



No. 11-019241-00000-0000

Fecha: 2011-02-17 10:19:44

Dep: 2020 DIR. NUEVASOR

Tra: 11 PATENTE/II

Evs: 378 FASE NACIONAL I

Act: 411 PRESENTACION

Folios: 463



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

11-1924154 TÍTULO "POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS
MODIFICADOS Y SUS USOS".51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 38/0071. SOLICITANTE AMBRX, INC. Y ELI LILLY AND
COMPANY.DOMICILIO LA JOLLA, ESTADO DE CALIFORNIA;
INDIANÁPOLIS, ESTADO DE INDIANA, ESTADOS
UNIDOS DE AMÉRICA.74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.21522. BOGOTÁ, D.C. 17 FEB 2011

(FORMA P 10)

Rodríguez, Juan
23-02-2011
N. E.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019241- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 16:19:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 483

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **AMBRX, INC. Y ELI LILLY AND COMPANY.**

Dirección: 10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla, California 92037 y Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: La Jolla, Estado de California; Indianápolis, Estado de Indiana, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLORED RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-33 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: HAYS PUTNAM, Anna-Maria, A.; KNUDSEN, Nick; NORMAN, Thea; KODER, Alan; FRAYNOV, Vadim; HO, Lillian y CANNING, Peter, C.

Dirección: 11522 Césped Drive, San Diego, CA 92124; 10709 Matinal Circle, San Diego, CA 92127; 1729 Bancroft Street, San Diego, CA 92102; 9845 Paseo Montalban, San Diego, CA 92129; 5457 White Oak Lane, San Diego, CA 92130; 6232 Canyon Bluff Court, San Diego, CA 92121 y 6652 Braemar Avenue, Noblesville, IN 46062.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/051388

Fecha: 22/07/09

Publicación Internacional No. WO 2010/011735 A3

Fecha: 28/01/10

⑥

Título

"POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 38/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(23) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

22/07/08

61/083,132

⑨

Comprobante de Pago No. 11-006417

Fecha: 24-01-2011

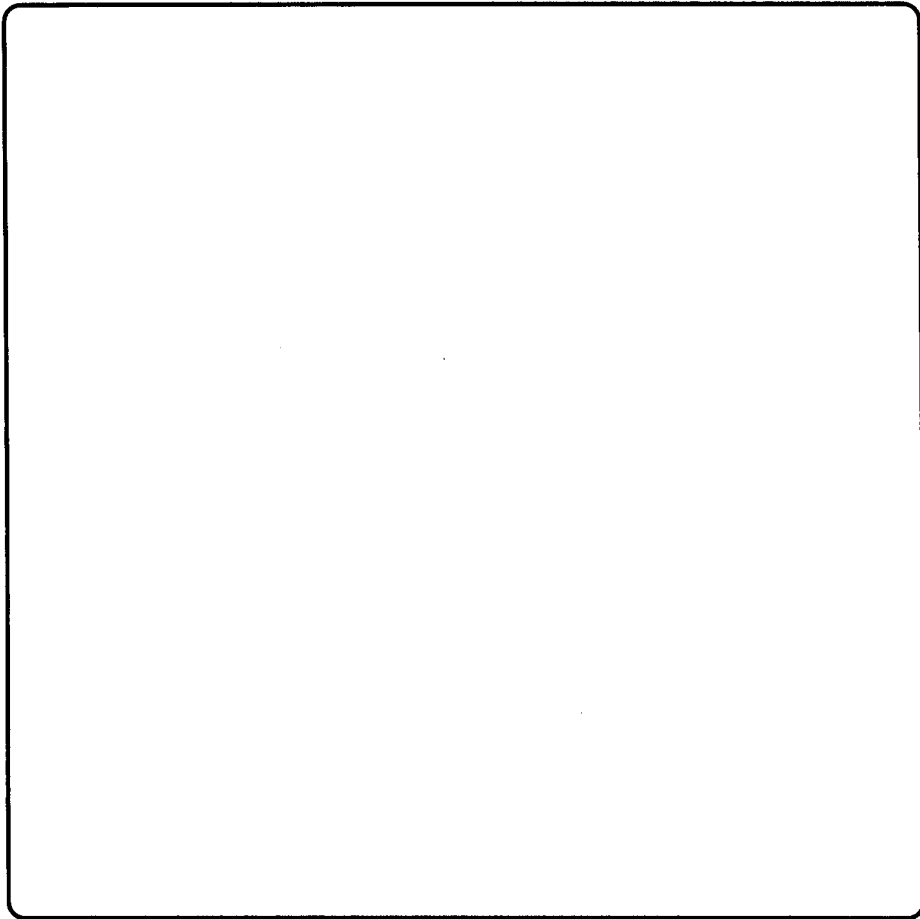
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Anexos al reporte de búsqueda Internacional, publicación, opinión escrita y listado de secuencias.

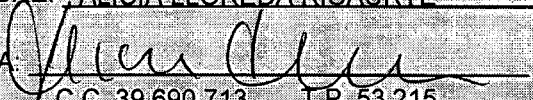
11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE
FIRMA: 
C.C. 39.690.713 T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 006417

Bogotá D.C., Enero 24 de 2011 - 16:53:58

RECIBIDO DE : LLOPEDA & CIA. S.A.

NI 230.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VL PAGO
CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	142967393	24/01/2011	26.536.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. REUTISTICO	CONCEPTO	VL AUDITARIO	VL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019241- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 16:19:44
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 463

Sede: Centro: Carrera 15 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Computador: (571) 5070000 Fax: (571) 5070264 Línea: 010000-919135 Call Center: (571) 6510210

Enero 24 de 2011 - 16:54:02

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 38/00	
(22) Fecha de solicitud: 17-02-11		(71) Solicitante(s): AMBRX, INC. Y ELI LILLY AND COMPANY.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/083,132	(32) Fecha 23-07-08	(33) País US
		(72) Inventor(es): HAYS PUTNAM, Anna-Maria, A.; THUDSEN, Nick; NORMAN, Thea; KODEP, Alan; KRAYNOV, Vadim; HO, Lillian y CANNING, Peter, C.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 23-02-11		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 28-01-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 22-07-09		No. publicación: WO 2010/011735 A3	
No. de solicitud: PCT/US2009/051388			
(54) Título: "POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS"			

Reivindicación número 1-

Polipéptido bG-CSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT ____ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 17-02-2011

(51) Clasificación Internacional: A61K 38/00

(71) Solicitante(s): **AMBRX, INC. Y ELI LILLY AND COMPANY.**

(72) Inventor(es): HAYS PUTNAM, Anna-Maria, A.; FNUDSEN, Nick; NORMAN, Thea; KODER, Alan; FRAIMOV, Vadim; HO, Lillian y CANNING, Peter, C.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

61/083,132

23-07-08

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 23-02-11

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 22-07-09

No. de solicitud: **PCT/US2009/051388**

(87) Publicación internacional

Fecha: **28-01-10**

No. publicación: **WO 2010/011735 A3**

(54) Título: **POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS.**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 17-02-2011	
(51) Clasificación Internacional: A61F 38/00			
(71) Solicitante(s): AMBRX, INC. Y ELI LILLY AND COMPANY.			
(72) Inventor(es): HAYS PUTNAM, Anna-Maria, A.; ENUDSEN, Nick; NORMAN, Thea; RÖDER, Alan; KRAYNOV, Vadim; HO, Lillian y CANNING, Peter, C.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
	61/083,132	23-07-08	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 23-02-11		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 28-01-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 22-07-09		No. Publicación: WO 2010/011735 A3	
No. de solicitud: PCT/US2009/051388			

FIGURA CARACTERISTICA
6 X 6 cm

(54) Título: **POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS.**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Polipéptido hG-CSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
JOHN W. WALLEN III
10975 NORTH TORREY PINES ROAD, SUITE
100
LA JOLLA, CA 92037

REC'D FEB 25 2010

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
 THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
 SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference AMBX-0154.00PCT	Date of mailing (day/month/year) FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 03/51358	International filing date (day/month/year) 22 July 2009 (22.07.2009)
Applicant: AMBRX, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 6270

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.2, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of **30 months** from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within **19 months**.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	---

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To: JOHN W. WALLEN III 10975 NORTH TORREY PINES ROAD, SUITE 100 LA JOLLA, CA 92037	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;">Date of mailing (day/month/year)</td> <td style="padding: 2px;">19 FEB 2010</td> </tr> </table>	Date of mailing (day/month/year)	19 FEB 2010
Date of mailing (day/month/year)	19 FEB 2010		
Applicant's or agent's file reference AMBX-0154.00PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below		
International application No. PCT/US 09/51388	International filing date (day/month/year) 22 July 2009 (22.07.2009)		
Applicant AMBRX, INC.			

