de masas con trampa de iones ThermoFinnigan LCQ Deca. El gradiente comenzó en fase móvil A al 98 % (TFA al 0,05 % en agua) isocráticamente durante ocho minutos y luego se amplificó hasta fase móvil B al 60 % (TFA al 0,05 % en acetonaítrilo) durante 90 minutos con detección a 214 nm y 250 nm. Se aplicó un caudal de 0,2 ml/min y una temperatura de columna de 40 °C. Se ajustó la tensión capilar a 15 V con un intervalo de exploración completo de 100-2000 m/z. La tensión de colisión para EM/EM fue el 42 % del normalizado.

55 La Figura 9a muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm). La Figura 9b muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm). Para bG-CSF de tipo natural, el péptido que contenía T133 tenía un tiempo de retención de 52,04 minutos; para bG-CSF T133pAF, el péptido que contenía T133 pAF tiene un tiempo de retención de 53,95 minutos.

55 La Figura 10a muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm). La Figura 10b muestra el producto de la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm). Con el análisis a 250 nm, las señales de proteína/péptido son bajas, pero la señal debida a pAF es potente. El péptido que contiene T133 pAF se indica en la Figura 10b con un tiempo de retención de 53,95 minutos.

## Análisis de RP-HPLC y SEC-HPLC del polipéptido bG-CSF

Se usaron RP-HPLC y SEC-HPLC para analizar la pureza y determinar la identidad de las muestras después de la purificación. Se diluyó PEG-bG-CSF T133Paf 20 K purificado a 1 mg/ml con tampón de formulación (acetato de sodio 4,26 mM pH 4,0, cloruro de sodio 0,565 mM, Tween-20 al 0,0033 % y sorbitol al 5 %) y se inyectaron 10 µl en una columna de fase inversa de octilo (C8) de poro amplio J.T. Baker (4,6 x 100 mm, 5 µm). El gradiente comenzó con 50 % de fase móvil A (TFA al 0,1 % en agua) y ascendió hasta 70 % de fase móvil B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo) durante 26 minutos. La columna se regeneró con fase móvil B al 90 % durante 4 minutos y se reequilibró con fase móvil A al 50 % durante 5 minutos. Se aplicaron un caudal de 1,5 ml/min y una temperatura de columna de 6 °C con detección a 214 nm. El análisis se realizó usando el software Agilent Chemstation. La Tabla 3 muestra el máximo principal (PEG-bG-CSF T133pAF 20 K) con un tiempo de retención de 8,50 minutos. Según el cálculo del % de superficie, el 91,2 % de la muestra era b-GCSF PEGilado.

<b>TABLA 3</b>		
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Superficie</b>	<b>% de superficie</b>
4,2	50,6	0,6
5,0	20,0	0,3
6,8	155,2	2,0
7,3	99,7	1,3
8,0	121,2	1,5
<b>8,5</b>	<b>7245,0</b>	<b>91,2</b>
9,3	87,9	1,1
9,7	31,9	0,4
10,1	135,5	1,7

El bG-CSF que no estaba PEGilado también se analizó mediante RP-HPLC. La Tabla 4 muestra el máximo principal (bG-CSF T133pAF) con un tiempo de retención de 8,893 minutos. Según el cálculo del % de superficie, el 64,3 % de la muestra era bG-CSF T133pAF.

<b>TABLA 4</b>		
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Superficie</b>	<b>% de superficie</b>
5,6	114,3	1,6
7,4	17,4	0,2
8,1	12,2	0,2
8,2	13,6	0,2
8,3	13,7	0,2
<b>8,9</b>	<b>4622,1</b>	<b>64,3</b>
9,3	930,8	13,0
10,2	13,9	0,2
10,3	12,9	0,2
10,8	1151,5	16,0
11,1	273,9	3,8
11,8	10,0	0,1

El PEG-bG-CSF T133pAF 20 K purificado también se analizó mediante SEC-HPLC. Se inyectó la muestra pura (2 µl) en una columna de dimensionamiento Tosohas TSK Super SW3000 (4,6 x 300 mm, 4 µm de 250 Å) usando un gradiente isocrático de 25 minutos. La fase móvil contiene 97 % de fosfato de sodio 63 mM a pH 7,0 y 2-propanol al 3 %. Se aplicó un caudal de 0,3 ml/min y una temperatura de columna de 25 °C con detección a 214 nm. El análisis 5 se realizó usando el software Agilent Chemstation. La Tabla 5 muestra el máximo principal con un tiempo de retención de 9,157 minutos. Según el cálculo del % de superficie, el 98,3 % de la muestra era PEG-bG-CSF monomérico. Véase la Figura 11 para el análisis de SEC-HPLC del polipéptido PEGilado.

<b>TABLA 5</b>		
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Superficie</b>	<b>% de superficie</b>
7,0	50,3	0,1
8,2	228,0	0,6
<b>9,2</b>	<b>36454,5</b>	<b>98,3</b>
10,1	361,4	1,0

10 El bG-CSF que no estaba PEGilado también se analizó mediante SEC-HPLC. La Tabla 6 muestra el máximo principal con un tiempo de retención de 13,125 minutos. Según el cálculo del % de superficie, el 99,0 % de la muestra era bG-CSF T133pAF monomérico. Véase la Figura 12 para el análisis de SEC-HPLC del polipéptido.

<b>TABLA 6</b>		
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Superficie</b>	<b>% de superficie</b>
10,4	10,0	0,0
11,1	6,8	0,0
11,7	178,2	0,5
12,6	129,5	0,4
13,1	33514,3	99,0

15 También se realizó un análisis de alta precisión IEN-TOF (Tecnología Agilent) del polipéptido bG-CSF para confirmar la identidad del polipéptido bG-CSF. El bG-CSF T133pAF purificado se dializó en ácido fórmico al 0,1 %. Se aplicó la muestra en un cartucho C-18 durante un minuto con agua y luego se eluyó con acetonitrilo al 50 % en agua. El tiempo de ejecución total fue de tres minutos con un caudal de 0,3 ml/min. La tensión capilar de la IEN se ajustó a 4 kV, y la tensión del fragmento de MSTOF se ajustó a 300 V. El sobre del estado de carga explorado se deconvolucionó para proporcionar un valor de MH+. El PM de MH+ esperado era de 19.145. El PM de MH+ observado era de 19.146.

#### Ensayo de proliferación M-NFS60

20 Para evaluar la potencia de las moléculas de bG-CSF, se realizó un ensayo de proliferación con la estirpe celular M-NFS60. La estirpe celular se adquirió en ATCC (n.º de catálogo CRL-1838). Se descongelaron las células y se mantuvieron en RPMI 1640 + FBS al 10 % + penicilina/estreptomicina + 2-mercaptopetanol 50 uM + 20 ng/ml de mIL-3 (Invitrogen, Carlsbad, CA; mIL3 de BD Pharmingen n.º de cat. 554579). Las células se dividieron cada dos días y se sembraron a  $0,02 \times 10^6$  células/ml.

25 El día de antes del ensayo, las células se dividieron en  $0,1 \times 10^6$  células/ml. Después de 16-24 horas, se sembraron las células en medio de ensayo en placas negras de 96 pocillos de fondo plano a 10.000 células/pocillo y se añadieron diluciones en serie de los compuestos de bG-CSF por duplicado. El volumen total por pocillo fue de 10 µl, y el medio de ensayo fue RPMI 1640 + FBS al 10 % + P/S. También se añadieron patrones tales como Neupogen® y bG-CSF de tipo natural por duplicado para cada placa. Las placas se incubaron luego a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 42 horas. Despues de esta incubación de 42 horas, se añadieron 10 µl/pocillo de Alamar Blue (n.º de catálogo Biosource: DAL1100), y las placas se incubaron durante otras 6 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación, se centrifugaron las placas a 4000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier burbuja de aire. Las placas se leyeron en el fluorómetro Tecan con excitación a 535 nm y emisión a 590 nm. Las placas se envolvieron en papel de 35

aluminio para evitar la exposición a la luz del tinte Alamar Blue sensible a la luz.

Para el análisis de los datos, se promediaron las diluciones en serie duplicadas para cada compuesto, y se calcularon los valores de  $CE_{50}$  en SigmaPlot. Los valores de  $CE_{50}$  brutos se enumeraron para todos los compuestos, y se calcularon las diferencias (los compuestos de GCSF bovino PEGilados se adquirieron con bG-CSF de tipo silvestre).

- 5 Los experimentos se realizaron varias veces para establecer un CV intraensayo < 20 % y un CV entre ensayos < 30 %. La Figura 13/Tabla 7 = Ensayo de proliferación M-NFS60 - valores de  $CE_{50}$  brutos de G-CSF T133pAF bovino PEGilado 20 K y de tipo natural. Figura 14/Tabla 8 = Diferencias en  $CE_{50}$  del ensayo de proliferación de M-NFS60 de G-CSF T133pAF bovino PEGilado 20 K frente al tipo natural.

- 10 Se analizaron otras moléculas de bG-CSF que comprenden una sustitución de aminoácidos no codificada de forma natural. La Tabla 9 muestra los valores medios de  $CE_{50}$  obtenidos.

<u>TABLA 7</u>					
		<u>Neupogen</u>	<u>Neulasta</u>	<u>bG-CSF de tipo natural</u>	<u>PEG-bT133 20 K [lote NK2]</u>
Sumario	$CE_{50}$ media [ng/ml]	0,025	0,077	0,053	0,270
	DT	0,005	0,004	0,005	0,042
	CV	18 %	5 %	9 %	16 %
	N	14	5	16	2

<u>TABLA 8</u>					
		<u>Neupogen</u>	<u>Neulasta</u>	<u>bG-CSF de tipo natural</u>	<u>PEG-bT133 20 K [lote NK2]</u>
Sumario	Diferencia en la $CE_{50}$ [X]	1,0	3,2	1	5,1
	DT	0,0	0,7	0	0,5
	CV	0 %	23 %	0 %	9 %
	N	14	5	12	2

15

<u>TABLA 9</u>			
	<u>Valores de <math>CE_{50}</math> media</u>	<u>DT</u>	<u>CV</u>
Neupogen	0,025	0,005	18 %
bG-CSF de tipo natural	0,053	0,005	9 %
Neulasta	0,077	0,004	5 %

(continuación)

<b>TABLA 9</b>			
	<b>Valores de CE<sub>50</sub> media</b>	<b>DT</b>	<b>CV</b>
PEG-bS62 20 K	0,150	0,008	5 %
PEG-bT133 20 K [NK1]	0,258	0,045	17 %
PEG-bT133 20 K [NK2]	0,270	0,042	16 %
PEG-bR7 20 K	0,348	0,073	21 %
PEG-bR166 20 K	0,363	0,033	9 %
PEG-bL3 20 K	0,477	0,081	17 %

#### Tinción con CD11b de neutrófilos bovinos

Se añadieron 50 ul de sangre bovina a una placa de 96 pocillos de poliestireno sin tratar (Cal) Poly Pomona). Las células se estimularon mediante la adición de 50  $\mu$ l de Neupogen®, Neulasta® o bG-CSF-T133pAcF 20 K PEG diluido en PBS (200 ng/ml a 0,001 ng/ml final).

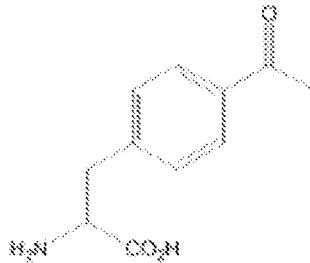
- 5 La solución se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a 39 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Se añadieron 20 ug/ml de anticuerpo primario a las células (CD11b anti-bovino de ratón, MM12A, VMRD). Se incubaron las células a 4 °C durante 30 minutos. Se centrifugó la placa de ensayo a 800 xg durante 2 minutos, y se desechó el sobrenadante. Se lisaron los eritrocitos durante 1 minuto añadiendo 150 ul de solución de lisis fría (fosfato 0,15 M, pH 7,2), y se restableció la isotonicidad añadiendo 50 ul de solución de restauración (fosfato 0,15 M, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Se volvió a centrifugar la placa, y se desechó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento de lisis hasta que se eliminaron todos los glóbulos rojos que eran visibles. Se lavaron las células con 200 ul de tampón FACS dos veces (1 x PBS, HEPES 2,5 mM, azida sódica al 0,1 %, FBS al 2,0 %) y se volvieron a suspender en 100 ul de tampón FACS. Se añadieron 20 ug/ml de anticuerpo secundario (IgG1 anti-ratón de cabra, ads-PE humano) y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos a oscuras. Se aglomeraron las células y se lavaron dos veces, y se volvieron a suspender en 200 ul de tampón FACS. Se usó el instrumento de matriz de FACS de BD para adquirir 50.000 eventos y contar las células CD11b positivas.

10 La Figura 15 muestra los resultados del experimento en el que los neutrófilos bovinos se tiñeron con el anticuerpo CD11b para evaluar su capacidad de respuesta a diversas moléculas. Se usó la intensidad fluorescente media (IFM) para los granulocitos para determinar el nivel de presentación de CD11b en la superficie celular. El % de IFM es un valor normalizado relativo a un grupo de control no estimulado. Se generaron curvas de respuesta a la dosis y valores de CE<sub>50</sub> para Neupogen, Neulasta, y bG-CSF T133pAF-PEG 20 K basándose en un ajuste de 4 parámetros. El valor de CE<sub>50</sub> para Neupogen® fue de 3,18 ng/ml. Para Neulasta®, el valor de CE<sub>50</sub> fue de 2,84 ng/ml, y para el bG-CSF T133pAF-PEG 20 K, el valor de CE<sub>50</sub> fue de 6,23 ng/ml.

#### Ejemplo 3

#### 25 Introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y reacción subsiguiente con un PEG que contiene aminooxi

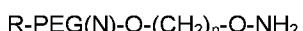
El presente ejemplo demuestra un procedimiento de generación de un polipéptido bG-CSF que lleva incorporado un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de PM de aproximadamente 5.000. Cada uno de los restos previos a la posición 1 (es decir, en el extremo N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) y cualquiera de sus combinaciones (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) se sustituye por separado con un aminoácido no codificado de forma natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de *p*-acetil-fenilalanina en bG-CSF son SEQ ID NO:

3 o 4 (bG-CSF) y SEQ ID NO: 23 o 5 (ARNT mutado, *ARNtm* de *M. jannaschii*) y SEQ ID NO: 22, 24, 17, 18, 19 (TyrRS LW1, 5 o 6) descritas en el Ejemplo 1 anterior.

- 5 Una vez modificada, la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un derivado de PEG que contiene aminooxi de la forma:

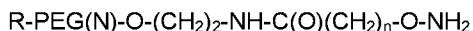


en la que R es metilo, n es 3 y N es PM de aproximadamente 5.000. Se hace reaccionar el b-GCSF purificado que contiene *p*-acetilfenilalanina disuelto a 10 mg/ml en MES 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en acetato de sodio 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, con un exceso de 10 a 100 veces de PEG que contiene aminooxi, y luego se agita durante de 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pág. 475). A continuación, se diluye PEG-b-GCSF en un tampón apropiado para la purificación y el análisis inmediatos.

#### Ejemplo 4

15 **Conjugación con un PEG que consiste en un grupo hidroxilamina enlazado al PEG a través de un enlace de amida**

Se acopla un reactivo de PEG que tiene la siguiente estructura a un aminoácido no codificado de forma natural que contiene cetona usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3:



20 en la que R = metilo, n = 4 y N es de un PM de aproximadamente 20.000. Las condiciones de reacción, purificación y análisis son como se describen en el Ejemplo 3.

#### Ejemplo 5

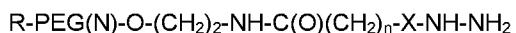
**Introducción de dos aminoácidos distintos no codificados de forma natural en polipéptidos bG-CSF**

25 El presente ejemplo demuestra un procedimiento de generación de un polipéptido bG-CSF que lleva incorporado aminoácido no codificado de forma natural que comprende una funcionalidad cetona en dos posiciones entre los siguientes restos: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) y cualquiera de sus combinaciones (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF). El polipéptido bG-CSF se prepara como se describe en los Ejemplos 1 y 2, excepto que el codón selector se introduce en dos sitios distintos dentro del ácido nucleico.