1.	☒	The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith. Filing of amendments and statement under Article 19: The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46): When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report. Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 9270 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
2.	☐	The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3.	☐	With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that: ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the text of both the protest and the decision thereon to the designated Offices. ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
4.		Reminders Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication. The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date. Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. See the Annex to Form PCT/IE/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the <i>PCT Applicant's Guide</i> , Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AMBX-0154.00PCT	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 09/51388	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22 July 2009 (22.07.2009)	(Earlier) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 23 July 2008 (23.07.2008)
Applicant AMBRX, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rule 12.3(a) and 22.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/51388

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/51388

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-10, 16, 22-53, 56-68, 71-73, and 82-104, directed to a bovine GC3F polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted before position 1 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-10, 16, 21-53, 56-68, 71-76, and 81-104, limited to modification before the n-terminus or at residue 133 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding residues in SEQ ID NO: 2.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/51388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/00 (2010.01)

USPC - 530/399; 514/2

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC: 530/399; 514/2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
530/399; 514/2 (text search)Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Electronic data bases: PubWEST (EPAB, JPAB, USPT, PGPB); Google Scholar, GenCore Sequence Search (AA)
Search terms: G-CSF, bovine G-CSF (bG-CSF), non-naturally encoded amino acids, PEGylation, Threonine 133, O-glycosylation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2003/0146731 A1 (CHOI et al.) 19 June 2003 (19.06.2003). Especially para [0041], [0053], [0057], [0058], [0060-0077], [0083], [0141], [0146], [0226], [0459], [0538], [0563], [0569]	71, 72, 87-90, 92-95 ----- 1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 73-76, 81-86, 91, 96-104
Y	US 5,849,883 A (BOONE et al) 15 December 1999 (15.12.1999). Especially col 10 ln 32-49	1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 73-76, 81-86, 91, 96-104
Y	US 2005/0142102 A1 (SCHAEBITZ). 30 June 2005 (30.06.2005). Especially SEQ ID NO: 32.	10, 15, 16, 21, 73-76, 81-86
Y	The MGC Project Team. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). Genomes Res October 2004 Vol 14 Pages 2121-2127. Abstract only and TrEMBL Accession number Q8N4W3.	15, 21, 81
L	UniProt/EB. Q8N4W3--Colony Stimulating Factor 3 (Granulocyte). 1 October 2002 [online] [Retrieved 11 January 2010]. Available on the internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/Q8N4W3 >. Especially sequence pg 2. Provided in support of the link between the MGC Project Team document, and the sequences of G-CSF.	15, 21, 81

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 2010 (11.01.2010)

Date of mailing of the international search report

19 FEB 2010

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group II: claims 1, 11-13, 16-19, 73 and 76-79, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 3 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group III: claims 1, 14, 20, 73, 76 and 80, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 62 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group IV: claims 1, 15, 21, 73, 76 and 81, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 133 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group V: claims 54, 55, 69 and 70, directed to an isolated nucleic acid that encodes a bovine GCSF polypeptide.

The inventions listed as Groups I - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups I-IV is a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, wherein each Group is directed to a polypeptide comprising a modification at a specific residue. The special technical feature of the Group V claims is an isolated nucleic acid encoding a bovine GCSF polypeptide.

One common technical element shared by the above groups is that they are related to bovine GCSF polypeptides having non-natural amino acids. This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2004/0096945 A1 to Dahiyat et al. (see para [0059], [0060], [0086] and [0152]). The Groups share a further common technical element of being modified forms of a particular initial amino acid sequence. However, this common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2004/0141946 A1 to Schaeblitz et al. (see para [0055], [0056], [0057] and SEQ ID NO: 33 in comparison to Applicants' SEQ ID NO: 1). Therefore, the inventions of Groups I - V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note: Applicants may elect for further modified sequences to be searched by specifying the particular residue at which the modification may be made, and by paying an additional invention fee for each selected site of modification.

DOCUMENTOS ANEXOS AL REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

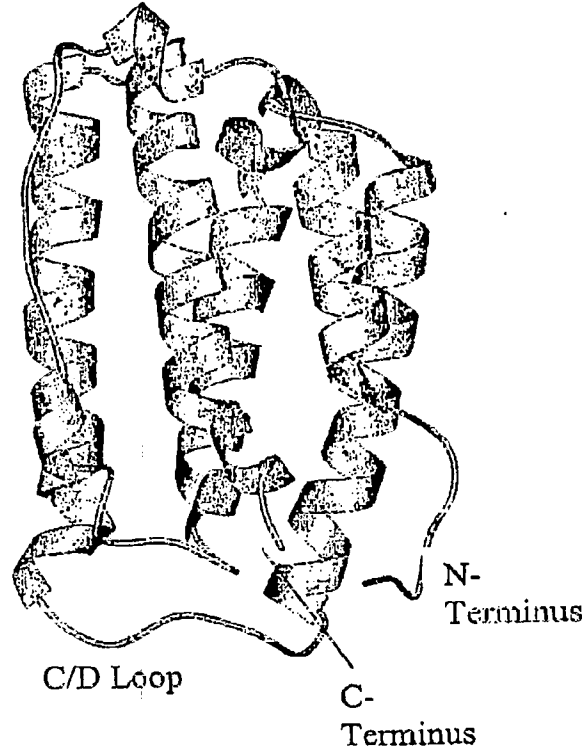
- 1. US 2008/0146781 A1**
- 2. US 5,849,883 A**
- 3. US 2005/0142102 A1**
- 4. The status, quality, and expansion of the
NIH full-length cDNA project: the
Mammalian Gene Collection (MGC).**



US 20080146781A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
CHO et al.(10) **Pub. No.: US 2008/0146781 A1**(43) **Pub. Date: Jun. 19, 2008**(54) **MODIFIED HUMAN FOUR HELICAL
BUNDLE POLYPEPTIDES AND THEIR USES**(75) **Inventors:** **Ho Sung CHO**, San Diego, CA
(US); **Thomas O. DANIEL**, La
Jolla, CA (US); **Richard D.**
DIMARCHI, Carmel, IN (US);
Anna-Maria HAYS, San Diego,
CA (US); **Troy E. WILSON**, San
Marino, CA (US); **Bee-Cheng SIM**,
San Diego, CA (US); **David C.**
LITZINGER, Poway, CA (US)**Correspondence Address:****ATTN: JOHN W. WALLEN, III**
AMBRX, INC.**10975 NORTH TORREY PINES ROAD, SUITE**
100
LA JOLLA, CA 92037(73) **Assignee:** **AMBRX, INC.**, La Jolla, CA (US)(21) **Appl. No.:** **11/874,800**(22) **Filed:** **Oct. 18, 2007****Related U.S. Application Data**(63) Continuation of application No. 10/587,271, filed as
application No. PCT/US2005/003537 on Jan. 28,
2005.(60) Provisional application No. 60/541,523, filed on Feb.
2, 2004, provisional application No. 60/531,314, filed
on Jun. 13, 2004, provisional application No. 60/531,
175, filed on Jun. 13, 2004, provisional application No.
60/530,825, filed on Jun. 13, 2004, provisional appli-
cation No. 60/533,616, filed on Dec. 22, 2004.(30) **Foreign Application Priority Data**

Jan. 28, 2005 (US) PCT/US05/03537

Publication Classification(51) **Int. Cl.**
C07K 14/00 (2006.01)(52) **U.S. Cl.** **530/350**(57) **ABSTRACT**Modified human four helical bundle (4HB) polypeptides and
uses thereof are provided.IFN α -2



US00584983A

United States Patent [19]

Boone et al.

[11] **Patent Number:** 5,849,883[45] **Date of Patent:** Dec. 15, 1998[54] **METHOD FOR PURIFYING GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR**[75] **Inventors:** Thomas C. Boone, Newbury Park;
Allan L. Miller, Glendale; Jeffrey W.
Andresen, Ventura, all of Calif.[73] **Assignee:** Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif.[21] **Appl. No.:** 647,391[22] **Filed:** May 9, 1996**Related U.S. Application Data**[62] Division of Ser. No. 383,533, Feb. 1, 1995, abandoned,
which is a continuation of Ser. No. 13,124, Feb. 3, 1993,
abandoned, which is a continuation of Ser. No. 343,011,
May 9, 1989, abandoned, which is a continuation-in-part of
Ser. No. 193,857, May 13, 1988, abandoned.[51] **Int. Cl.⁶** C07K 1/14; C07K 1/18;
C07K 1/36; C07K 14/535[52] **U.S. Cl.** 530/412; 530/416; 530/417;
530/351; 435/69.5[58] **Field of Search** 530/351, 412;
530/416, 417; 435/69.5[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**4,764,504 8/1982 Johnson et al. 514/12
4,810,643 3/1989 Souza 435/68
5,042,156 8/1991 Matsumoto et al. 530/351**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**0010437 11/1989 European Pat. Off. 530/351
61-045010 8/1986 Japan .**OTHER PUBLICATIONS**Marston, *Biochem. J.* 240:1-12, 1986.
Sofer et al. *Biotechniques* 1:198-203, 1983.
Colony Stimulating Factors, ed Dezner, 1990, pp. 82-90 and
92.
Metcalf, *Immunol. Cell. Biol.* 65 (Pt. 1) 1987, pp. 35-43.
Van Brunt, *BioTechnology*, vol. 7, 1989, p. 859.
Fujisawa et al, *Jpn. J. Cancer Res.* 77, 1986, pp. 366-369.
Platzer et al, *Blut* 54, 1987, pp. 129-136.*Primary Examiner*—Elizabeth C. Kemmerer
Attorney, Agent, or Firm—Craig A. Crandall; Steven M.
Odre; Ron K. Levy[57] **ABSTRACT**Processes for isolating and purifying granulocyte colony
stimulating factor (G-CSF) from a G-CSF producing micro-
organism are disclosed. The simplified processes include
steps of lysing the microorganism and separating insoluble
material containing G-CSF from soluble proteinaceous
material; extracting the material with deoxycholate
(optionally); solubilizing and oxidizing the G-CSF in the
presence of a denaturant solubilizing agent and an oxidizing
agent; removing the denaturant solubilizing agent from the
G-CSF; subjecting the G-CSF to ion exchange chromatog-
raphy; and recovering the purified G-CSF; yet excludes
other cumbersome purification steps.**7 Claims, 32 Drawing Sheets**



US 20050142102A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2005/0142102 A1**
(43) **Pub. Date: Jun. 30, 2005**

(54) **METHODS OF TREATING NEUROLOGICAL
CONDITIONS WITH HEMATOPOEITIC
GROWTH FACTORS**(21) **Appl. No.: 10/880,101**(22) **Filed: Jun. 30, 2004**(75) **Inventors: Wolf-Ruediger Schaebitz, Dossenheim
(DE); Armin Schneider, Heidelberg
(DE); Carola Krueger, Neustadt/Wehr.
(DE); Clemens Sommer, Guenzburg
(DE); Stefan Schwab, Heidelberg (DE);
Rainer Kollmar, Heidelberg (DE);
Martin Maurer, Heidelberg (DE);
Daniela Weber, Mannheim (DE);
Nikolaus Gassler, Heidelberg (DE)****Related U.S. Application Data**(63) Continuation-in-part of application No. PCT/IB03/
06446, filed on Dec. 31, 2003, which is a continua-
tion-in-part of application No. 10/659,295, filed on
Sep. 11, 2003, which is a continuation of application
No. 10/331,755, filed on Dec. 31, 2002, now aban-
doned.**Publication Classification**(51) **Int. Cl.⁷ A61K 38/19; A61K 38/20**(52) **U.S. Cl. 424/85.1; 424/85.2****Correspondence Address:****OBLON, SPIVAK, MCCLELLAND, MAIER &
NEUSTADT, P.C.
1940 DUKE STREET
ALEXANDRIA, VA 22314 (US)**(57) **ABSTRACT**(73) **Assignee: AXARON BIOSCIENCE AG, Heidel-
berg (DE)**The present invention relates to a method of treating a
neurological condition in a mammal by administering at
least one hematopoietic growth factor.

PubMed

Search: 15489334[uid]

U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health



Display Settings: Abstract

Genome Res. 2004 Oct;14(10B):2121-7.

The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC).

Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, Shenmen OM, Grouse LH, Schuler G, Klein SL, Old E, Paszoly R, Good P, Guyer M, Pack AM, Derge JG, Lipman D, Collins FS, Jang W, Sherry B, Feolo M, Misquitta L, Lee E, Rotmistrovsky E, Greenhut SF, Schaefer CF, Eustow K, Bonner TI, Hausler D, Hant J, Kisthaus M, Furey T, Brent M, Prange C, Schreiber F, Shapiro N, Shat NK, Hopkins RF, Hsie F, Driscoll T, Soares ME, Casavani TL, Schatz TE, Brownstein MJ, Uadin TB, Toshiyuki S, Caminci P, Piao Y, Dudekula DE, Ho MS, Kawakami H, Suzuki Y, Sugano S, Gruber CE, Smith ME, Simmons B, Moore T, Waterman R, Johnson SL, Ruan Y, Wei CL, Mathavan S, Gunaratna PH, Wu J, Garcia AM, Hulyk SW, Fuh E, Yuan Y, Sneed A, Howis C, Hodgson A, Muzny DM, McPherson J, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kisteman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madari A, Young AC, Wetherby KD, Granite SJ, Kwong PH, Brinkley CF, Pearson RL, Bouffard GG, Blakeley RW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Greenwood J, Schmutz J, Myers RM, Butlerfield TS, Griffith M, Griffith OL, Krzywinski MI, Liao H, Morin F, Palmquist D, Petrescu AS, Skalska U, Smailus DE, Stott JM, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Holt RA, Baross A, Marra MA, Clifton S, Malowski KA, Bosak S, Malek J; MGC Project Team.

Erratum in:

Genome Res. 2006 Jun;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morin, Ryan].

The National Institutes of Health's Mammalian Gene Collection (MGC) project was designed to generate and sequence a publicly accessible cDNA resource containing a complete open reading frame (ORF) for every human and mouse gene. The project initially used a random strategy to select clones from a large number of cDNA libraries from diverse tissues. Candidate clones were chosen based on 5'-EST sequences, and then fully sequenced to high accuracy and analyzed by algorithms developed for this project. Currently, more than 11,000 human and 10,000 mouse genes are represented in MGC by at least one clone with a full ORF. The random selection approach is now reaching a saturation point, and a transition to protocols targeted at the missing transcripts is now required to complete the mouse and human collections. Comparison of the sequence of the MGC clones to reference genome sequences reveals that most cDNA clones are of very high sequence quality, although it is likely that some cDNAs may carry missense variants as a consequence of experimental artifact, such as PCR, cloning, or reverse transcriptase errors. Recently, a rat cDNA component was added to the project, and ongoing frog (Xenopus) and zebrafish (Danio) cDNA projects were expanded to take advantage of the high-throughput MGC pipeline.