#### Ejemplo 6

**Conjugación del polipéptido bG-CSF con un PEG que contiene hidrazida y posterior reducción in situ**

40 Se prepara un polipéptido bG-CSF que lleva incorporado un aminoácido que contiene carbonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en los Ejemplos 2 y 3. Una vez modificado, se conjuga un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura con el polipéptido bG-CSF:

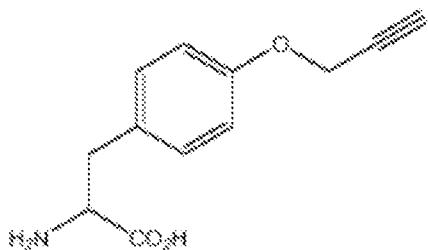


en la que R = metilo, n = 2 y N es de un PM 10.000 y X es un grupo carbonilo (C=O). Se hace reaccionar el b-GCSF purificado que contiene *p*-acetilfenilanina disuelto a ENTRE 0,1 y 10 mg/ml en MES 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en acetato de sodio 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a pH 4,5, con un exceso de 1 a 100 veces de PEG que contiene hidrazida y se reduce la correspondiente hidrazone *in situ* mediante la adición de NaCNBH<sub>3</sub> 1 M madre (Sigma Chemical, St. Louis, MO), disuelta en H<sub>2</sub>O, hasta una concentración final de 10 a 50 mM. Las reacciones se llevan a cabo a oscuras a 4 °C a temperatura ambiente durante 18-24 horas. Las reacciones se detienen mediante la adición de Tris 1 M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris 50 mM o se diluyen en tampón apropiado para la purificación inmediata.

#### 10 Ejemplo 7

##### Introducción de un aminoácido que contiene alquino en un polipéptido bG-CSF y derivatización con mPEG-azida

Cada uno de los siguientes restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) y cualquiera de sus combinaciones (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) se sustituye con un aminoácido no codificado de forma natural:

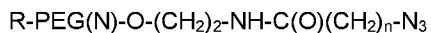


Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de *p*-propargil-tirosina en bG-CSF son SEQ ID NO:

25 3 o 4, SEQ ID NO: 5 (ARNtmut, ARNtm<sup>TM</sup> de *M. jannaschii*) y 10, 11, 12 descritas en el Ejemplo 2 anterior. El polipéptido bG-CSF que contiene la propargil tirosina se expresa en *E. coli* y se purifica usando las condiciones descritas en el Ejemplo 3.

30 El bG-CSF purificado que contiene propargil-tirosina disuelto a una concentración de entre 0,1 y 10 mg/ml en tampón PB (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15 M, pH = 8) y un exceso de 10 a 1.000 veces de una azida que contiene PEG se añade a la mezcla de reacción. Luego se añade una cantidad catalítica de alambre de CuSO<sub>4</sub> y Cu a la mezcla de reacción. Después de incubar la mezcla (incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente o 37 °C o durante la noche a 4 °C), se añade H<sub>2</sub>O, y la mezcla se filtra a través de una membrana de diáfiltración. La muestra puede analizarse para la adición, incluyendo pero sin limitación, mediante procedimientos similares descritos en el Ejemplo 3.

35 En el presente ejemplo, el PEG tendrá la siguiente estructura:



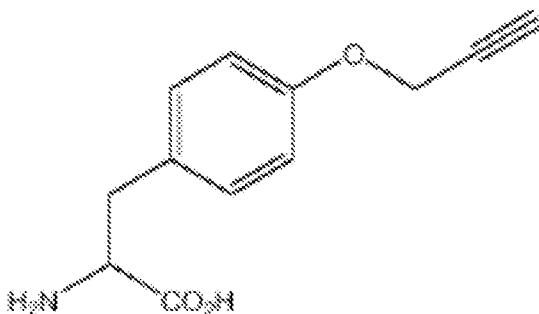
en la que R es metilo, n es 4 y N es de PM de 10.000.

#### Ejemplo 8

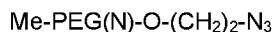
##### Sustitución de un aminoácido hidrófobo grande en un polipéptido bG-CSF con propargil tirosina

40 Un resto de Phe, Trp o Tyr presente dentro de una de las siguientes regiones de bG-CSF: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139,

140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) y cualquiera de sus combinaciones (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) se sustituye con el siguiente aminoácido no codificado de forma natural como se describe en el Ejemplo 7:



Una vez modificado, se une un PEG a la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene alquino. El PEG tendrá la siguiente estructura:



10 y los procedimientos de acoplamiento seguirán los del Ejemplo 7. Esto generará una variante de polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que es aproximadamente isostérico con uno de los aminoácidos hidrófobos grandes de origen natural y que está modificado con un derivado de PEG en un sitio distinto dentro del polipéptido.

#### Ejemplo 9

#### Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero del polipéptido bG-CSF separado por uno o más engarces de PEG

Se hace reaccionar la variante de polipéptido bG-CSF que contiene alquino producida en el Ejemplo 7 con un derivado de PEG bifuncional de la forma:

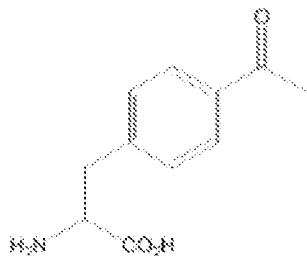


20 en la que n es 4 y el PEG tiene un PM medio de aproximadamente 5.000, para generar el homodímero de polipéptido bG-CSF correspondiente en el que las dos moléculas de bG-CSF están separadas físicamente por PEG. De manera análoga, se puede acoplar un polipéptido bG-CSF a uno o más otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los Ejemplos 7 y 3.

#### Ejemplo 10

#### Acoplamiento de una fracción sacárido a un polipéptido bG-CSF

Un resto de lo siguiente se sustituye con el aminoácido no codificado de forma natural de a continuación: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo de la proteína) y cualquiera de sus combinaciones (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) como se describe en el Ejemplo 3.

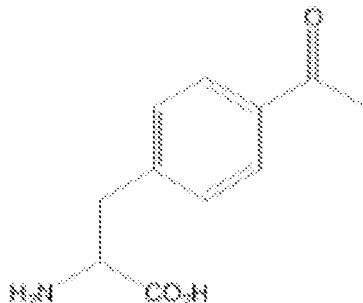


- Una vez modificada, la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un análogo de aminooxi enlazado en  $\beta$  de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). La variante de polipéptido bG-CSF (10 mg/ml) y el sacárido aminooxi (21 nM) se mezclan en tampón acuoso de acetato de sodio 100 mM (pH 5,5) y se incuban a 37 °C durante de 7 a 26 horas. Se acopla un segundo sacárido al primero enzimáticamente incubando el polipéptido bG-CSF conjugado con sacárido (5 mg/ml) con UDP-galactosa (16 mM) y  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (0,4 unidades/ml) en tampón HEPES 150 mM (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente (Schanbacher y col. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5057-5061).

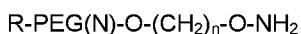
#### Ejemplo 11

##### Generación de un antagonista del polipéptido bG-CSF PEGilado

Un resto, incluyendo, pero sin limitación, los implicados en la unión al receptor bG-CSF se sustituye con el siguiente aminoácido no codificado de forma natural, como se describe en Ejemplo 3.



- Una vez modificada, la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hará reaccionar con un derivado de PEG que contiene aminooxi de la forma:



en la que R es metilo, n es 4 y N es de PM 20.000 para generar un antagonista del polipéptido b-GCSF que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que se modifica con un derivado de PEG en un solo sitio dentro del polipéptido. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como en los Ejemplos 3.

#### Ejemplo 12

##### Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero del polipéptido bG-CSF en el que las moléculas de bG-CSF se enlazan directamente

- Una variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene alquino puede acoplarse directamente a otra variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene azido. De manera análoga, se puede acoplar un polipéptido bG-CSF a uno o más polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como en los Ejemplos 3, 6 y 7.

#### Ejemplo 13

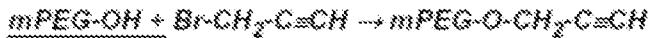


A

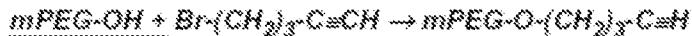
B

Se hace reaccionar el polialquilenglicol (P-OH) con el haluro de alquilo (A) para formar el éter (B). En estos compuestos, n es un número entero de uno a nueve y R' puede ser un grupo heteroalquilo o alquilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado de C1 a C20. R' también puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico, saturado o insaturado, de C3 a C7, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, o un grupo alcarilo (el alquilo es un grupo alquilo C1 a C20 saturado o insaturado) o heteroalcarilo sustituido o no sustituido. Por lo general, PEG-OH es polietilenglicol (PEG) o monometoxipolietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 800 a 40.000 Daltons (Da).

5

**Ejemplo 14**

- 10 Se trató mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). Después se añadió, a la solución, una solución de bromuro de propargilo, disuelto como una solución al 80 % en peso en xileno (0,56 ml, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich), y una cantidad catalítica de KI, y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 2 horas. A continuación, se añadió agua (1 ml) y se eliminó el disolvente al vacío. Al resto, se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) y se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gota a gota al dietiléter (150 ml). Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de dietiléter frío, y se secó para proporcionar propargil-O-PEG.
- 15

**Ejemplo 15**

- 20 Se trató mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). A continuación, se añadieron cincuenta equivalentes de 5-bromo-1-pentíleno (0,53 ml, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI a la mezcla. Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 16 horas. A continuación, se añadió agua (1 ml) y se eliminó el disolvente al vacío. Al resto, se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) y se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gota a gota al dietiléter (150 ml). Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de dietiléter frío, y se secó para proporcionar el correspondiente alquino. Se puede usar 5-cloro-1-pentino en una reacción similar.
- 25

**Ejemplo 16****Producción de mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C≡CH**

- 30 (1)  $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} + \text{NaOH} + \text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$   
 (2)  $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{MsCl} + \text{N(Et)}_3 \rightarrow m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$   
 (3)  $m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{LiBr} \rightarrow m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$   
 (4)  $m\text{PEG-OH} + m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow \text{mPEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ .

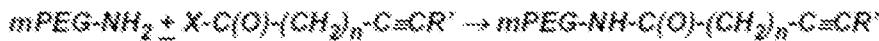
- 35 A una solución de 3-hidroxibencílico alcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml), se añadió en primer lugar hidróxido de sodio en polvo (1,5 g, 37,5 mmol) y luego una solución de bromuro de propargilo, disuelto como una solución al 80 % en peso en xileno (3,36 ml, 30 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 horas. A la mezcla, se añadió ácido cítrico al 10 % (2,5 ml) y se eliminó el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron, dando el alcohol 3-proariloxibencílico.

- 40 Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C, y se dispuso la reacción en el refrigerador durante 16 horas. Un tratamiento habitual proporcionó el mesilato como un aceite amarillo pálido. Se disolvió este aceite (2,4 g, 9,2 mmol) en THF (20 ml), y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y luego se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió, a la mezcla, agua (2,5 ml), y se eliminó el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron, dando el bromuro deseado.
- 45

Se disolvió mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) en THF (20 ml), y se enfrió la solución en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) con agitación vigorosa durante un período de varios minutos, seguido de la adición del bromuro obtenido anteriormente (2,55 g, 11,4 mmol) y una cantidad catalítica de KI. Se retiró el baño de

enfriamiento, y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y se eliminó el disolvente al vacío. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) al residuo, y se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y el volumen se redujo a aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una solución de éter (150 ml) produjo un precipitado blanco, que se recogió para producir el derivado de PEG.

5   **Ejemplo 17**



Los polímeros de poli(etilenglicol) que contienen alquino terminal también se pueden obtener acoplando un polímero de poli(etilenglicol) que contenga un grupo funcional terminal a una molécula reactiva que contenga la funcionalidad alquino como se muestra anteriormente. n está entre 1 y 10. R' puede ser H o un grupo alquilo pequeño de C1 a C4.

10   **Ejemplo 18**

**Producción de mPEG-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C≡H**

- (1) HO<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C≡CH + NHS + DCC → NHSO-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C≡CH
- (2) mPEG-NH<sub>2</sub> + NHSO-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C≡CH → mPEG-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C≡CH.

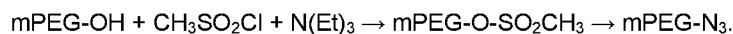
15   Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g; 3,0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El éster de NHS 7 en bruto resultante se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

20   Se disolvió mPEG-NH<sub>2</sub> con un peso molecular de 5.000 Da (mPEG-NH<sub>2</sub>, 1 g, Sunbio) en THF (50 ml), y la mezcla se enfrió a 4 °C. Se añadió éster de NHS 7 (400 mg, 0,4 mmol) en porciones con agitación vigorosa. Se dejó la mezcla en agitación durante 3 horas mientras se calentaba a temperatura ambiente. Luego se añadió agua (2 ml), y se retiró el disolvente al vacío. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) al residuo, y se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al éter (150 ml) gota a gota. El precipitado resultante se recogió y se secó al vacío.

**Ejemplo 19**

**Preparación de metanosulfonato o mesilato de poli(etilenglicol)**

25   Este ejemplo representa la preparación del metanosulfoniléster de poli(etilenglicol), que también se puede denominar metanosulfonato o mesilato de poli(etilenglicol). El tosilato y los haluros correspondientes se pueden preparar mediante procedimientos similares.



30   Se destiló azeotrópicamente el mPEG-OH (PM = 3.400, 25 g, 10 mmol) en 150 ml de tolueno durante 2 horas bajo nitrógeno, y la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 40 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco y 2,1 ml de trietilamina seca (15 mmol). Se enfrió la solución en un baño de hielo y se añadieron gota a gota 1,2 ml de cloruro de metanosulfonio destilado (15 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche, y se inactivó la reacción mediante la adición de 2 ml de etanol absoluto. Se evaporó la mezcla al vacío para eliminar los disolventes, principalmente aquellos distintos del tolueno, se filtró, se concentró de nuevo al vacío, y luego se precipitó en 100 ml de dietiléter. Se lavó el filtrado con varias porciones de dietiléter frío y se secó al vacío, proporcionando el mesilato.

35   Se disolvió el mesilato (20 g, 8 mmol) en 75 ml de THF y se enfrió la solución hasta 4°C. A la solución enfriada, se añadió azida sódica (1,56 g, 24 mmol). Se calentó la reacción a reflujo bajo nitrógeno durante 2 horas. A continuación, se evaporaron los disolventes y se diluyó el residuo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml). Se lavó la fracción orgánica con una solución de NaCl y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Se redujo el volumen hasta 20 ml y se hizo precipitar el producto mediante la adición a 150 ml de éter seco frío.

**Ejemplo 20**

**Producción de mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>**

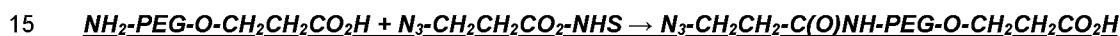
- (1) N<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>H → N<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH
- (2) N<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>OH → Br-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>
- (3) mPEG-OH + Br-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> → mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>.

El alcohol 4-azidobencílico puede producirse usando el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.998.555.

Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución de alcohol 4-azidobencílico (1,75 g, 11,0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 0 °C, y se dispuso la reacción en el refrigerador durante 16 horas. Un tratamiento habitual proporcionó el mesilato en forma de un aceite amarillo pálido. Se disolvió este aceite (9,2 mmol) en THF (20 ml), y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y luego se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió, a la mezcla, agua (2,5 ml), y se eliminó el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentraron, dando el bromuro deseado.

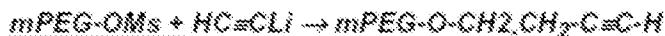
5 Se trató mPEG-OH 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml) y se añadió el bromuro (3,32 g, 15 mmol) a la mezcla junto con una cantidad catalítica de KI. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y se eliminó el disolvente al vacío. Al resto, se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 ml) y se separó la capa orgánica, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. La adición gota a gota a una solución de éter (150 ml) produjo un precipitado, que se recogió para producir mPEG-O- $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}_3$ .