PMID: 15489334 [PubMed - indexed for MEDLINE]

PMCID: PMC528928

Publication Types, MeSH Terms, Substances, Grant Support

LinkOut - more resources

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 January 2010 (28.01.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/011735 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/051388

(22) International Filing Date:
22 July 2009 (22.07.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/083,132 23 July 2008 (23.07.2008) US

(71) Applicants (for all designated States except US): AM-BRX, INC. [US/US]; 10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla, CA 92037 (US). ELI LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HAYS PUTNAM, Anna-Maria, A. [US/US]; 11522 Cesped Drive, San Diego, CA 92124 (US). KNUDSEN, Nick [US/US]; 10709 Matinal Circle, San Diego, CA 92127 (US). NORMAN, Thea [US/US]; 1729 Eancroft Street, San Diego, CA 92102 (US). KODER, Alan [US/US]; 9845 Paseo Montalban, San Diego, CA 92129 (US). KRAYNOV, Vadim [US/US]; 5457 White Oak Lane, San Diego, CA 92130 (US). HO, Lillian [US/US]; 6222 Canyon Bluff Court, San Diego, CA 92121 (US). CANNING, Peter, C. [US/US]; 6652 Braemar Avenue, Noblesville, IN 46062 (US).

(74) Agent: WALLEN, John, W.; 10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla, CA 92037 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euracian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GE, GR, HP, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
15 April 2010

(54) Title: MODIFIED BOVINE G-CSF POLYPEPTIDES AND THEIR USES

(57) Abstract: Modified bovine G-CSF polypeptides and uses thereof are provided.



WO 2010/011735 A3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: JOHN W. WALLEN III
10975 NORTH TORREY PINES ROAD, SUITE
100
LA JOLLA, CA 92037

Date of mailing
(day/month/year) **19 FEB 2010**

Applicant's or agent's file reference
AMBX-0154.00PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 09/51388

International filing date (day/month/year)

22 July 2009 (22.07.2009)

Priority date (day/month/year)

23 July 2008 (23.07.2008)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A61K 38/00 (2010.01)

USPC - 530/399; 514/2

Applicant **AMBRX, INC.**

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

11 January 2010 (11.01.2010)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/51338

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/51388

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-10, 16, 22-53, 56-63, 71-76, and 82-104, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted before position 1 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group II: claims 1, 11-13, 16-19, 73 and 76-79, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 3 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group III: claims 1, 14, 20, 73, 76 and 80, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 62 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group IV: claims 1, 15, 31, 73, 76 and 81, directed to a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, limited to wherein the non-naturally encoded amino acid is substituted at residue 133 of SEQ ID NO: 1, or the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 2.

Group V: claims 54, 55, 69 and 70, directed to an isolated nucleic acid that encodes a bovine GCSF polypeptide.

The inventions listed as Groups I - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups I-IV is a bovine GCSF polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids, wherein each Group is directed to a polypeptide comprising a modification at a specific residue. The special technical feature of the Group V claims is an isolated nucleic acid encoding a bovine GCSF polypeptide.

One common technical element shared by the above groups is that they are related to bovine GCSF polypeptides having non-natural amino acids. This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2004/0086945 A1 to Dahiyat et al. (see para [0059], [0060], [0066] and [0152]). The Groups share a further common technical element of being modified forms of a particular initial amino acid sequence. However, this common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2004/0141946 A1 to Schaeblitz et al. (see para [0055], [0056], [0057] and SEQ ID NO: 32 in comparison to Applicants' SEQ ID NO: 1). Therefore, the inventions of Groups I - V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note: Applicants may elect for further modified sequences to be searched by specifying the particular residue at which the modification may be made, and by paying an additional invention fee for each selected site of modification.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 71-76, and 81-104 (see above Groups I and IV).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 09/51388

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (I1)	Claims	1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 73-76, 81-86, 91, and 96-104	YES
	Claims	71, 72, 87-90 and 92-95	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 71-76 and 81-104	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 71-76 and 81-104	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 71, 72, 87-90 and 92-95 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2008/0146781 A1 to CHO et al. (hereinafter "Cho").

As to claim 71, Cho teaches a method of making a bG-CSF polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid, the method comprising, culturing cells comprising a polynucleotide or polynucleotides encoding a bG-CSF polypeptide comprising a selector codon (para [0066]; "In some embodiments, the selector codon is selected from the group consisting of an amber codon, ochra codon, opal codon, a unique codon, a rare codon, and a four-base codon") under conditions to permit expression of the bG-CSF polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid; and purifying the bG-CSF polypeptide (para [0077]; "The present invention also provides methods of making a 4HB polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid. In some embodiments, the methods comprise culturing cells comprising a polynucleotide or polynucleotides encoding a 4HB polypeptide, an orthogonal RNA synthase and/or an orthogonal tRNA under conditions to permit expression of the 4HB polypeptide; and purifying the 4HB polypeptide from the cells and/or culture medium").

As to claim 72, Cho teaches a method of modulating serum half-life or circulation time of a bG-CSF polypeptide, the method comprising substituting one or more non-naturally encoded amino acids for any one or more naturally occurring amino acids in the bG-CSF polypeptide (para [0053] [0078]; "The present invention also provides methods of increasing therapeutic half-life, serum half-life or circulation time of 4HB polypeptides").

As to claim 87, Cho teaches that bG-CSF polypeptide comprising one or more amino acid substitution, addition or deletion that increases the expression of the bG-CSF polypeptide in a recombinant host cell (para [0053]).

As to claim 88, Cho teaches that bG-CSF polypeptide comprising a water soluble polymer linked by a covalent bond to the bG-CSF polypeptides at a single amino acid (para [0053]).

As to claim 89, Cho further teaches that the water soluble polymer comprises a poly(ethylene glycol) moiety (para [0043]).

As to claim 90, Cho further teaches that the amino acid covalently linked to the water soluble polymer is a non-naturally encoded amino acid (para [0053]; "In some embodiments, one or more non-naturally occurring amino acid at these or other positions is linked to a water soluble polymer").

As to claim 92, Cho teaches that bG-CSF polypeptide comprising at least one linker, polymer, or biologically active molecule, wherein said linker, polymer, or biologically active molecule is attached to the polypeptide through a functional group of a non-naturally encoded amino acid ribosomally incorporated into the polypeptide (para [0083]; "The present invention provides a polypeptide comprising at least one linker, polymer, or biologically active molecule, wherein said linker, polymer, or biologically active molecule is attached to the polypeptide through a functional group of a non-naturally encoded amino acid ribosomally incorporated into the polypeptide").

As to claim 93, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide is monoPEGylated (para [0083]; "In some embodiments, the polypeptide is monoPEGylated").

As to claim 94, Cho teaches that bG-CSF polypeptide comprising a linker, polymer or biologically active molecule that is attached to one or more non-naturally encoded amino acids wherein said non-naturally encoded amino acid is ribosomally incorporated into the polypeptide at pre-selected sites (para [0083]; ribosomally incorporated into the polypeptide at pre-selected sites").

As to claim 95, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one said linker, polymer, or biologically active molecule (para [0083]; "The present invention also provides a polypeptide comprising a linker, polymer, or biologically active molecule that is attached to one or more non-naturally encoded amino acid wherein said non-naturally encoded amino acid is ribosomally incorporated into the polypeptide at pre-selected sites").

-----continued in Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/51388

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/51388

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V2.

Claims 1-9, 22-53, 56-68, and 96-104 lack an inventive step according to PCT Article 33(3) as obvious over Cho in view of 5,849,883 A to BOONE et al. (hereinafter "Boone").

As to claim 1, Boone teaches a bG-CSF polypeptide comprising one or more naturally encoded amino acids substitutions (col 10 ln 32-49; Alternately, modifications of genomic and cDNA genes are readily accomplished by well-known site-directed mutagenesis techniques which generate analogs and derivatives of bovine G-CSF. Such products share at least one of the biological properties of bovine G-CSF but may differ in others. As examples, products of the invention include those which are foreshortened (e.g., by deletions); or those which are more stable to hydrolysis (and, therefore, have more pronounced or longer lasting effects than naturally occurring); or which have been altered to delete one (or more) potential site(s) for n-linked or o-linked glycosylation (which result in higher activities for yeast-produced products); or which have one or more cysteine residues deleted or replaced (for example, by alanine or serine residues) and are more easily isolated in active form from microbial systems; or which have one or more tyrosine residues replaced by phenylalanine and bind more or less readily to G-CSF receptors on target cells"). Boone does not teach non-naturally encoded amino acids. However, Cho teaches human G-CSF with one or more non-naturally encoded amino acids (para [0053]; In some embodiments, one or more non-naturally encoded amino acids are incorporated in one or more of the following positions in G-CSF: before position 1 (i.e. at the N terminus)"). An artisan of ordinary skill in the art would have readily appreciated that non-naturally encoded amino acids could have been incorporated into the biosynthesis of either bovine or human G-CSF, and that these two molecules shared significant amino acid identity and functional properties. Consequently, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine bG-CSF with one or more amino acid substitutions, as taught by Boone, with non-naturally encoded amino acids in G-CSF, as taught by Cho, with observation of artisan of ordinary skill that non-natural amino acids could be incorporated into the biosynthesis of either bovine or human G-CSF, because it would have enabled synthesis of bG-CSF with unique and useful properties.

As to claim 2, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more post-translational modifications (para [0065]; "In some embodiments, the 4HB agonist (i.e. G-CSF), partial agonist, antagonist, partial antagonist, or inverse agonist comprises a non-naturally encoded amino acid and one or more post-translational modification, linker, polymer, or biologically active molecule. In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid linked to a water soluble polymer"; para [0002] "Family members are referred to herein as "four helical bundle polypeptides" or "4HB" polypeptides. While there are still more members of the family yet to be identified, some members of the family include the following: "granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)").

As to claim 3, Cho further teaches that the polypeptide is linked to a linker, polymer, or biologically active molecule (para [0065]).

As to claim 4, Cho further teaches that the polypeptide is linked to a water soluble polymer (para [0065]).

As to claim 5, Cho further teaches that the polypeptide is linked to a bifunctional polymer, bifunctional linker, or at least one additional bG-CSF polypeptide (para [0041]; "In some embodiments, the 4HB polypeptide is linked to a bifunctional polymer, bifunctional linker, or at least one additional 4HB polypeptide").

As to claim 6, Cho further teaches that the bifunctional linker or polymer is linked to a second polypeptide (para [0041]).

As to claim 7, Cho further teaches that the second polypeptide is a bG-CSF polypeptide (para [0041]).

As to claim 8, Cho further teaches that the water soluble polymer comprises a poly(ethylene glycol) moiety (para [0043]; "In some embodiments, the 4HB polypeptide comprises at least two amino acids linked to a water soluble polymer comprising a poly(ethylene glycol) moiety. In some embodiments, at least one amino acid is a non-naturally encoded amino acid").

As to claim 9, Cho further teaches that the water soluble polymer is linked to a non-naturally encoded amino acid present in said bG-CSF polypeptide (para [0053]; "In some embodiments, the non-naturally occurring amino acid at one or more of these positions is linked to a water soluble polymer").

As to claim 22, Cho further teaches wherein wherein the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition or deletion that modulates affinity of the bG-CSF polypeptide for a bG-CSF receptor (para [0057]).

As to claim 23, Boone further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition or deletion that increases the stability or solubility of the bG-CSF polypeptide (col 10 ln 37-41; "As examples, products of the invention include those which are foreshortened (e.g., by deletions); or those which are more stable to hydrolysis (and, therefore, have more pronounced or longer lasting effects than naturally occurring").

As to claim 24, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition or deletion that increases the expression of the bG-CSF polypeptide in a recombinant host cell or synthesized in vitro (para [0053]; "In some embodiments, the 4HB polypeptide comprises a substitution, addition, or deletion that increases the expression of the 4HB polypeptides in a host cell or synthesized in vitro").

As to claim 25, Boone further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition or deletion that increases protease resistance of the bG-CSF polypeptide (col 10 ln 37-41).

-----continued in next Supplemental Box-----

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 09/51383

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
previous Supplemental Box

As to claim 26, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid is reactive toward a linker, polymer, or biologically active molecule that is otherwise unreactive toward any of the 20 common amino acids in the polypeptide (para [0067]; "In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid incorporated into the 4HB polypeptide is reactive toward a linker, polymer, or biologically active molecule that is otherwise unreactive toward any of the 20 common amino acids").

As to claim 27, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl group, an aminoxy group, a hydrazine group, a hydrazide group, a semicarbazide group, an azide group, or an alkyne group (para [0060]; "In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl group, an aminoxy group, a hydrazine group, a hydrazide group, a semicarbazide group, an azide group, or an alkyne group").

As to claim 28, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl group (para [0060]).

As to claim 29, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid has the structure: wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, or substituted aryl; R₂ is H, an alkyl, aryl, substituted alkyl, and substituted aryl; and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₄ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group (para [0061]; "wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, or substituted aryl; R₂ is H, an alkyl, aryl, substituted alkyl, and substituted aryl; and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₄ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group").

As to claim 30, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises an aminoxy group (para [0060]).

As to claim 31, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a hydrazide group (para [0060]).

As to claim 32, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a hydrazine group (para [0060]).

As to claim 33, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid residue comprises a semicarbazide group (para [0060]).

As to claim 34, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid residue comprises an azide group (para [0060]).

As to claim 35, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid has the structure: wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, substituted aryl or not present; X is O, N, S or not present; m is 0-10; R₂ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group (para [0062]; "wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, substituted aryl or not present; X is O, N, S or not present; m is 0-10; R₂ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group").

As to claim 36, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises an alkyne group (para [0060]).

As to claim 37, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid has the structure: wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, or substituted aryl; X is O, N, S or not present; m is 0-10; R₂ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group (para [0063]; "wherein n is 0-10; R₁ is an alkyl, aryl, substituted alkyl, or substituted aryl; X is O, N, S or not present; m is 0-10; R₂ is H, an amino acid, a polypeptide, or an amino terminus modification group, and R₃ is H, an amino acid, a polypeptide, or a carboxy terminus modification group").

As to claim 38, Cho further teaches that the water soluble polymer has a molecular weight of between about 0.1 kDa and about 100 kDa (para [0072]; "In some embodiments, the poly(ethylene glycol) molecule has a molecular weight of between about 0.1 kDa and about 100 kDa").

As to claim 39, Cho further teaches that the water soluble polymer has a molecular weight of between about 0.1 kDa and about 50 kDa (para [0072]; "In some embodiments, the poly(ethylene glycol) molecule has a molecular weight of between 0.1 kDa and 50 kDa").

As to claim 40, Cho further teaches that bG-CSF is made by reacting a bG-CSF polypeptide comprising a carbonyl-containing amino acid with a water soluble polymer comprising an aminoxy, hydrazine, hydrazide or semicarbazide group (para [0068]).

As to claim 41, Cho further teaches that the amino-oxo, hydrazine, hydrazide or semicarbazide group is linked to the water soluble polymer through an amide linkage (para [0068]).