#### Ejemplo 21



Se disolvió  $\text{NH}_2\text{-PEG-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  (PM 3.400 Da, 2,0 g) en una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (10 ml), y se enfrió la solución a 0 °C. Se añadió 3-azido-1-N-hidroxisuccinimido-propionato (5 equiv.) con agitación vigorosa. Despues de 3 horas, se añadieron 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó la mezcla durante 45 minutos más a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N y se añadió NaCl a una concentración del aproximadamente 15 % en peso. Se extrajo la mezcla de reacción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml x 3), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró. Despues de la precipitación con dietileter frío, se recogió el producto por filtración y se secó al vacío para producir el derivado de PEG omega-carboxi-azida.

#### Ejemplo 22



25 A una solución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparada como se conoce en la técnica y enfriada a -78 °C en THF, se añade gota a gota una solución de mPEG-OM disueltos en THF con agitación vigorosa. Despues de 3 horas, se deja calentar la reacción a temperatura ambiente y se detiene con la adición de 1 ml de butanol. A continuación, se añadieron 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó la mezcla durante 45 minutos más a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N, y se añadió NaCl a una concentración del aproximadamente 15 % en peso. Se extrajo la mezcla de reacción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml x 3), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró. Despues de la precipitación con dietileter frío, se recogió el producto por filtración y se secó al vacío para producir el 1-(but-3-iniloxi)-metoxipolietenglicol (mPEG).

#### Ejemplo 23

##### Incorporación de aminoácidos que contienen azida y acetileno

35 Los aminoácidos que contienen azida y acetileno se pueden incorporar con selectividad hacia el sitio a las proteínas usando los procedimientos descritos en L. Wang, y col., (2001), *Science* 292:498-500, J. W. Chin y col., *Science* 301:964-7 (2003), J. W. Chin y col., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), *Chem Bio Chem* 3(11):1135-1137; J. W. Chin, y col., (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1:1-11. Una vez que se incorporaron los aminoácidos, se lleva a cabo la reacción de cicloadición con proteína 0,01 mM en tampón de fosfato (PB), pH 8, en presencia de derivado de PEG 2 mM,  $\text{CuSO}_4$  1 mM y ~1 mg de alambre de Cu durante 4 horas a 37 °C.

#### Ejemplo 24

##### Síntesis de derivados de p-acetil-D,L-fenilalanina (pAF) y m-PEG-hidroxilamina

45 El pAF racémico se sintetiza usando el procedimiento descrito anteriormente en Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. y Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746.

Para sintetizar el derivado de m-PEG-hidroxilamina, se completan los siguientes procedimientos. A una solución de ácido (*N*-t-Boc-aminoxy)acético (0,382 g, 2,0 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,16 ml, 1,0 mmol) en diclorometano (DCM, 70 ml), que se agita a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, se añade metoxipolietenglicolamina (m-PEG-NH<sub>2</sub>, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, de BioVectra) y diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,5 mmol). 50 Se agita la reacción a TA durante 48 horas, y luego se concentra a aproximadamente 100 ml. Se añade la mezcla gota a gota a éter frío (800 ml). El producto protegido con t-Boc precipitó y se recogió por filtración, se lavó con 3 x 100 ml de éter. Se purifica adicionalmente volviendo a disolver en DCM (100 ml) y precipitando en éter (800 ml) dos

veces. Se seca el producto al vacío produciendo 7,2 g (96 %), confirmado por RMN y ensayo de Nihidrina.

Se lleva a cabo el de Boc del producto protegido (7,0 g) obtenido anteriormente en TFA al 50 %/DCM (40 ml) a 0 °C durante 1 hora y luego a TA durante 1,5 horas. Después de eliminar la mayor parte de TFA al vacío, la sal de TFA del derivado de hidroxilamina se convierte en la sal de HCl mediante la adición de HCl 4 N en dioxano (1 ml) al residuo.

- 5 Se disuelve el precipitado en DCM (50 ml) y se vuelve a precipitar en éter (800 ml). El producto final (6,8 g, 97 %) se recoge por filtración, se lava con 3 x 100 ml de éter, se seca al vacío y se almacena bajo nitrógeno. Se sintetizan otros derivados de hidroxilamina de PEG (5 K, 20 K) usando el mismo procedimiento.

#### Ejemplo 25

##### Actividad in vitro e in vivo del bG-CSF PEGilado

- 10 Se administran PEG-bG-CSF, bG-CSF no modificado y solución tampón a ratones o ratas. Los resultados mostrarán actividad superior y semivida prolongada del bG-CSF PEGilado de la presente invención en comparación con bG-CSF no modificado que está indicado por cantidades significativamente mayores de neutrófilos y un desplazamiento del recuento máximo de glóbulos blancos usando la misma dosis por ratón.

Análisis farmacocinético

- 15 Un polipéptido bG-CSF de la invención se administra por vía intravenosa o subcutánea a ratones. Se sangran los animales antes y en momentos después de la dosificación. Se recoge el plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo. La semivida de eliminación puede calcularse y compararse entre polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de forma natural y bG-CSF de tipo natural o diversas formas de polipéptidos bG-CSF de la invención. De manera similar, los polipéptidos bG-CSF de la invención se pueden administrar a monos cynomolgus. Los animales se sangran antes y en momentos después de la dosificación. Se recoge el plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo.

20 Los polipéptidos de la invención se pueden administrar a un modelo animal de enfermedad. Los estudios en animales que pueden realizarse incluyen ganado expuesto a *Pasteurella hemolytica*, ganado con exposición bacteriana de la infección de la glándula mamaria/mastitis (*Klebsiella pneumonia*). Otros estudios que se pueden realizar evalúan el control, la incidencia y la duración de la enfermedad respiratoria bovina, o la prevención de la mastitis coliforme. Los procedimientos para evaluar la salud de los animales, la producción de leche, el recuento de neutrófilos y otros parámetros son conocidos por los expertos en la materia. Otros modelos que se pueden usar para evaluar polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen, pero sin limitación, modelos animales de infección o exposición a infección tales como un modelo de hámster de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*, un modelo de pielonefritis por *Candida albicans* en ratas, modelos que implican potros neonatales y modelos que implican cerdos en crecimiento. Algunos de estos modelos se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932. Modelos tales como estos son conocidos por los expertos en la materia.

25 Ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. El ensayo de <sup>3</sup>H-timidina se realiza usando procedimientos convencionales. La médula ósea se obtiene de ratones Balb C hembra sacrificados o de otros animales. Se suspenden brevemente las células de la médula ósea, se centrifugan y se vuelven a suspender en un medio de crecimiento. Se coloca una alícuota de 160 µl que contiene aproximadamente 10.000 células en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añaden muestras del análogo de G-CSF purificado (como se ha preparado anteriormente) a cada pocillo, y se incuban durante 68 horas. Se añade timidina tritiada a los pocillos y se deja incubar durante cinco horas más. Despues del tiempo de incubación de cinco horas, se recogen las células, se filtran y se enjuagan a fondo. Se añaden los filtros a un vial que contiene líquido de centelleo. Se cuentan las emisiones beta (contador de centelleo Betaplate LKB). Se analizan los patrones y análogos por triplicado, y las muestras que cayeron sustancialmente por encima o por debajo de la curva patrón se vuelven a analizar con la dilución adecuada. Los resultados se presentan como la media de los datos análogos por triplicado relativos a los resultados del patrón de bG-CSF inalterado.

- 30 Se ensaya la inducción de la proliferación de células de médula ósea humana basándose en el aumento de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Se somete la médula ósea humana de donantes sanos a un corte de densidad con Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia) y se suspenden células de baja densidad en medio de Iscove (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10 % y glutamina pen-estrep. Posteriormente, se incuban 2 x 10<sup>4</sup> células de médula ósea humana con medio de control o con el material de bG-CSF recombinante derivado de *E. coli* en placas de fondo plano de 96 pocillos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % en aire durante 2 días. Las muestras se ensayan por duplicado y la concentración varió en un intervalo de 10.000 veces. Despues, se pulsaron los cultivos durante 4 horas con 0,5 de µCi/pocillo de <sup>3</sup>H-timidina (New England Nuclear, Boston, MA). La captación de <sup>3</sup>H-timidina se mide como se describe en Venuta y col., Blood, 61, 781 (1983).

- 35 Inducción de la diferenciación de WEHI-3B D<sup>+</sup> La capacidad de los polipéptidos bG-CSF de la presente invención para inducir la diferenciación de la estirpe celular leucémica mielomonocítica murina WEHI-3B D<sup>+</sup> se ensaya en medio de agar semisólido como se describe en Metcalf, *Int. J. Cancer*, 25, 225 (1980). Se incuban el producto de bG-CSF recombinante y los controles de los medios con aproximadamente 60 células WEHI-3BD/pocillo a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % en aire durante 7 días. Se incuban las muestras en placas de 24 pocillos de fondo plano y la concentración varía en un intervalo de 2.000 veces. Las colonias se clasifican como indiferenciadas, parcialmente diferenciadas o

completamente diferenciadas, y los recuentos de células de colonias se realizan microscópicamente.

Ensayos de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM Los aislados naturales de G-CSF humano y hG-CSF resultan hacer que las células de médula ósea humana proliferen y se diferencien. Estas actividades se miden en ensayos de CFU-GM[Broxmeyer y col., *Exp. Hematol.*, 5, 87, (1971)], BFU-E y CFU-GEMM.

5 [Lu y col., *Blood*, 61, 250 (1983)] usando células de médula ósea no adherentes de baja densidad de voluntarios humanos sanos. Se pueden usar células de otras fuentes. Se realiza una comparación de las actividades biológicas de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM usando 500 unidades de los polipéptidos G-CSF o bG-CSF de la invención.

10 Los ensayos de colonias se realizan con células de médula ósea no adherentes de baja densidad. Las células de médula ósea humana se someten a un corte de densidad con Ficoll-Hypaque (densidad, 1,077 g/cm<sup>3</sup>; Pharmacia). A continuación, se vuelven a suspender las células de baja densidad en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contiene suero de ternero fetal y se siembran para la adherencia en placas de cultivo de tejidos Falcon (n.<sup>o</sup> 3003, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) durante 1 hora y media a 37 °C.

15 El control de medio consiste en medio de Dulbecco modificado por Iscove más FCS al 10 %, hemina 0,2 mM y 1 unidad de una eritropoyetina recombinante. Para el ensayo de CFU-GM, se sembraron células diana en placas a 1 x 10<sup>5</sup> en 1 ml de medio de cultivo de agar al 0,3 % incluyendo medio McCoy 5A suplementado y suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 %. Se puntuán los cultivos en cuanto a las colonias (más de 40 células por agregado), y la morfología se evalúa el día 7 de cultivo. El número de colonias se muestra como la media ± ETM determinada a partir de las placas por cuadruplicado.

20 Para los ensayos de BFU-E y CFU-GEMM, se añaden células (1 x 10<sup>5</sup>) a una mezcla de 1 ml de medio de Dulbecco modificado por Iscove (Gibco), metilcelulosa al 0,8 %, suero bovino fetal al 30 %, 2-mercaptopetanol 0,05 nM, hemina 0,2 mM y 1 unidad de eritropoyetina recombinante. Se incuban las placas en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % y O<sub>2</sub> al 5 %. Se obtiene una baja tensión de oxígeno usando un oxirreductor de Reming Bio instruments (Syracuse, N. Y.). Las colonias se puntuán después de 14 días de incubación. El número de colonias se determina como la media ± ETM, como se determina a partir de placas por duplicado.

25 Se espera que todas las colonias formadas en el ensayo de CFU-GM sean cloroacetato esterasas positivas y esterasa negativas (alfa-naftil-acetato esterasa) no específicas, coincidiendo con que las colonias sean de tipo granulocítico. Se espera que tanto G-CSF natural como los polipéptidos bG-CSF de la invención tengan una actividad específica de aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> U/mg de proteína pura, cuando se ensayan por dilución en serie en un ensayo de CFU-GM. Es importante señalar que el bG-CSF de la invención puede ser sumamente puro y estar exento de otros posibles factores de crecimiento de mamíferos en virtud de su producción en *E. coli*. Por lo tanto, bG-CSF puede ser capaz de soportar la formación de colonias mixtas (CFU-GEMM) y BFU-E cuando se añade en presencia de eritropoyetina recombinante.

30 Medición de la semivida *in vivo* de bG-CSF conjugado y no conjugado y sus variantes Se usan ratas macho Sprague Dawley (de aproximadamente 7 semanas de vida). El día de la administración, se mide el peso de cada animal. Se 35 inyectaron 100 µg por kg de peso corporal de las muestras de bG-CSF conjugado y no conjugado por vía intravenosa en la vena de la cola de tres ratas. En el minuto 1, a los 30 minutos, a las 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la inyección, se retiran 500 µl de sangre de cada rata mientras está bajo anestesia con CO<sub>2</sub>. Se almacenan las muestras de sangre 40 se a temperatura ambiente durante 1,5 horas seguido del aislamiento de suero por centrifugación (4 °C, 18000 xg durante 5 minutos). Las muestras de suero se almacenan a -80 °C hasta el día del análisis. La cantidad de bG-CSF activo en las muestras de suero se cuantifica mediante el ensayo de actividad *in vitro* de bG-CSF después de descongelar las muestras en hielo.

45 Medición de la actividad biológica *in vivo* en ratas sanas de bG-CSF conjugado y no conjugado, y variantes de los mismos. La medición de los efectos biológicos *in vivo* de bG-CSF en ratas SPF Sprague Dawley se usa para evaluar la eficacia biológica de bG-CSF conjugado y no conjugado, y sus variantes. El día de la llegada, las ratas se asignan aleatoriamente a grupos de 6. Los animales descansan durante un período de 7 días, en el que los individuos en malas condiciones o con pesos extremos son rechazados. El intervalo de pesos de las ratas al inicio del período de descanso es de 250-270 g.

50 El día de la administración, se dejan las ratas en ayunas durante 16 horas, seguido de una inyección subcutánea de 100 µg por kg de peso corporal de bG-CSF o una variante del mismo. Cada muestra de bG-CSF se inyecta en un grupo de 6 ratas asignadas al azar. Se extraen muestras de sangre de 300 µg de sangre estabilizada con EDTA de la vena de la cola de las ratas antes de la dosificación y a las 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre se analizan para los siguientes parámetros hematológicos: hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, hematocrito, volumen celular medio, concentración media de hemoglobina celular, hemoglobina celular media, recuento de glóbulos blancos, recuento diferencial de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos). Basándose en estas mediciones, se evalúa la eficacia biológica del bG-CSF conjugado y no conjugado, y sus variantes.

55 Medición de la actividad biológica *in vivo* en ratas con neutropenia inducida por quimioterapia de bG-CSF conjugado y no conjugado y sus variantes. En este análisis, se utilizan ratas SPF Sprague Dawley. El día de la llegada, las ratas

se asignan aleatoriamente a grupos de 6. Los animales descansan durante un período de 7 días, en el que los individuos en malas condiciones o con pesos extremos son rechazados. El intervalo de pesos de las ratas al inicio del período de descanso es de 250-270 g.

- 5 24 horas antes de la administración de las muestras de bG-CSF, las ratas reciben por inyección i.p. 50 mg por kg de peso corporal de ciclofosfamida (CPA) para inducir neutropenia que imite a la neutropenia producida como consecuencia de la quimioterapia anticancerosa. En el día 0, se inyectan 100 µg por kg de peso corporal de bG-CSF o una variante del mismo por vía s.c. Cada muestra de bG-CSF se inyecta en un grupo de 6 ratas asignadas al azar. Se extraen muestras de sangre de 300 µg de sangre estabilizadas con EDTA de la vena de la cola de las ratas antes de la dosificación y a las 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre se analizan para los siguientes parámetros hematológicos: hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, hematocrito, volumen celular medio, concentración media de hemoglobina celular, hemoglobina celular media, recuento de glóbulos blancos, recuento diferencial de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos). Basándose en estas mediciones, se evalúa la eficacia biológica del bG-CSF conjugado y no conjugado, y sus variantes.
- 10

## 15 Ejemplo 26

### Un estudio in vivo que evalúa el impacto de la variante de bG-CSF-T133pAF-PEG 20 K en las respuestas hematológicas del ganado

20 Se produjo bG-CSF recombinante que contiene una sola sustitución de pAF en la posición T133 (bG-CSF T133pAF-PEG 20 K) en *E. coli*. Esta proteína tenía una metionina N terminal (SEQ ID NO: 2), y la treonina en la posición 134 de SEQ ID NO: 2 se sustituyó con *para*-acetilfenilalanina. La proteína se PEGiló en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG 20 KD y se purificó por cromatografía líquida de intercambio catiónico hasta > 98 % de pureza. La formulación final contenía 7,377 mg/ml de bG-CSF PEGilado en tampón de formulación compuesto por NaAc 4,26 mM; sorbitol al 5 %; Tween 20 al 0,0033 %; NaCl 0,565 nM; pH 4,0,0.