As to claim 42, Cho further teaches that bG-CSF is made by reacting a water soluble polymer comprising a carbonyl group with a polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid that comprises an aminoxy, a hydrazine, a hydrazide or a semicarbazide group (para [0069]).

As to claim 43, Cho further teaches that the bG-CSF is made by reacting a bG-CSF polypeptide comprising an alkyne-containing amino acid with a water soluble polymer comprising an azide moiety (para [0070]).

-----continued in next Supplemental Box-----

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
previous Supplemental Box

As to claim 44, Cho further teaches that the bG-CSF is made by reacting a bG-CSF polypeptide comprising an azide-containing amino acid with a water soluble polymer comprising an alkyne moiety (para [0071]).

As to claim 45, Cho further teaches that the azide or alkyne group is linked to a water soluble polymer through an amide linkage (para [0071]).

As to claim 46, Cho further teaches that the water soluble polymer is a branched polymer (para [0072]; "In some embodiments, the poly(ethylene glycol) molecule is a branched polymer. In some embodiments, each branch of the poly(ethylene glycol) branched polymer has a molecular weight of between 1 kDa and 100 kDa, or between 1 kDa and 50 kDa").

As to claim 47, Cho further teaches that branch of the water soluble polymer has a molecular weight of between about 1 kDa and about 100 kDa (para [0073]).

As to claim 48, Cho further teaches that the polypeptide is a bG-CSF antagonist (para [0053]; "G-CSF antagonists include, but are not limited to, those with substitutions at").

As to claim 49, Cho further teaches that the polypeptide comprises one or more post-translational modification, linker, polymer, or biologically active molecule (para [0053], [0065]).

As to claim 50, Cho further teaches that the polymer comprises a moiety selected from a group consisting of a water soluble polymer and poly(ethylene glycol) (para [0053], [0065]).

As to claim 51, Cho further teaches that the polypeptide prevents activation of the bG-CSF receptor (para [0065]).

As to claim 52, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a saccharide moiety (para [0061]; "In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid comprises a saccharide moiety. In some embodiments, the water soluble polymer is linked to the polypeptide via a saccharide moiety").

As to claim 53, Cho further teaches that the linker, polymer, or biologically active molecule is linked to the polypeptide via a saccharide moiety (para [0061]).

As to claim 56, Cho further teaches a method of making the bG-CSF polypeptide of claim 3, the method comprising contacting an isolated bG-CSF polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid with a linker, polymer, or biologically active molecule comprising a moiety that reacts with the non-naturally encoded amino acid (para [0067]; "In some embodiments, the method comprises contacting an isolated 4HP polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid with a water soluble polymer comprising a moiety that reacts with the non-naturally encoded amino acid").

As to claim 57, Cho further teaches that the polymer comprises a moiety selected from a group consisting of a water soluble polymer and poly(ethylene glycol) (para [0069]).

As to claim 58, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl group, an aminooxy group, a hydrazide group, a hydrazine group, a semicarbazide group, an azide group, or an alkyne group (para [0068]).

As to claim 59, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl moiety and the linker, polymer, or biologically active molecule comprises an aminooxy, a hydrazine, a hydrazide or a semicarbazide moiety (para [0068]).

As to claim 60, Cho further teaches that the aminooxy, hydrazine, hydrazide or semicarbazide moiety is linked to the linker, polymer, or biologically active molecule through an amide linkage (para [0067-0069]).

As to claim 61, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises an alkyne moiety and the linker, polymer, or biologically active molecule comprises an azide moiety (para [0070]).

As to claim 62, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises an azide moiety and the linker, polymer, or biologically active molecule comprises an alkyne moiety (para [0071]).

As to claim 63, Cho further teaches that the azide or alkyne moiety is linked to a linker, polymer, or biologically active molecule through an amide linkage (para [0071]).

As to claim 64, Cho further teaches that the poly(ethylene glycol) moiety has an average molecular weight of between about 0.1 kDa and about 100 kDa (para [0072]).

-----continued in next Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/51389

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
previous Supplemental Box

As to claim 65, Cho further teaches that the poly(ethylene glycol) moiety is a branched or multiarmed polymer (para [0073]).

As to claim 66, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier (para [0075]; "The present invention also provides compositions comprising a 4HB polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid is linked to a water soluble polymer").

As to claim 67, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid is linked to a water soluble polymer (para [0075]).

As to claim 68, Cho further teaches a method of treating an animal having a disorder modulated by bG-CSF comprising administering to the animal a therapeutically-effective amount of the composition of claim 66 (para [0079]; "The present invention also provides methods of treating a patient in need of such treatment with an effective amount of a 4HB molecule of the present invention. In some embodiments, the methods comprise administering to the patient a therapeutically-effective amount of a pharmaceutical composition comprising a 4HB polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the non-naturally encoded amino acid is linked to a water soluble polymer").

As to claim 96, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition, or deletion that modulates haematopoiesis in an animal after administration of the polypeptide (para [0079], [0226]).

As to claim 97, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition, or deletion that modulates serum half-life or circulation time of the bG-CSF polypeptide (para [0079]).

As to claim 98, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition, or deletion that modulates neutrophil proliferation in an animal after administration of the polypeptide (para [0079], [0141]; "Granulocyte colony stimulating factor or hG-CSF has a variety of biological activities including but not limited to binding to its receptor, causing dimerization of its receptor, stimulation of neutrophil production, and stimulating cell proliferation and differentiation").

As to claim 99, Cho further teaches that the polypeptide also comprises a naturally encoded amino acid substitution (para [0053], [0146]).

As to claim 100, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition, or deletion that modulates neutrophil maturation in an animal after administration of the polypeptide (para [0053], [0141]).

As to claim 101, Cho further teaches that the bG-CSF polypeptide comprises one or more amino acid substitution, addition, or deletion that modulates neutrophil function in an animal after administration of the polypeptide (para [0053], [0079], [0146]).

As to claim 102, Cho teaches a method of treating an animal with an infection modulated by bG-CSF comprising administering to the animal a therapeutically-effective amount of the composition of claim 66 (para [0568]; G-CSF; [0569] "The dose administered to a patient, in the context of the present invention, is sufficient to have a beneficial therapeutic response in the patient over time, or, including but not limited to, to inhibit infection by a pathogen").

As to claim 103, Cho further teaches that the water soluble polymer is linked to said polypeptide by an oxime bond (para [0538]; "In some embodiments of the invention, a 4HB polypeptide comprising a carbonyl-containing non-naturally encoded amino acid is modified with a saccharide derivatized with an aminooxy group to generate the corresponding glycosylated polypeptide linked via an oxime linkage"; [0459]. Alternatively, an alkynes group on the PEG can be reacted with an aldehyde group present in a non-naturally encoded amino acid to form a similar product. In some embodiments, a strong nucleophile (including but not limited to, hydrazine, hydrazide, hydroxylamine, semicarbazide) can be reacted with an aldehyde or ketone group present in a non-naturally encoded amino acid to form a hydrazone, oxime or semicarbazone, as applicable, which in some cases can be further reduced by treatment with an appropriate reducing agent").

As to claim 104, Cho further teaches a method of preventing infection in an animal comprising administering to the animal a therapeutically-effective amount of the composition of claim 66 (para [0075], [0079]).

Claim 10, 16, 73-76, 82-86 and 91 lack an inventive step according to PCT Article 33(3) as obvious over Boone in view of Cho, in further view of US 2005/0142102 A1 to SCHAEBITZ et al. (hereinafter "Schaebitz").

As to claim 10, Cho teaches substitution of non-naturally occurring amino acid at the N-terminus of G-CSF (para [0053]). However, Cho does not teach bG-CSF. Boone teaches mutational modification of bG-CSF (col 10 ln 32-49) but does not teach SEQ ID NO: 1. However, Schaebitz teaches SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 32). An artisan of ordinary skill would have readily appreciated that a non-naturally occurring amino acid substitution or insertion at the amino terminus could have been made in either human or bovine G-CSF, two molecules that have 81% sequence identity. Consequently, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine substitution or insertion of non-naturally encoded amino acid at amino terminus of G-CSF, as taught by Cho, with G-CSF is bovine G-CSF, as taught by Boone, with bG-CSF sequence is SEQ ID NO: 1, as taught by Schaebitz, because it would have enabled modification of the NH2 terminus of bG-CSF.

-----continued in next Supplemental Box-----

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
previous Supplemental Box

As to claim 16, Cho teaches substitution of non-naturally occurring amino acid at the N-terminus of G-CSF (para [0053]). However, Cho does not teach bG-CSF. Boone teaches mutational modification of bG-CSF (col 10 ln 32-49) but does not teach SEQ ID NO: 1. However, Schaeblitz teaches SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 32). An artisan of ordinary skill would have readily appreciated that a non-naturally occurring amino acid substitution or insertion at the amino terminus could have been made in either human or bovine G-CSF, two molecules that have 81% sequence identity. Consequently, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine substitution or insertion of non-naturally encoded amino acid at amino terminus of G-CSF, as taught by Cho, with G-CSF is bovine G-CSF, as taught by Boone, with bG-CSF sequence is SEQ ID NO: 1, as taught by Schaeblitz, because it would have enabled modification of the NH2 terminus of bG-CSF.

As to claim 73, Cho teaches substitution of at least one non-naturally occurring amino acid at a site in G-CSF (para [0053]) and teaches wherein said polynucleotide comprises a selector codon (para [0066]). However, Cho does not teach bG-CSF. Boone teaches mutational modification of bG-CSF (col 10 ln 32-49) but does not teach SEQ ID NO: 1. However, Schaeblitz teaches SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 32). An artisan of ordinary skill would have readily appreciated that a non-naturally occurring amino acid substitution or insertion at the amino terminus could have been made in either human or bovine G-CSF, two molecules that have 81% sequence identity. Consequently, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine substitution or insertion of non-naturally encoded amino acid at amino terminus of G-CSF, as taught by Cho, with G-CSF is bovine G-CSF, as taught by Boone, with bG-CSF sequence is SEQ ID NO: 1, as taught by Schaeblitz, because it would have enabled modification of the NH2 terminus of bG-CSF.

As to claim 74, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid is linked to a linker, polymer, water soluble polymer, or biologically active molecule (para [0053]).

As to claim 75, Cho further teaches that the water soluble polymer comprises a poly(ethylene glycol) moiety (para [0043]).

As to claim 76, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid is substituted at a position selected from the group consisting of residues before position 1 (para [0053]). Furthermore, Schaeblitz teaches SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 32).

As to claim 82, Cho further teaches that the non-naturally encoded amino acid comprises a carbonyl group, an aminooxy group, a hydrazide group, a hydrazine group, a semicarbamide group, an amide group, or an alkynyl group (para [0060]).

As to claim 83, Cho further teaches that the poly(ethylene glycol) moiety has a molecular weight of between about 0.1 kDa and about 100 kDa (para [0072]).

As to claim 84, Cho further teaches that the poly(ethylene glycol) moiety is a branched or multiarmed polymer (para [0073]).

As to claim 85, Cho further teaches that the poly(ethylene glycol) moiety has a molecular weight of between about 1 kDa and about 100 kDa (para [0072]).

As to claim 86, Cho further teaches a composition comprising the bG-CSF polypeptide of claim 73 and a pharmaceutically acceptable carrier (para [0075]).

As to claim 91, Cho further teaches that non-naturally encoded amino acid is linked to a poly(ethylene glycol) molecule (para [0043], [0053]).

Claims 15, 21, and 81 lack an inventive step according to PCT Article 33(2) as obvious over Boone, in view of Cho, in further view of Schaeblitz, further in light of the article entitled "The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)" by the MGC Project Team (hereinafter "MGC").

As to claims 15, 21, and 91, Cho teaches substitution of a non-naturally encoded amino acid at amino acid 133 of human G-CSF (para [0053]; "in some embodiments, one or more non-naturally encoded amino acids are incorporated in one or more of the following positions in G-CSF: 133"). Cho does not teach bG-CSF. However, Boone teaches mutational modification of bG-CSF (col 10 ln 32-49) but does not specifically teach amino acid 133 or SEQ ID NO: 1. In addition, Schaeblitz teaches SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 32) encoding bG-CSF. Furthermore, MGC teaches 81% sequence identity between human and bovine G-CSF, where amino acid 133 is a threonine in both species (abstract; TrEMBL accession Q8N4WC). An artisan of ordinary skill in the art would have readily appreciated that amino acid 133 and the amino acids immediately adjacent to amino acid 133 are identical in bovine and human G-CSF and therefore substitution of a particular non-naturally encoded amino acid in either species would have been likely to have the same functional effect. Consequently, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine substitution of a non-naturally encoded amino acid at position 133 in human G-CSF, as taught by Cho, with mutational modification of amino acids in bovine G-CSF, as taught by Boone, with bG-CSF amino acid sequence is SEQ ID NO: 1, as taught by Schaeblitz, with sequence homology comparison of human and bovine G-CSF, as taught by MGC, because it would have enabled rational substitution of non-naturally encoded amino acids at position 133 in bG-CSF.

Claims 1-10, 15, 16, 21-53, 56-68, 71-76 and 81-103 have industrial applicability according to PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS**RESUMEN-ONJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

5

Polipéptidos G-CSF bovinos modificados y usos de los mismos tal y como están descritos.

POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS Y SUS USOS

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a polipéptidos factor estimulante de colonias de granulocitos bovino (bG-CSF) opcionalmente modificados con al menos un aminoácido no codificado de manera natural.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El impacto económico de las enfermedades infecciosas en la producción de animales destinados a alimentación está bien documentado. Las enfermedades infecciosas reducen los beneficios, aumentan los costes de producción y ponen en peligro los productos alimenticios, así como afectan al rendimiento, la salud y el bienestar del animal. Las enfermedades
15 pueden reducir el rendimiento y la calidad de la leche dando como resultado una gran pérdida económica para productores lecheros y productores de carne de vacuno, particularmente cuando en algunos casos las enfermedades microbianas infecciosas provocan morbilidad de animales recién nacidos, jóvenes (por ejemplo, ganado de sustitución) o
20 adultos. Dos de tales enfermedades, mastitis y enfermedad respiratoria bovina (ERB), pueden tener efectos devastadores sobre la producción de animales destinados a alimentación.