25 Se adquirieron novillos comerciales de carne de vacuno mestizos ingleses o continentales que pesaban aproximadamente 150 kg y se transportaron a la instalación de investigación, en la que se identificaron individualmente con marcas auriculares y se aclimataron durante 7 días antes de la inscripción en el estudio. No se administraron antibióticos ni vacunas a los animales durante los períodos de adquisición o de aclimatación. No se administraron medicamentos concomitantes a los animales durante el estudio. Los animales se alojaron en corrales con suelos de cemento ranurados y se expusieron a temperaturas ambiente. Los animales se alimentaron una vez al día a voluntad con una ración completa de pienso (Rumilab® 5508).

30 El estudio se realizó usando un diseño de bloques completos aleatorizado, en el que los terneros fueron bloqueados por un corral. Doce animales se asignaron a grupos de control tratado o negativo (tampón de formulación sin proteína) (6 animales/tratamiento). Los animales fueron asignados aleatoriamente a los bloques y los tratamientos dentro de los bloques.

35 El día -1, los terneros fueron evaluados por un veterinario para detectar los signos clínicos de enfermedad. Las evaluaciones incluyeron la frecuencia cardíaca, la tasa de respiración y las temperaturas rectales, así como el estado general. Se determinaron los pesos corporales y las temperaturas rectales, y se recogieron muestras de sangre anticoagulada para las evaluaciones hematológicas (muestra previa al tratamiento). Los animales dentro del intervalo de pesos especificado con perfiles hematológicos normales basados en los intervalos de referencia de la literatura y sin signos clínicos de la enfermedad se seleccionaron para su inclusión en el estudio.

40 El día 0, los terneros fueron tratados con una sola inyección subcutánea de bG-CSF T133pAF PEGilado (40 µg/kg) o tampón de formulación (1 ml/125 kg). Las inyecciones se administraron en la región preescapular en el lado izquierdo del cuello.

45 Se recogieron muestras de sangre venosa (~30 ml) en tubos estériles que contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para realizar los recuentos de leucocitos absolutos o ACD (ácido-citrato-dextrosa) para la determinación de los recuentos de neutrófilos absolutos. Los recuentos de leucocitos absolutos se determinaron usando un analizador de sangre Beckman Coulter ACT10™. Los recuentos de neutrófilos absolutos (ANC) se determinaron mediante evaluación de citometría de flujo del porcentaje de neutrófilos de muestras de sangre entera teñidas con CD45 usando un bioanalizador FACSarray™ de Becton Dickinson. Los recuentos de neutrófilos absolutos se calcularon multiplicando el recuento absoluto de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos.

50 Además de las muestras de pretratamiento recogidas el día -1, las muestras se tomaron a las 4, 8 y 12 horas el día 0, 24 y 36 horas después del tratamiento, y una vez al día los días 3-14.

55 Los resultados de la administración de bG-CSF PEGilado en ANC se presentan en la Figura 16. Los animales tratados solo con tampón de formulación presentaron valores de ANC relativamente constantes a lo largo del estudio. Por el contrario, los animales que recibieron bG-CSF PEGilado presentaron un marcado aumento de ANC en las 8 horas posteriores al tratamiento. Se observaron valores máximos de ANC (de aproximadamente 10 veces más que los niveles previos al tratamiento) a las 72 horas después del tratamiento. Los recuentos de neutrófilos absolutos se

redujeron a aproximadamente 4 a 5 veces por encima del nivel previo al tratamiento en el día 5 después del tratamiento, y se mantuvieron en este nivel hasta el día 10. Los valores disminuyeron aún más hasta aproximadamente 3,5 veces sobre el nivel previo al tratamiento desde el día 11 hasta el día 14.

5 Estos resultados indican que la PEGilación específica del sitio de bG-CSF en la posición T133 permitió a los presentes inventores obtener una potente actividad hematopoyética que persistió durante al menos dos semanas en terneros tratados con una sola inyección de proteína.

#### Ejemplo 27

##### Sumario del estudio hematológico de la variante de bG-CSF T-133 PEGilado

10 Se realizó un estudio *in vivo* para evaluar el impacto de la variante de bG-CSF-T133pAF-PEG 20 K en las respuestas hematológicas del ganado.

15 Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una sola sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. La proteína se PEGiló en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG 20 KD y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño hasta > 98 % de pureza. La formulación final contenía 7,377 mg/ml de bG-CSF PEGilado en tampón de formulación compuesto por NaAc 4,26 mM; sorbitol al 5 %; Tween 20 al 0,0033 %; NaCl 0,565 nM; pH 4,0.

20 Se adquirieron novillos comerciales de carne de vacuno mestizos ingleses o continentales que pesaban aproximadamente 150 kg y se transportaron a la instalación de investigación, en la que se identificaron individualmente con marcas auriculares y se aclimataron durante 7 días antes de la inscripción en el estudio. No se administraron antibióticos ni vacunas a los animales durante los períodos de adquisición o de aclimatación. No se administraron medicamentos concomitantes a los animales durante el estudio. Los animales se alojaron en corrales con suelos de cemento ranurados y se expusieron a temperaturas ambiente. Los animales se alimentaron una vez al día a voluntad con una ración completa de pienso (Rumilab® 5508).

25 El estudio se realizó usando un diseño de bloques completos aleatorizado, en el que los terneros fueron bloqueados por un corral. Doce animales se asignaron a grupos de control tratado o negativo (tampón de formulación sin proteína) (6 animales/grupo de tratamiento). Los animales fueron asignados aleatoriamente a los bloques y los tratamientos dentro de los bloques.

30 El día -1, los terneros fueron evaluados por un veterinario para detectar los signos clínicos de enfermedad. Las evaluaciones incluyeron la frecuencia cardíaca, la tasa de respiración y las temperaturas rectales, así como el estado general. Se determinaron los pesos corporales y las temperaturas rectales, y se recogieron muestras de sangre anticoagulada para las evaluaciones hematológicas (muestra previa al tratamiento). Los animales dentro del intervalo de pesos especificado con perfiles hematológicos normales basados en los intervalos de referencia de la literatura y sin signos clínicos de la enfermedad se seleccionaron para su inclusión en el estudio.

35 El día 0, los terneros fueron tratados con una sola inyección subcutánea de bG-CSF PEGilado (40 µg/kg) o tampón de formulación (1 ml/125 kg). Las inyecciones se administraron en la región preescapular en el lado izquierdo del cuello.

40 Se recogieron muestras de sangre venosa (~30 ml) en tubos estériles que contenían EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) para realizar los recuentos de leucocitos absolutos o ACD (ácido-citrato-dextrosa) para la determinación de los recuentos de neutrófilos absolutos. Los recuentos de leucocitos absolutos se determinaron usando un analizador de sangre Beckman Coulter ACT10™. Los recuentos de neutrófilos absolutos (ANC) se determinaron mediante evaluación de citometría de flujo del porcentaje de neutrófilos de muestras de sangre entera teñidas con CD45 usando un bioanalizador FACSarray™ de Becton Dickinson. Los recuentos de neutrófilos absolutos se calcularon multiplicando el recuento absoluto de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos.

45 Además de las muestras de pretratamiento recogidas el día -1, las muestras se tomaron a las 4, 8 y 12 horas el día 0, 24 y 36 horas el día 1, y una vez al día los días 3-14.

50 Los resultados de la administración de bG-CSF PEGilado en ANC se presentan en la Figura 17. Los animales tratados solo con tampón de formulación presentaron valores de ANC relativamente constantes a lo largo del estudio. Por el contrario, los animales que recibieron bG-CSF PEGilado presentaron un marcado aumento de ANC en las 8 horas posteriores al tratamiento. Se observaron valores máximos de ANC (de aproximadamente 10 veces más que los niveles previos al tratamiento) a las 72 horas después del tratamiento. Los recuentos de neutrófilos absolutos se redujeron a aproximadamente 4 a 5 veces por encima del nivel previo al tratamiento en el día 5 después del tratamiento, y se mantuvieron en este nivel hasta el día 10. Los valores disminuyeron aún más hasta aproximadamente 3,5 veces sobre el nivel previo al tratamiento desde el día 11 hasta el día 14 (véase la Figura 17).

55 Estos resultados indican que la PEGilación específica del sitio de bG-CSF en la posición T133 permitió a los presentes inventores obtener una potente actividad hematopoyética que persistió durante al menos dos semanas en terneros tratados con una sola inyección de proteína.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento son para fines ilustrativos.

#### Ejemplo 28

##### **Sumario del estudio de la eficacia contra la mastitis de la variante de bG-CSF T-133 PEGilado**

La eficacia metafiláctica de la variante bG-CSF-T133pAF-PEG 20 K frente a infecciones intramamarias de origen natural asociadas con patógenos de mastitis clave se evaluó usando un modelo de infección inducida por la mastitis.

Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una sola sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. La proteína se PEGiló en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG 20 KD y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño. La formulación final contenía bG-CSF PEGilado en tampón de formulación compuesto por NaAc 10 mM; sorbitol al 5 %; Tween 20 al 0,0033 % a pH 4,0,0.

- 10 Se seleccionaron vacas multíparas periparturientas Holstein-Friesian que pesaban aproximadamente 600-800 kg de manadas de producción comercial. No se administran tratamientos antibacterianos a las vacas en los 30 días previos a la inscripción en el estudio. Los animales fueron alimentados con una ración de comida para vacas seca apropiada antes del parto y una ración de transición para vacas comenzando el día del parto y continuando durante el estudio. Se permitió el acceso a voluntad a los animales al agua dulce. Se siguieron procedimientos rutinarios de crianza de vacas lecheras y las vacas se ordeñaron dos veces al día.

Las vacas sanas se inscribieron en el estudio aproximadamente siete días antes de su fecha prevista de parto basada en los registros de reproducción y una evaluación de su disposición a parir realizada por los ganaderos. Las vacas se asignaron a grupos de tratamiento usando un diseño completamente aleatorizado. Cada grupo de tratamiento contenía aproximadamente cincuenta vacas.

- 20 Las vacas se trataron con solución salina estéril (control negativo), inyecciones diarias (día -7 a día 6) de bG-CSF-T133PAF no PEGilado o varias dosis de variantes de bG-CSF-T133pAF-PEG 20 K el día de la inscripción y el día del parto. Los tratamientos se administraron mediante inyección subcutánea en la región preescapular del cuello.

Un individuo con ocultación de los grupos de tratamiento observó los signos clínicos de mastitis de los animales en cada ordeño en los días 0-28. Las observaciones específicas incluyeron la asignación de una puntuación clínica basada en el aspecto de la leche y el estado de la glándula mamaria. Si se observaba alguna anomalía, se realizaba una prueba de mastitis de California en el/los cuarto/s afectado/s, y se registró la temperatura rectal del animal. Todos los animales que murieron en el transcurso del estudio fueron sometidos a una necropsia para determinar la causa de la muerte, en lo posible.

- 30 Se registró la producción de leche en cada ordeño los días 0-28, y se recogieron las muestras compuestas de leche de los cuartos sanos los días 3, 5, 7 y 10 para el análisis de la composición láctea incluyendo: recuentos de células somáticas, grasa láctea, proteína láctea, lactosa y sólidos. También se recogieron muestras adicionales de leche de cuartos que presentaban anomalías clínicas para la identificación de patógenos bacterianos.

35 Se recogieron los porcentajes de nacimientos vivos y las tasas de concepción del primer servicio después de la reproducción por inseminación artificial para todas las vacas incluidas en el estudio para evaluar el impacto de los tratamientos en la salud reproductiva. También se registraron las observaciones diarias del estado de salud para todos los terneros durante sus primeros 30 días de vida y se documentaron las anomalías para evaluar el impacto de los tratamientos en la salud de los terneros.

- 40 La eficacia se evaluó comparando las tasas de morbilidad entre los grupos de tratamiento tanto para las vacas como para los cuartos individuales. Los puntos finales secundarios incluyeron la evaluación del impacto de los tratamientos en la incidencia de mortalidad, producción de leche, composición de la leche y las tasas de concepción del primer servicio.

El impacto de los diversos tratamientos sobre la incidencia de la mastitis clínica y la mortalidad se resumen en la Tabla 10.

<b>TABLA 10</b>		
<b>Descripción del tratamiento</b>	<b>Morbilidad</b>	<b>Mortalidad</b>
Solución salina ( 2 x SID, Día -7 y Día 0)	26/50 (52 %)	4
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, 14 x SID, Día -7 - Día 6)	16/49 (33 %)	6
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (40 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	6/53 (11 %)	2
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (20 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	7/52 (13 %)	3

La administración de dosis diarias de bG-CSF T-133 pAF no PEGilado redujo significativamente la incidencia de

5 nuevas infecciones por mastitis clínica en relación con los controles de solución salina. La administración de cualquier dosis de bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K redujo significativamente la incidencia de nuevas infecciones por mastitis clínica en relación con los controles de solución salina o las inyecciones diarias de bG-CSF T133-pAF no PEGilado. La administración de cualquier dosis de bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K proporcionó una pequeña reducción numérica en el número de muertes con respecto a los controles de solución salina.

10 El impacto de los tratamientos en la producción diaria de leche de vacas sanas se resume en la Figura 18. Los niveles de producción de leche fueron similares para las vacas tratadas con solución salina estéril, bG-CSF T133-pAF no PEGilado y la dosis más baja de bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K. Estos animales presentaron aumentos en la producción de leche durante el estudio típico de los que se observan normalmente durante el primer mes de lactancia. Los animales tratados con la dosis más alta de bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K presentaron una producción de leche diaria significativamente reducida en comparación con los otros tratamientos a lo largo del estudio.

15 El impacto de los tratamientos sobre los recuentos de células somáticas se resume en la Figura 19. Los animales tratados bien con bG-CSF T133-pAF no PEGilado o bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K presentaron recuentos de células somáticas que eran similares o inferiores a los observados en los controles de solución salina en los Días 3, 5 y 7 después del parto. Para el Día 10 después del parto, los recuentos de células somáticas para los animales tratados con bG-CSF T133-pAF no PEGilado o bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K fueron significativamente menores que los controles de solución salina, lo que sugiere que estos tratamientos probablemente redujeron la incidencia de mastitis no clínica además de la mastitis clínica.

20 Los resultados de los análisis microbiológicos indicaron que las vacas mórbidas presentaron una selección típica de patógenos bacterianos incluyendo coliformes, especies de *Streptococcus*, especies de *Staphylococcus* y especies de *Bacillus*. Estos resultados sugieren que la administración de bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K fue eficaz en la reducción de la enfermedad contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

25 El impacto de los tratamientos sobre los nacimientos vivos y las tasas de concepción del primer servicio se resumen en la Tabla 11. No hubo diferencias significativas en los porcentajes de nacimientos vivos entre los tratamientos, lo que sugiere que los tratamientos experimentales no tuvieron ningún impacto en la viabilidad de los terneros en el útero. Hubo una mejora numérica en las tasas de concepción del primer servicio entre los animales tratados con bG-CSF T133-pAF no PEGilado o bG-CSF T133-pAF-PEG 20, y los controles de solución salina. Estos resultados sugieren que los tratamientos experimentales no tuvieron un impacto negativo en la salud reproductiva.

TABLA 11

Descripción del tratamiento	% de nacimientos vivos	Tasas de concepción del primer servicio
Solución salina ( 2 x SID, Día -7 y Día 0)	94 %	25,6 %
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, 14 x SID, Día -7 - Día 6)	98 %	41,2 %
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (40 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	92 %	34,2 %
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (20 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	93 %	34,2 %

30 El impacto en la exposición del útero a los tratamientos sobre la salud de terneros nacidos de los animales inscritos en el estudio se resume en la Tabla 12. Estos resultados indican que ninguno de los tratamientos experimentales redujo la incidencia de enfermedad entérica o respiratoria en relación con los controles de solución salina durante los primeros treinta días de vida. Sin embargo, tanto bG-CSF T133-pAF no PEGilado como bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K redujo significativamente el número de muertes en relación con los controles de solución salina. Estos resultados sugieren que los tratamientos experimentales tuvieron un impacto positivo en la gravedad de la enfermedad.

TABLA 12

Descripción del tratamiento	Incidencia de la enfermedad entérica	Incidencia de la enfermedad respiratoria	Mortalidades
Solución salina ( 2 x SID, Día -7 y Día 0)	28	1	6
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, 14 x SID, Día -7 - Día 6)	32	1	1
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (40 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	30	2	0

(continuación)

TABLA 12

Descripción del tratamiento	Incidencia de la enfermedad entérica	Incidencia de la enfermedad respiratoria	Mortalidades
bG-CSF T133-pAF-PEG 20 K (20 µg/kg, 2 x SID, Día -7 y Día 0)	34	2	1

**Ejemplo 29****Enfermedad respiratoria de la variante de bG-CSF T-133 PEGilado**5    Sumario del estudio de la eficacia

La eficacia metafiláctica de diversas dosis de la variante de bG-CSF-T133-pAF-PEG 20 K frente a la enfermedad respiratoria bovina que se produce de forma natural se evalúa en condiciones de alimentación comercial.

10    Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una sola sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. La proteína se PEGiló en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG 20 KD y se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño. La formulación final contiene bG-CSF PEGilado en tampón de formulación compuesto por NaAc 10 mM; sorbitol al 5 %; Tween 20 al 0,0033 % a pH 4,0.

15    Se adquieren novillos cruzados ingleses o continentales comerciales con un peso de aproximadamente 227 kg y típico de los terneros de alimentación comercial en una o más barracas de venta del sureste de Estados Unidos. A su llegada al sitio de mezcla, los animales son identificados y examinados individualmente por un veterinario para detectar anomalías clínicas. También se registran las temperaturas rectales y los animales que están exentos de signos clínicos de enfermedad y que tienen temperaturas rectales  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  se seleccionan para la inscripción en el estudio. Se obtienen muestras de sangre para el recuento total y diferencial de glóbulos blancos antes del tratamiento.

Los terneros se asignan al azar a grupos de tratamiento como se describe en la Tabla 13.

TABLA 13

Tratamiento	Pauta posológica	n.º de animales
Solución estéril	1 x SID	40
2) bG-CSF-T133-PEG 20 K (20 µg/kg)	1 x SID	40
3) bG-CSF-T133-PEG 20 K (10 µg/kg)	1 x SID	40
4) bG-CSF-T133-PEG 20 K (5 µg/kg)	1 x SID	40

20    La solución salina estéril o bG-CSF-T133-pAF-PEG 20 K se administra por inyección subcutánea en la región preescapular del cuello.

25    A la mañana siguiente, se cargan los terneros en camiones y se envían aproximadamente 2.250 km a una granja comercial del norte de Colorado. A su llegada, los terneros se descargan en corrales de llegada y se les proporciona acceso a alimento y agua. En el transcurso de las cuatro horas posteriores a la llegada, los animales se trasladan a una zona de procesamiento en la que se pesan, y los diez primeros terneros asignados a cada grupo de tratamiento se sangran para obtener muestras para recuentos totales y diferenciales de glóbulos blancos. Estos recuentos se usan para confirmar que los animales están respondiendo al tratamiento como lo demuestra un aumento en el número absoluto de neutrófilos. Los terneros se distribuyen aleatoriamente en corrales de estudio que contienen cinco animales de cada grupo de tratamiento para un total de 20 animales por corral.

30    Los terneros se observan diariamente durante 14 días después de la llegada por parte de un veterinario con ocultación de las asignaciones de tratamiento para los signos clínicos de la enfermedad. Cada animal recibe una puntuación de la enfermedad, que varía de 0 (sano) a 4 (moribundo). Los animales que presentan puntuaciones de enfermedad  $> 0$  se trasladan a una zona de procesamiento y se registra su temperatura rectal. Los animales que presentan puntuaciones de enfermedad  $> 0$  y temperaturas rectales  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  se identifican como mórbidos y se tratan con un antibiótico aprobado, y se devuelven a su corral de estudio. Se registran las identidades de los animales que mueren en el transcurso del estudio y el animal se somete a una necropsia para determinar la causa de la muerte.

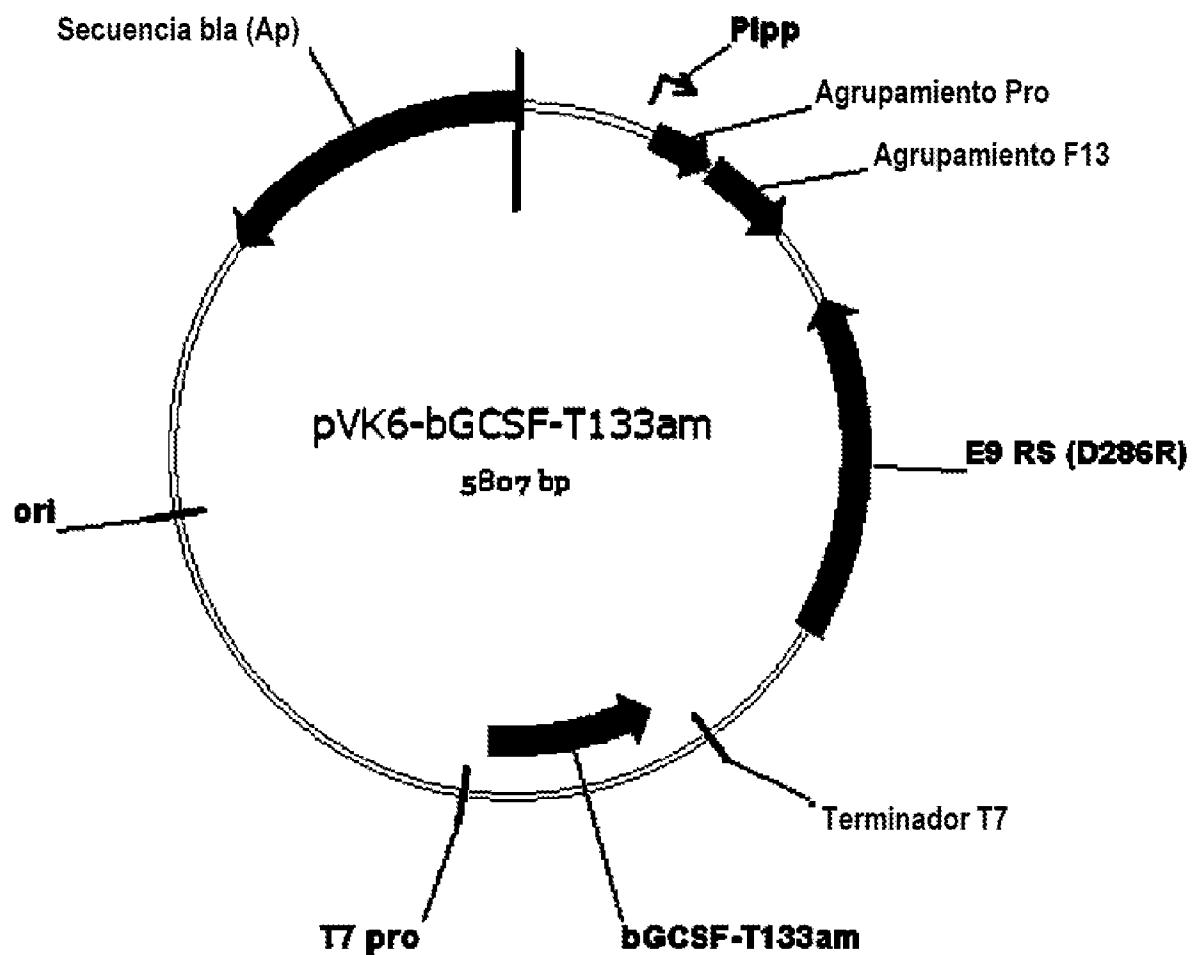
El criterio de valoración primario para determinar la eficacia es la tasa de morbilidad relativa entre los grupos de tratamiento. Los criterios de valoración secundarios de la eficacia incluyen las tasas de mortalidad, las ganancias medias de peso diarias y las puntuaciones medias de enfermedad diarias para cada grupo de tratamiento.

- 5 Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la materia, y se incluirán dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en el que el aminoácido de la posición 133 de SEQ ID NO: 1, o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2, está sustituido con el aminoácido *para*-acetilfenilalanina no codificado de manera natural, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está unido a un polímero hidrosoluble que comprende una fracción de poli(etilen)glicol; y el polímero hidrosoluble tiene un peso de entre 0,1 kDa y 50 kDa.
- 10 2. Un polipéptido bG-CSF de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 40 kDa.
- 10 3. Un polipéptido bG-CSF de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de 20 kDa.
- 15 4. Un polipéptido bG-CSF que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en donde el aminoácido en la posición 133 de SEQ ID NO: 1, o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2 , está sustituido con el aminoácido *para*-acetilfenilalanina codificado de forma no natural, en el que el aminoácido codificado de forma no natural está unido a un polímero soluble en agua que comprende una fracción de poli(etilen)glicol; y el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.
- 20 5. Un polipéptido bG-CSF de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 40 kDa.
- 20 6. Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido bG-CSF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Una composición que comprende el polipéptido bG-CSF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. La composición de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento o prevención de mastitis en un animal.
- 25 9. Un polipéptido bG-CSF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polímero soluble en agua está unido a dicho polipéptido mediante un enlace oxima.
- 25 10. Un polipéptido bG-CSF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en terapia de un animal.

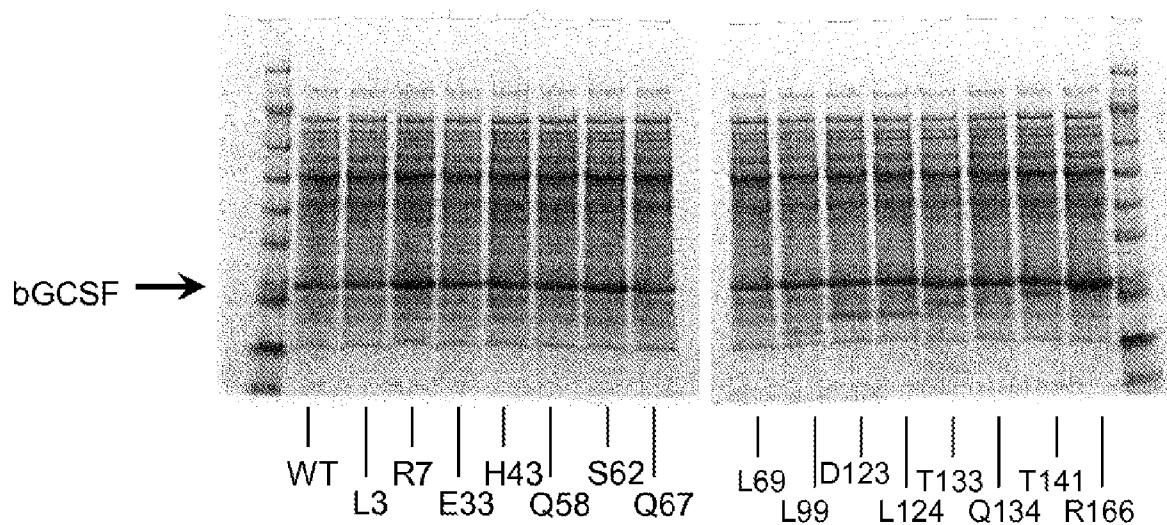
Figura 1



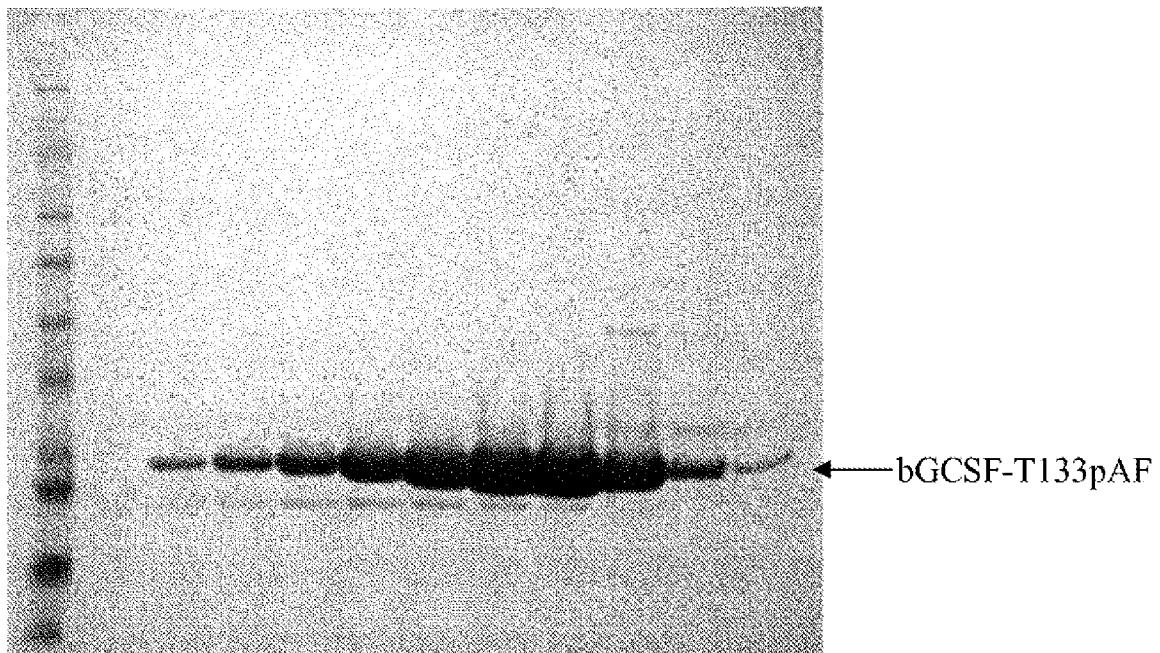
**Figura 2**Cepa: *E.coli* derivada de la cepa K12-W3110 de *E.coli*Genotipo: F- I- *rph-1* INV(*rrnD - rrnE*) *araB::g1 tetA*

<b>Genotipo</b>	<b>Explicación</b>
F-	El huésped carece del episoma F'.
λ-	No oligosénico: el fago no se integra en el cromosoma
<i>rph-1</i>	desplazamiento de fase de lectura en rph (PH ribonucleasa) que afecta los niveles de expresión de pyre (orotato fosforibosiltransferasa)
INV( <i>rrnE-rrnD</i> )	la porción de cromosoma (785 kb) entre los genes <i>rrnE</i> y <i>rrnD</i> está invertida
<i>araB::g1 tetA</i>	gen <i>g1</i> de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor <i>araB</i> . El marcador de inserción es <i>tetA</i> (resistencia a tetraciclina)

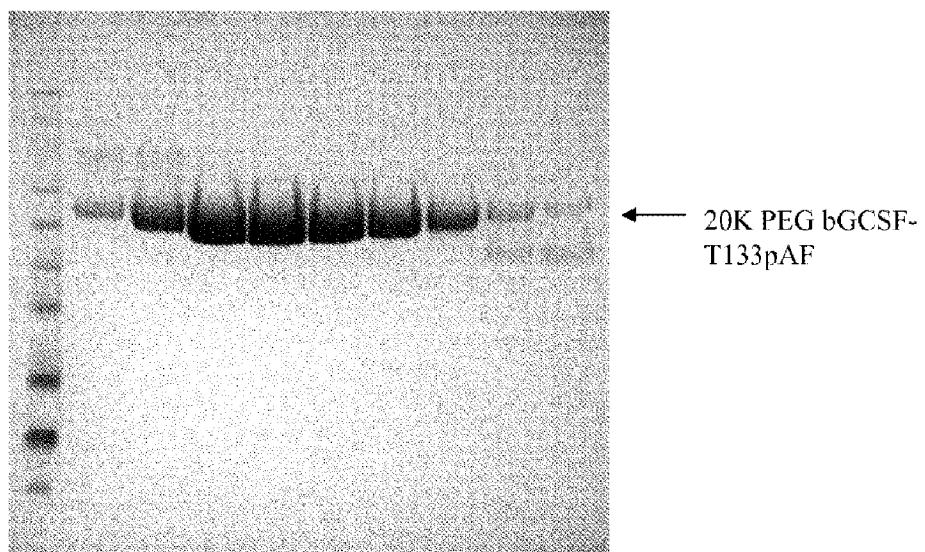
**Figura 3**



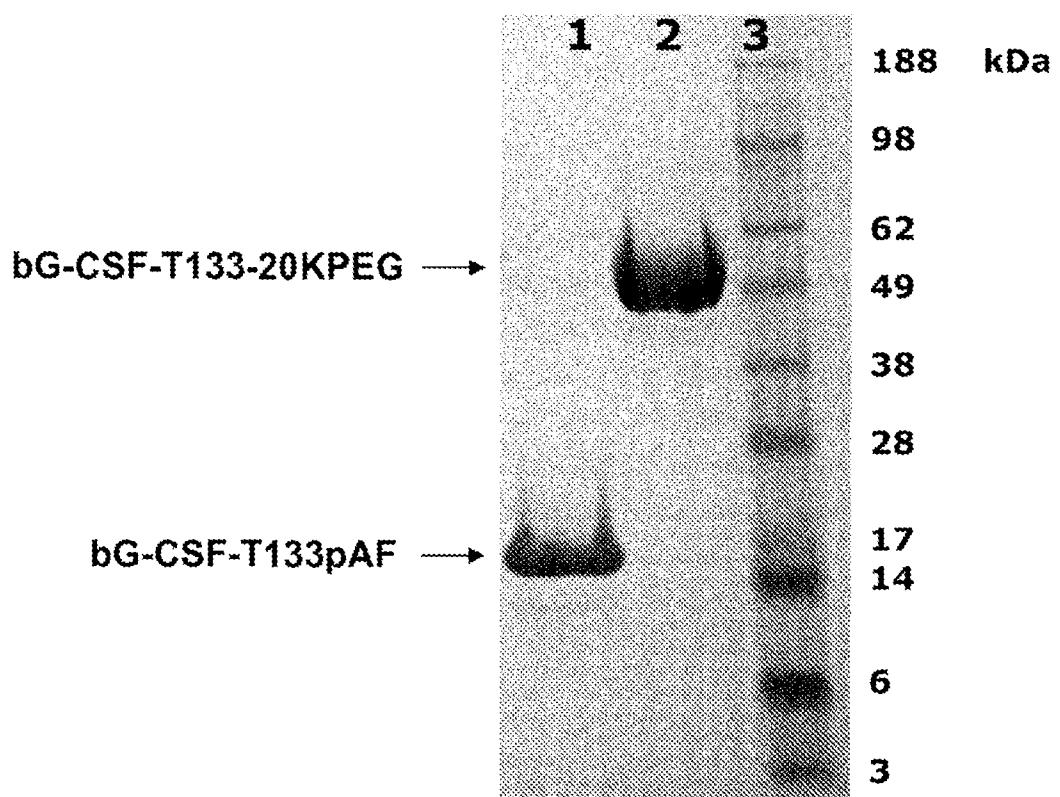
**Figura 4**

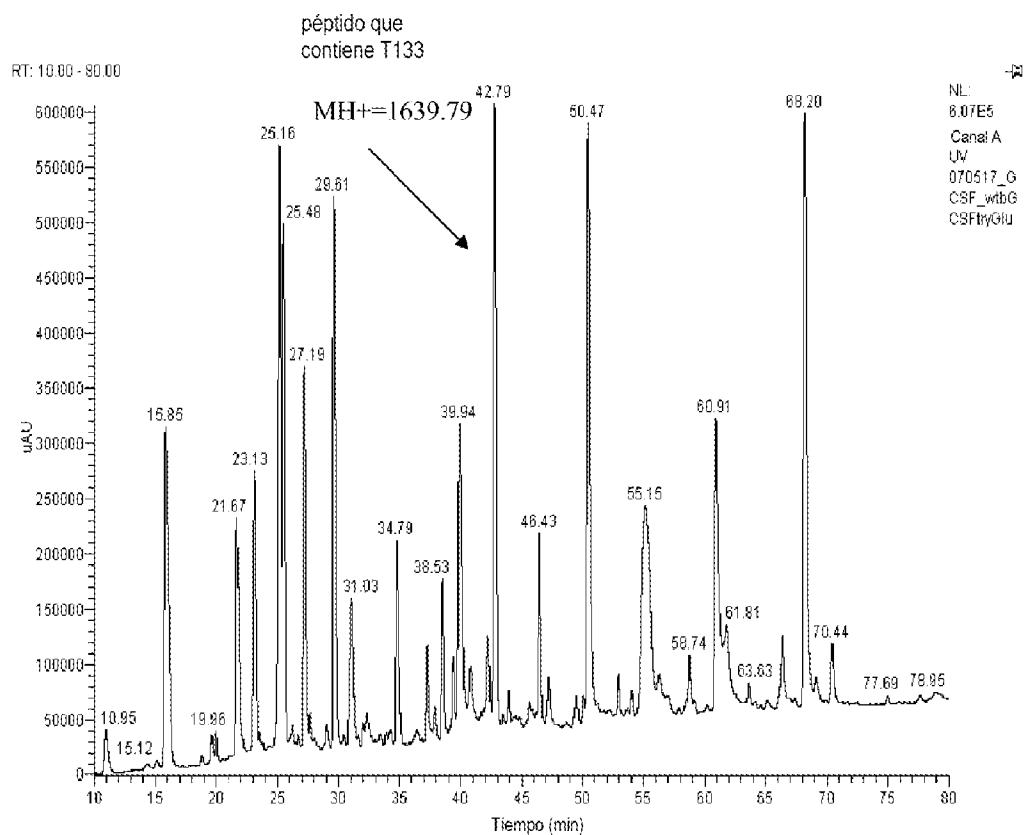


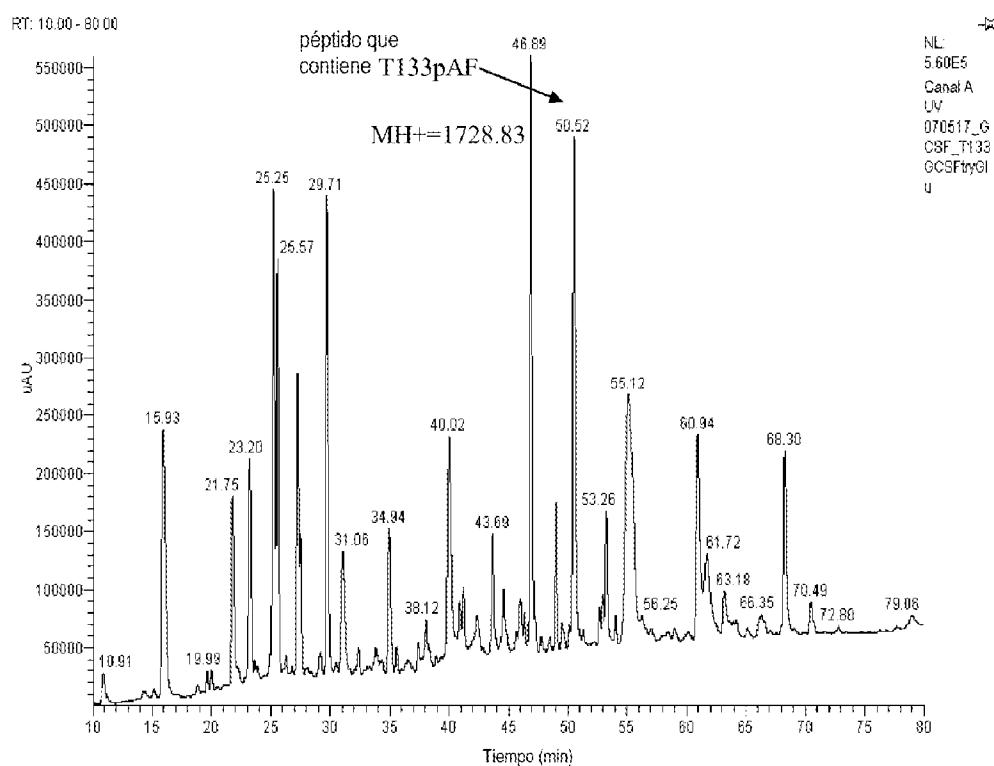
**Figura 5**

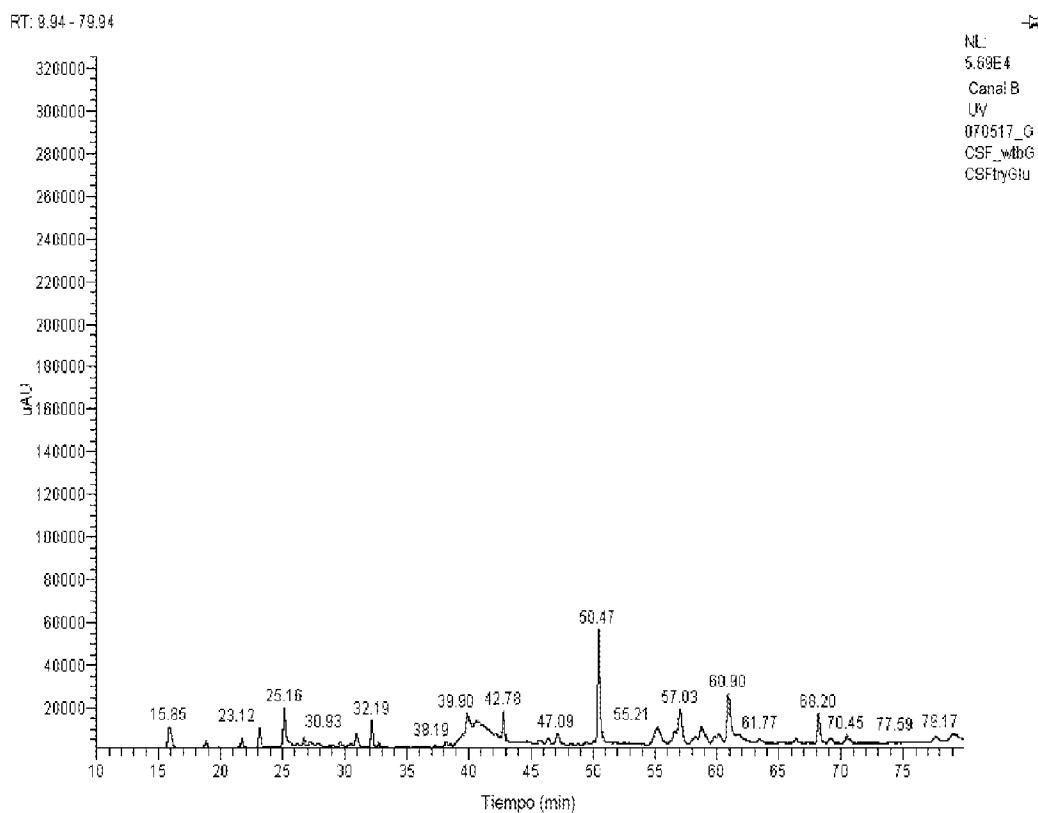


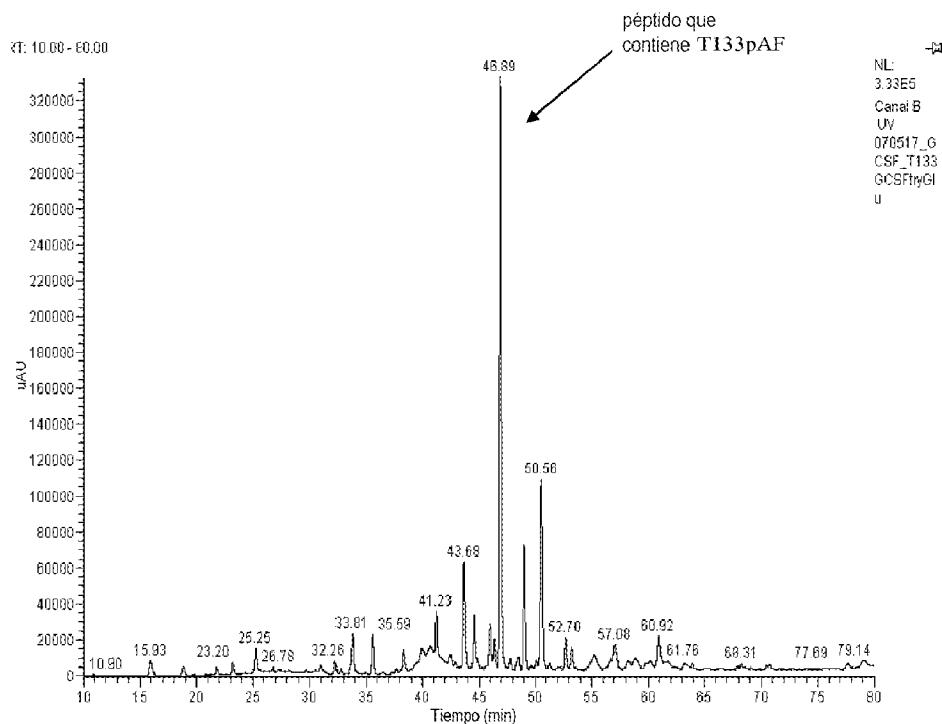
**Figura 6**



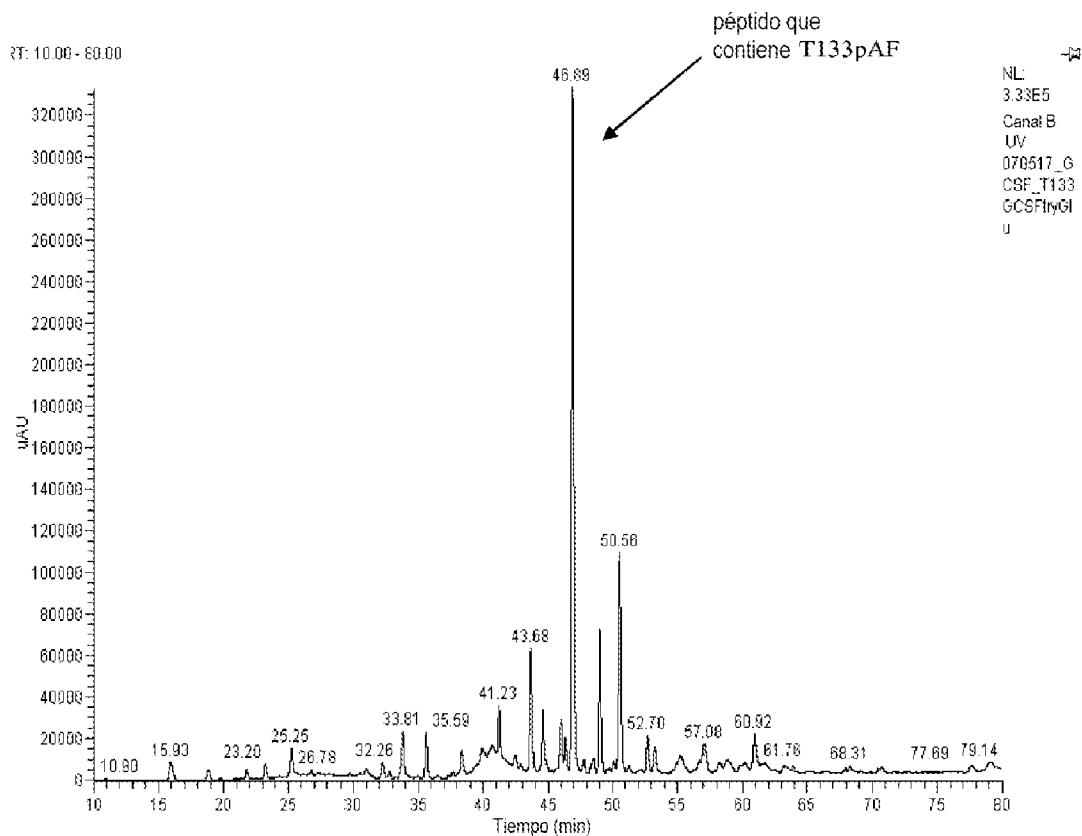
**Figura 7a**

**Figura 7b**

**Figura 8a**

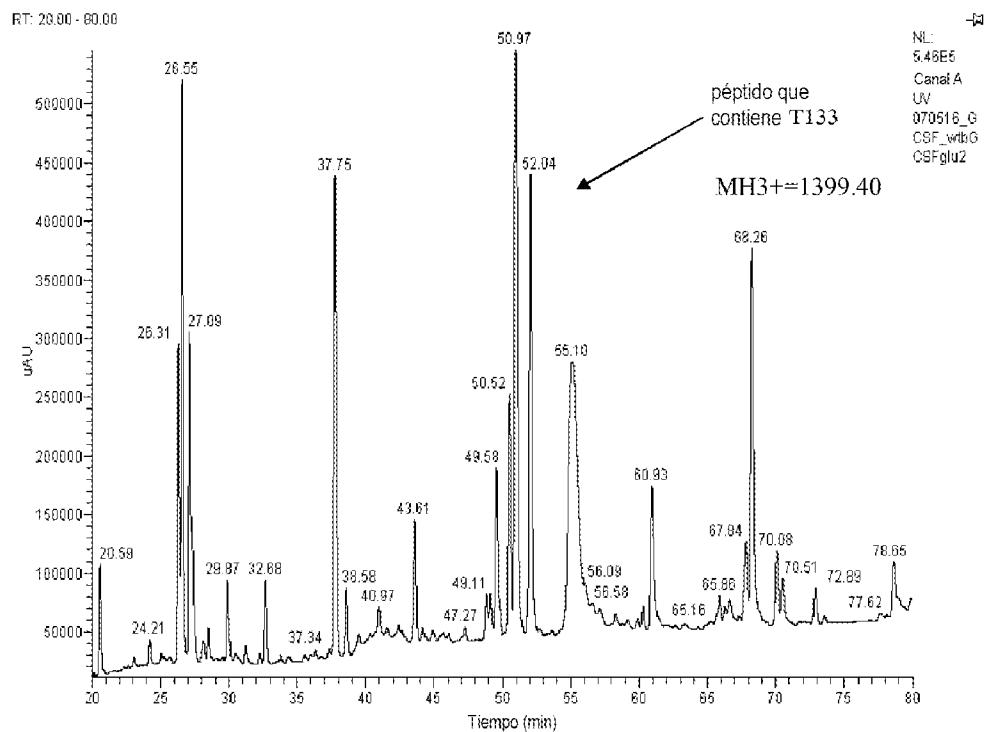
**Figura 8b**

**Figura 8b**

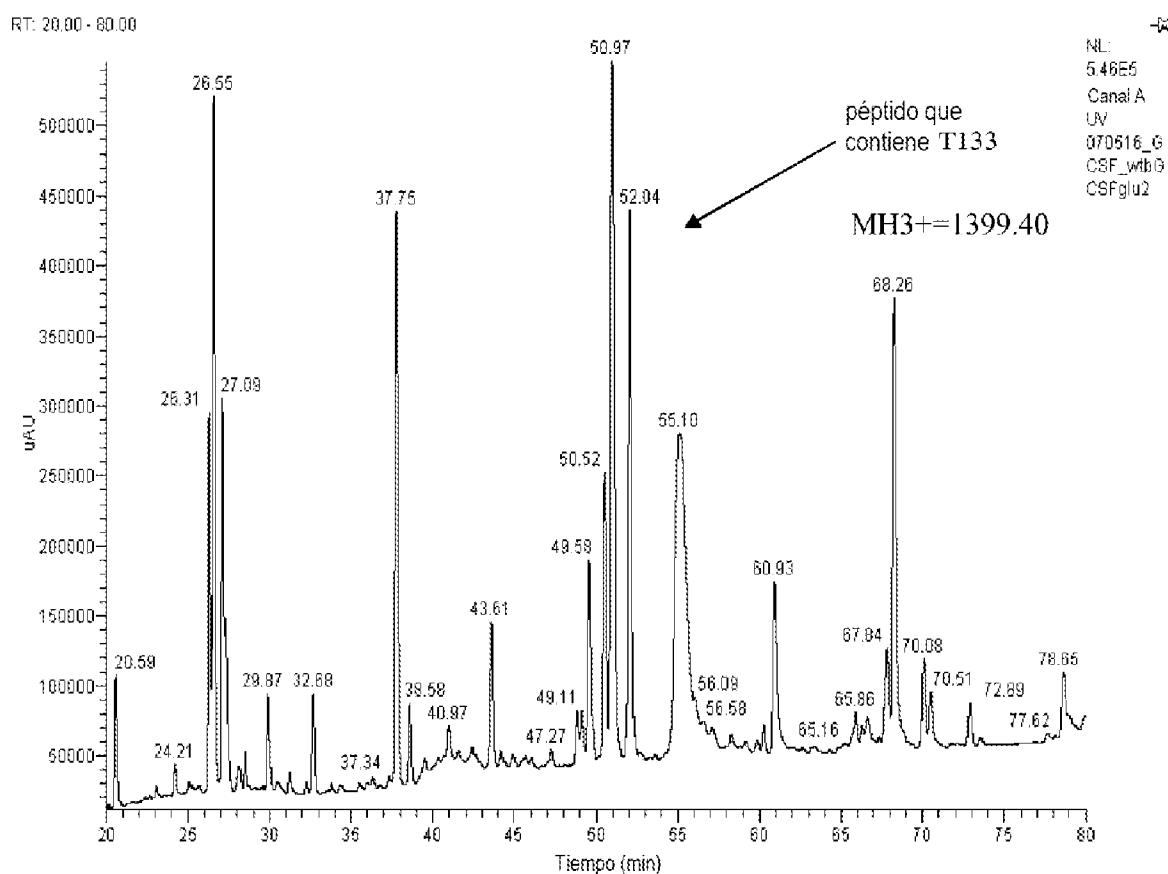


**Figura 9a**

# ES 2 963 062 T3

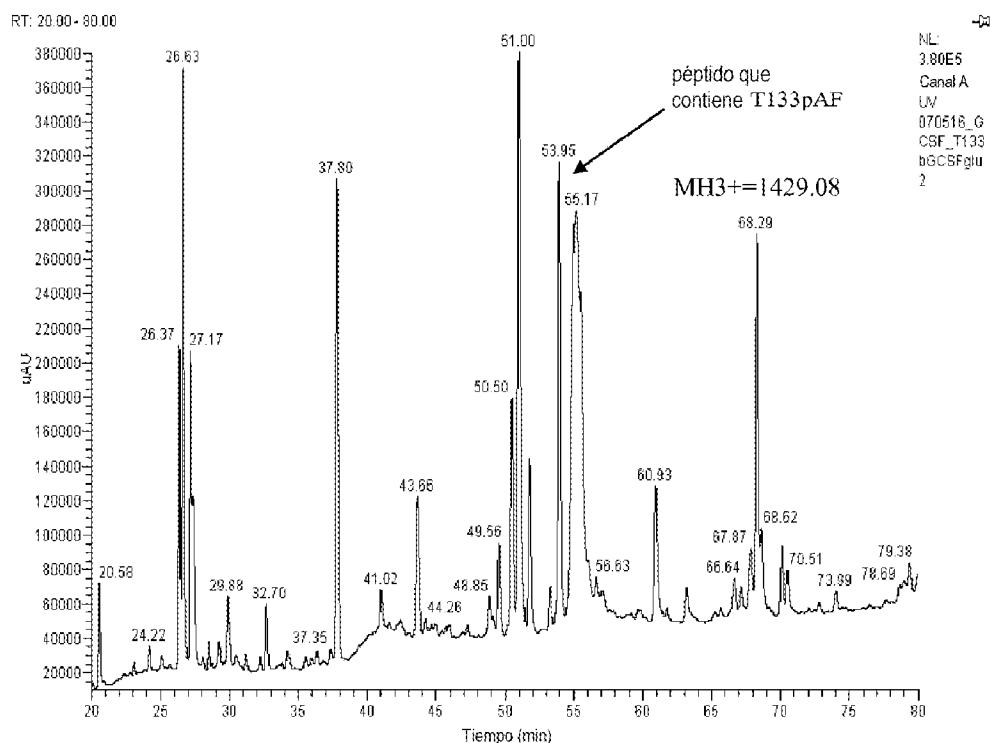


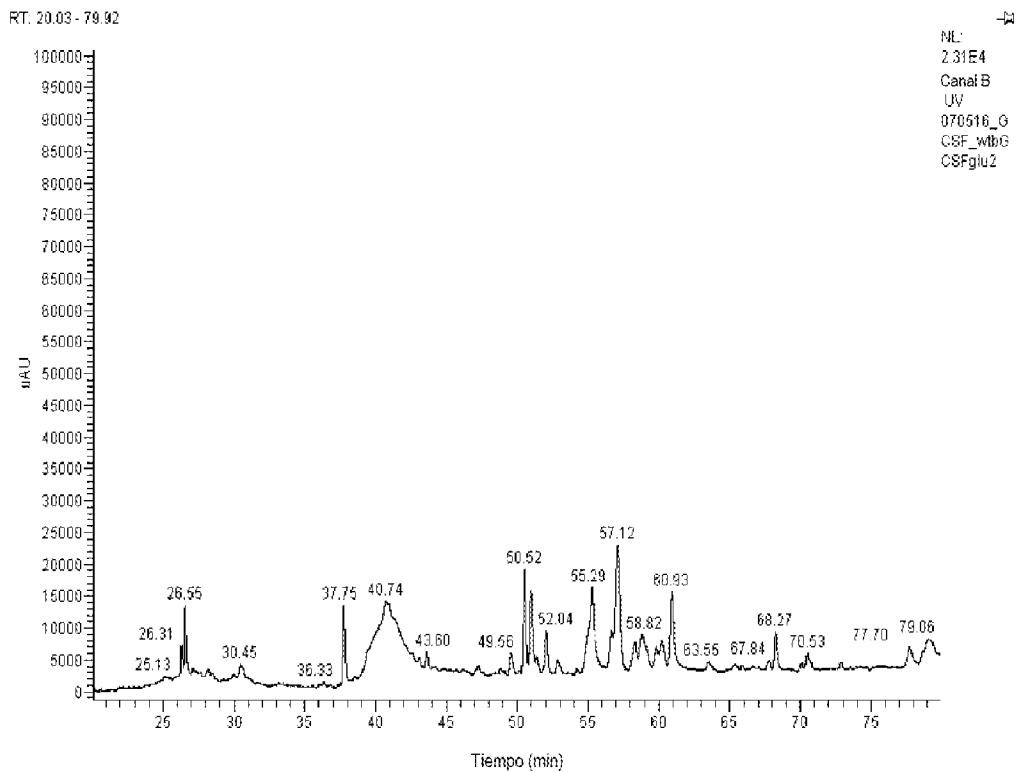
# ES 2 963 062 T3



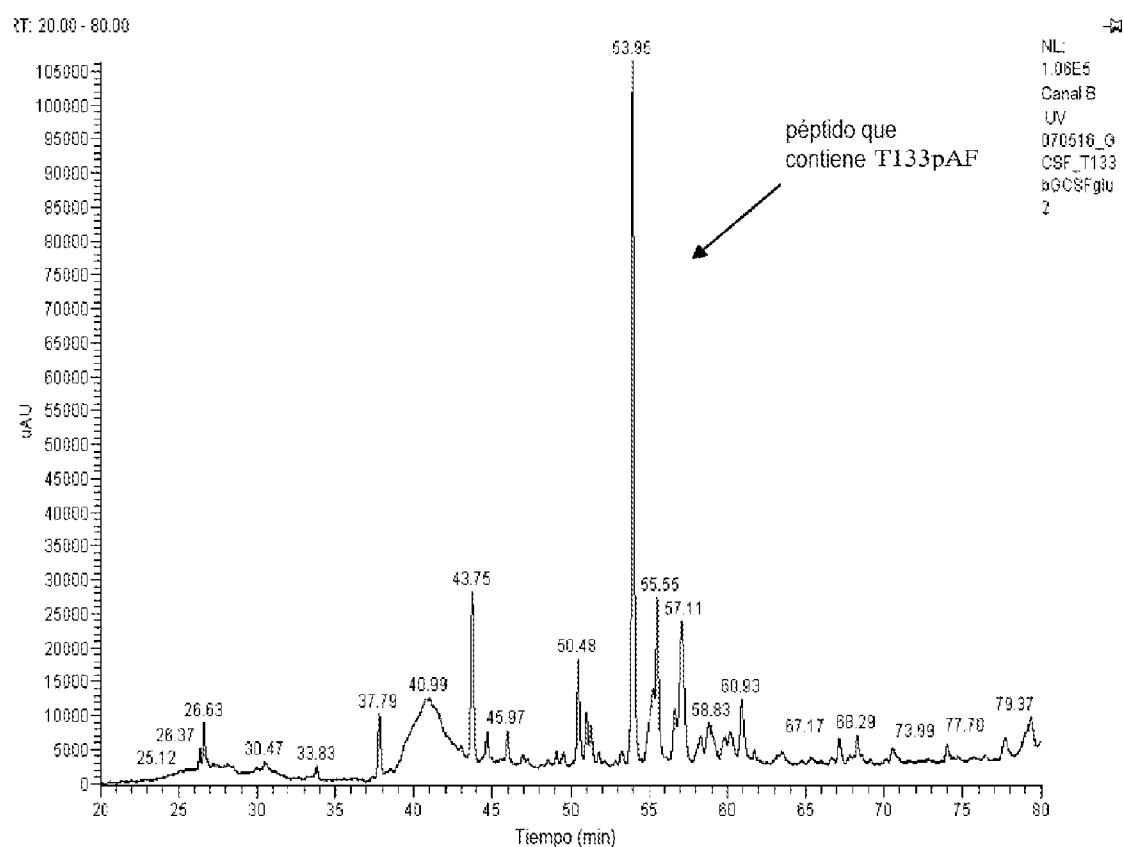
**Figura 9b**

# ES 2 963 062 T3

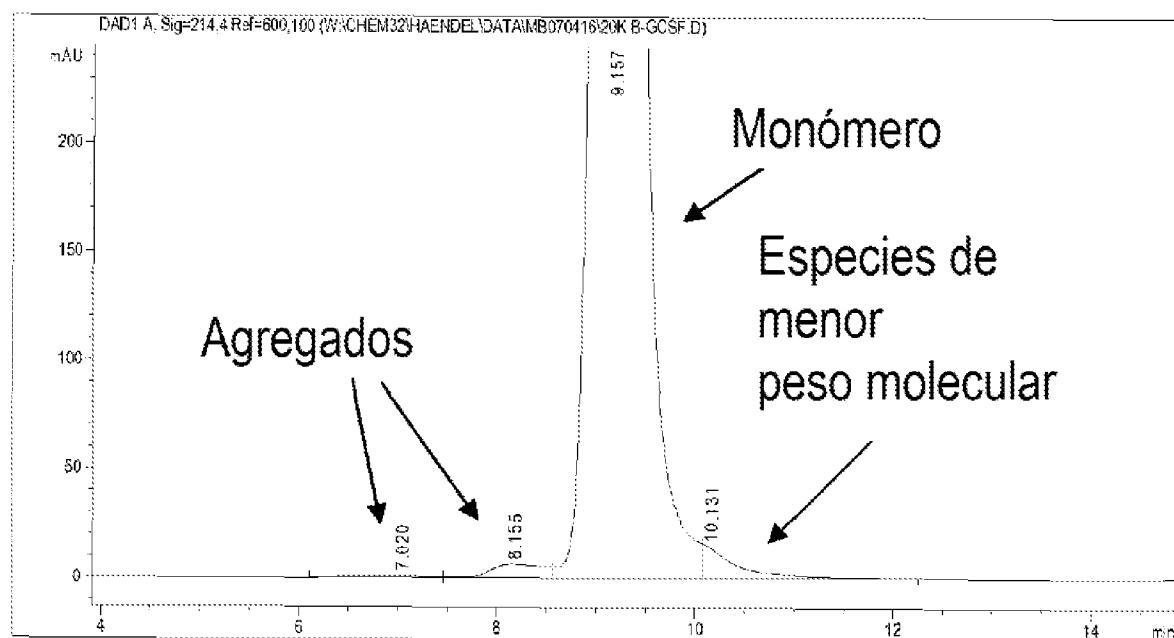


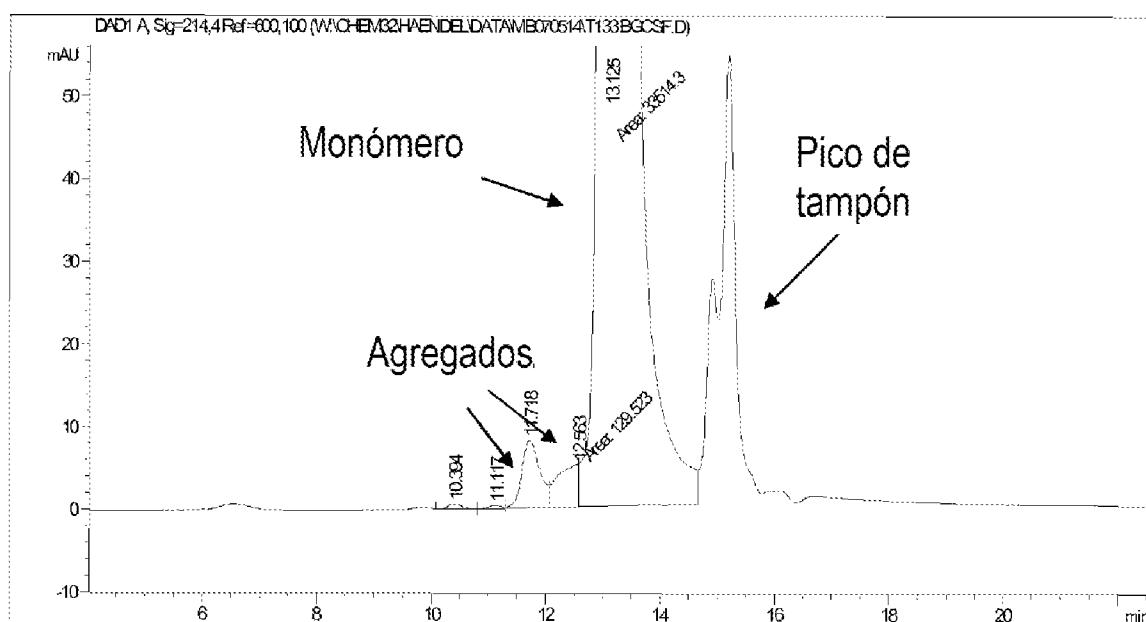
**Figura 10a**

**Figura 10b**



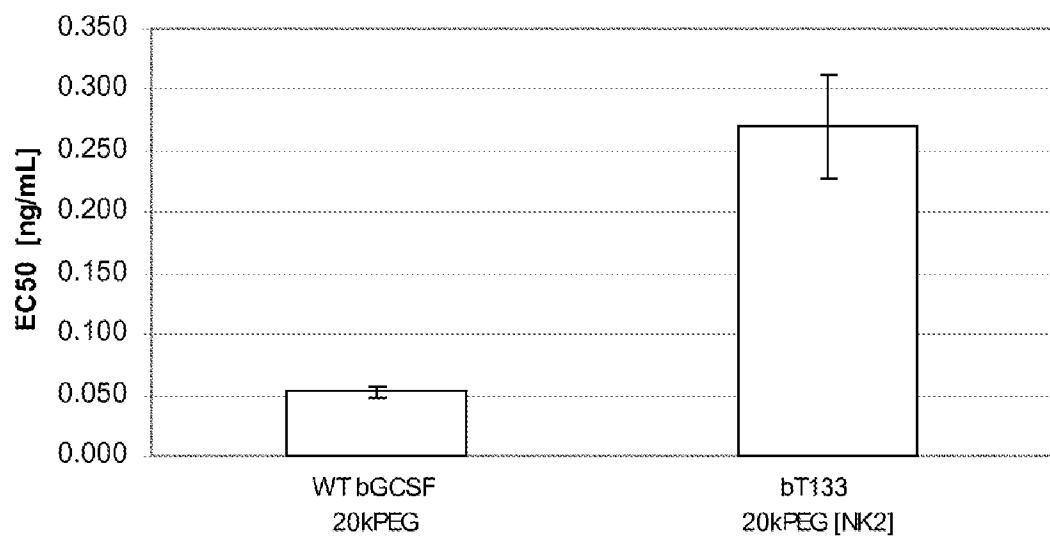
**Figura 11**



**Figura 12**

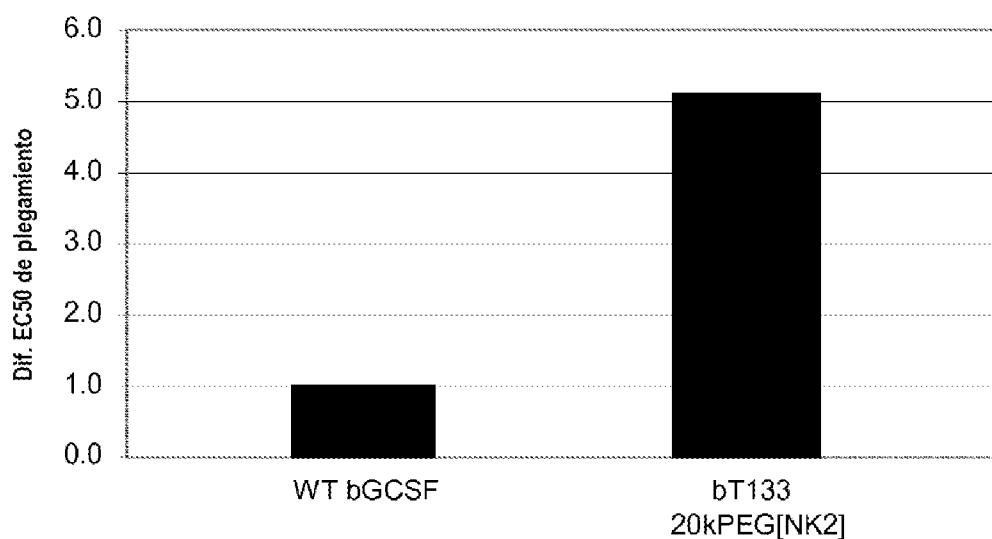
**Figura 13**

**Ensayo de proliferación de NFS60 - Valores EC50 en bruto de compuestos 20kPEGilados**

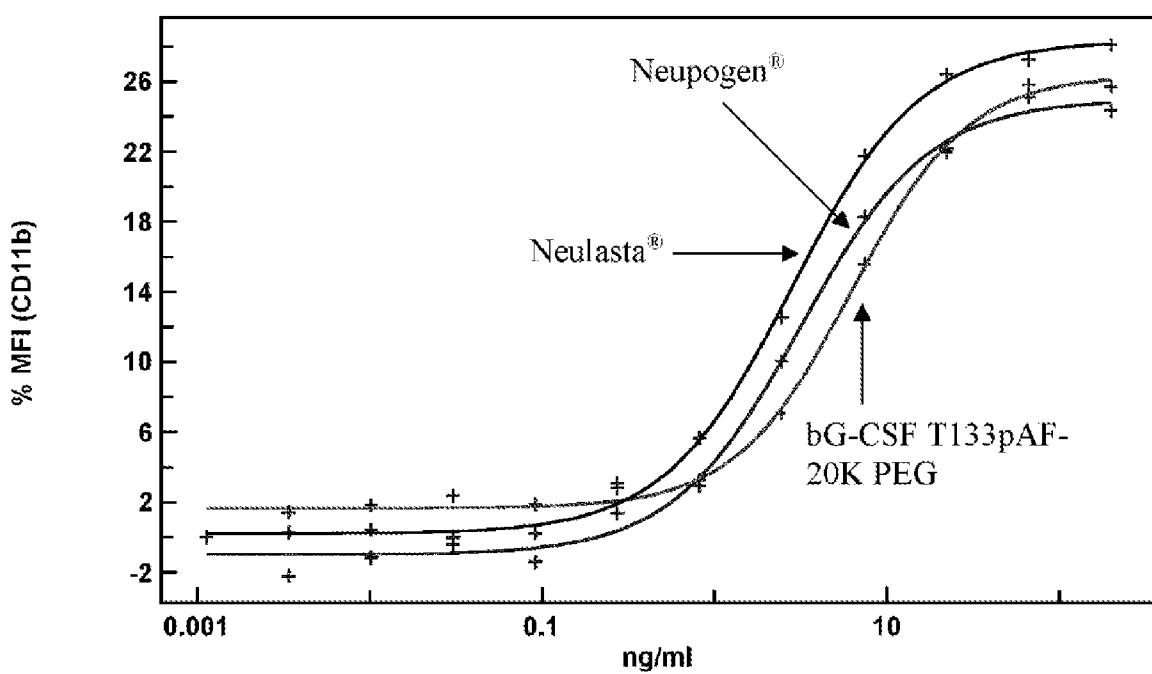


**Figura 14**

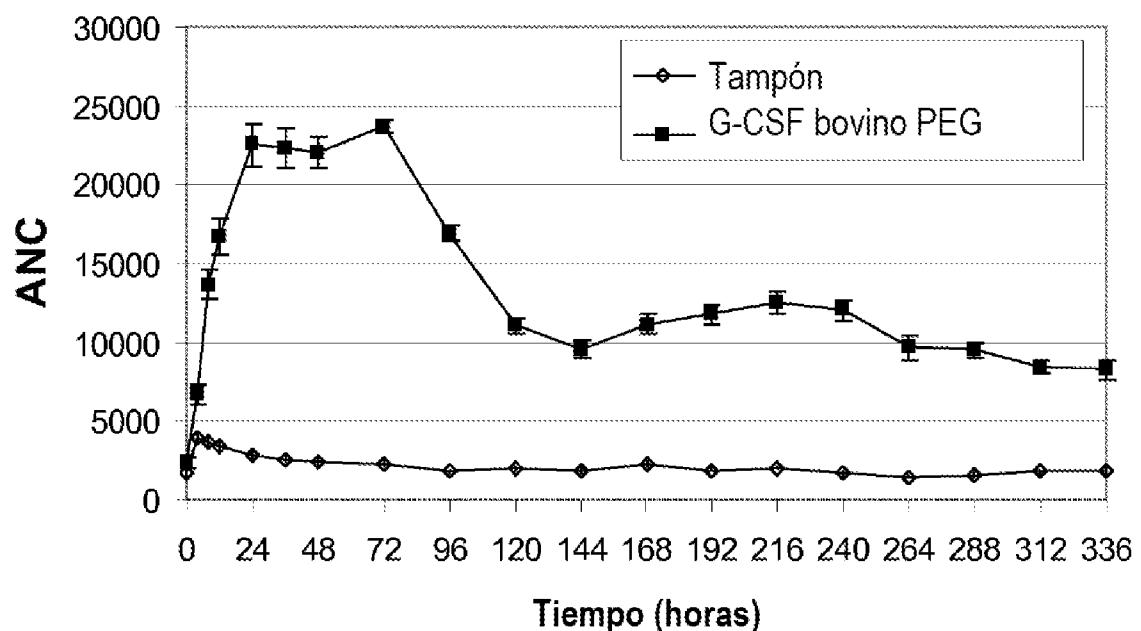
Ensayo de proliferación de NFS60 - Diferencias EC50 de plegamiento vs WT



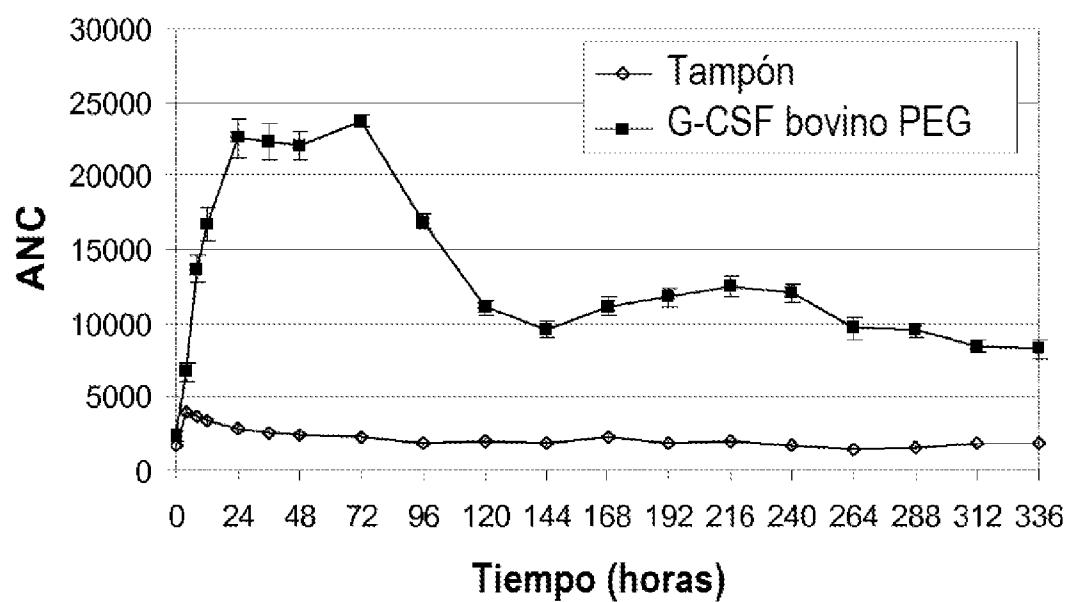
**Figura 15**



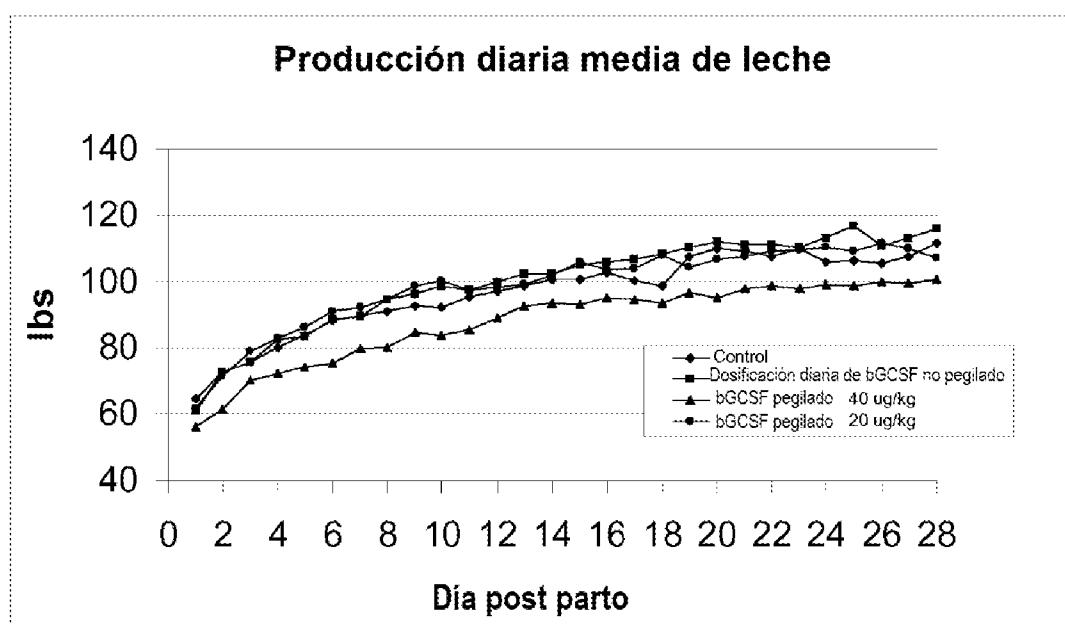
**Figura 16**



**Figura 17**



**Figura 18**



**Figura 19**