 La mastitis se define como una inflamación de la glándula mamaria. Puede afectar a cualquier mamífero, por ejemplo vacas, ovejas y cabras. La
25 mastitis bovina es una infección de la ubre de rumiantes tales como vacas, provocada principalmente por bacterias gram positivas y gram negativas y especialmente en vacas en unidades de producción de leche intensivas. La infección bacteriana da como resultado la inflamación de la glándula mamaria (es decir pezones y ubre). Los animales pueden volverse más
30 susceptibles a la mastitis debido a una función microbicida de neutrófilos afectada durante el periodo periparturiente. La enfermedad es

particularmente problemática y de importancia económica considerable porque el patógeno se transfiere fácilmente de un animal a otro durante el proceso de ordeño. Con frecuencia se desarrolla en las primeras semanas alrededor del parto y puede volver a aparecer con cada lactancia. Algunos

5 de los principales microorganismos patógenos que provocan 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, incorporado

10 al presente documento como referencia. Estos microorganismos invaden la ubre a través del conducto del pezón y producen inflamación del tejido productor de leche provocando la formación de tejido cicatricial que, una vez formado, puede provocar una reducción permanente en la producción de leche de la vaca. Una infección también puede alterar la composición,

15 cantidad, aspecto y calidad de la leche. Los patógenos que provocan mastitis se dividen en dos categorías, concretamente, contagiosos y ambientales. Las bacterias contagiosas, tales como *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, colonizan principalmente sitios de tejido huésped tales como glándulas mamarias, conductos de pezón y lesiones de

20 la piel del pezón; y se propagan de una vaca infectada a otra durante el proceso de ordeño. Las bacterias ambientales, con frecuencia estreptococos, enterococos y organismos coliformes, están presentes comúnmente en el entorno de la vaca procedentes de fuentes tales como heces de vacas, tierra, material vegetal, lechos o agua; e infectan mediante

25 contacto oportunista casual con un animal. La distinción entre patógenos contagiosos y ambientales, aunque no exclusiva, es de importancia práctica porque se necesitan diferentes medidas de mantenimiento de rebaños lecheros para los diferentes grupos de microorganismos. En todos los casos de mastitis bovina, independientemente del microorganismo causante, la vía

30 de transmisión del patógeno invasor en la glándula interior de la ubre es a través del orificio del pezón y el conducto del pezón. Las fuentes comunes

de microorganismos dañinos incluyen equipo de ordeño no higiénico, el ordeñador, otros animales mastíticos, un entorno de establo no higiénico, y los propios procesos de eliminación de los animales (defecación/micción).

Existe una variedad de formas o tipos de mastitis bovina, con diversa gravedad y sintomatología, incluyendo los siguientes: (1) infección de ubre: la invasión de la cavidad de la ubre por microorganismos que se multiplican dentro de la glándula y provocan inflamación; (2) mastitis no clínica o subclínica: una forma de mastitis en la que no hay hinchazón de la glándula ni anomalía observable de la leche, aunque hay cambios en la leche que pueden detectarse mediante pruebas específicas. Este tipo de mastitis es con diferencia la más prevalente y provoca la mayor pérdida global en la mayoría de los rebaños. Con frecuencia se denomina mastitis "oculta". (3) Mastitis clínica: una forma de mastitis en la que los estados anómalos de la ubre y la secreción son observables. La mastitis clínica leve implica cambios en la leche tales como copos, coágulos y un aspecto aguado o inusual. El calor y la sensibilidad de la ubre son ligeros o ausentes, pero puede haber signos de hinchazón. La mastitis clínica grave implica una repentina aparición con hinchazón del cuarto infectado que está caliente, duro y sensible. El aspecto de la leche es anómalo y disminuye la producción de leche. Algunas veces, además de los efectos locales en la ubre, la propia vaca enferma. Hay signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida de apetito. La combinación de estos estados con frecuencia se denomina mastitis sistemática aguda, porque no sólo se afecta a la ubre, sino a todo el animal; y (4) mastitis crónica: una forma de mastitis provocada por una infección de la ubre persistente que existe la mayor parte del tiempo en la forma no clínica pero ocasionalmente puede desarrollarse en una forma clínica activa. Después de estos "brotes" normalmente vuelve temporalmente la forma no clínica. (Véase generalmente Current Concepts of Bovine Mastitis, publicado por The National Mastitis Council, Inc., 2ª ed. 1978 en la pág. 5).

La mastitis continúa provocando grandes pérdidas económicas a la industria lechera. La mastitis afecta a la rentabilidad de un rebaño de varias maneras, tanto directa como indirectamente, incluyendo: (1) pérdida de producción de leche; (2) tasas de descarte superiores de vacas infectadas, (3) disminución del valor de la leche; (4) leche desechada tras el tratamiento con antibióticos; (5) costes veterinarios (antibióticos y visitas al veterinario); y (6) muertes. (Bovine Mastitis, Glenys Bloomfield, citado anteriormente, en la pág. 33).

Otra enfermedad común que afecta a la industria ganadera es la fiebre de embarque (enfermedad respiratoria bovina o ERB). La ERB se ha denominado por algunos un “complejo de enfermedades” por dos motivos: habitualmente está provocada por una variedad de patógenos, tanto virales como bacterianos, que interaccionan entre sí para producir la enfermedad desarrollada, y porque el comportamiento de los patógenos puede seguir un proceso secuencial que, paso a paso, da como resultado animales enfermos. Los patógenos bacterianos son una de las causas mejor conocidas del síndrome agudo. Los patógenos bacterianos pueden invadir las vías respiratorias bovinas tras haberse visto comprometidas por una infección viral y otros factores, tales como el estrés del destete, el embarque, el cambio de alimentación y la variación en la humedad y temperatura ambiental, pueden preceder y contribuir a la infección. En muchos casos esto se añade a la exposición del ganado a patógenos durante el embarque cuando se combinan con ganado de otro origen en camiones, corrales y granjas de subastas, dando como resultado la alta incidencia de la enfermedad en ganado entregado a la explotación ganadera de engorde.

Se han aislado varias especies de bacterias y se han asociado con la ERB, y algunas de las más comunes son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y (o) *Histophilus somni*. *Haemophilus somnus* es un patógeno virulento que provoca septicemia en ganado y algunas veces las manifestaciones resultantes se han denominado “complejo de *Haemophilus*

somnus", de las cuales una forma es la enfermedad respiratoria, virus tales como rinotraqueítis bovina infecciosa (RBI), diarrea viral bovina (DVB) y virus sincitial respiratorio bovino (VSRB) también pueden participar en iniciar un complejo de ERB, abriendo con frecuencia la puerta a infecciones bacterianas secundarias.

Dado que es prácticamente imposible eliminar estos organismos del entorno, el complejo de ERB debe enfocarse desde el punto de vista de prevenir que estos agentes causantes de enfermedades arraiguen, y detectar y tratar los casos clínicos lo más rápida y eficazmente posible. Las enfermedades respiratorias son una causa principal de pérdida por enfermedad en ganado vacuno. Generalmente se reconoce que la causa final de muerte en la mayoría de los casos de fiebre de embarque es una neumonía bacteriana (habitualmente *Pasteurella*). La *Pasteurella haemolytica*, particularmente de tipo IA, es la bacteria más común aislada de los casos de enfermedad respiratoria en Norteamérica. Algunas veces la vacunación contra algunos de los agentes infecciosos implicados en la fiebre de embarque es útil, pero las vacunas sólo están disponibles y son eficaces para unos pocos de los agentes que se sabe que están implicados en el complejo de enfermedades.

La terapia con antibióticos ha sido una componente principal de la estrategia de control de mastitis y ERB. La patente estadounidense n.º 7.182.948, que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, indica que se ha mostrado que los baños para pezones antimicrobianos que contienen yodo son eficaces contra infecciones de mama y bacterias que provocan mastitis (Pankey, J. W. *et al.*, (1983) J. Dairy Sci. 66 (1), 161-167). Estas composiciones se administran habitualmente al pezón sumergiendo o pulverizando el pezón antes del ordeño así como tras retirar la copa de ordeño. Para reducir la mastitis, se han desarrollado baños para pezones comerciales que contienen una variedad de agentes antimicrobianos incluyendo 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 ácidos heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, undecanoico), compuestos aniónicos ácidos (por ejemplo ácidos alquilaril-sulfónicos), dióxido de cloro (a partir de clorito), y bisbiguanidas tales como clorhexidina. Estos agentes, que tienen diversos grados de eficacia, limitan la transmisión de la mastitis reduciendo las poblaciones de patógenos en el pezón. Sin embargo, existen problemas asociados con el uso de compuestos antimicrobianos. El más prevalente es la irritación del pezón y el agrietamiento del pezón. Para aliviar estos problemas, se han incluido aditivos emolientes tales como glicerina y lanolina en tales composiciones. Sin embargo, incluso con el uso de esos emolientes todavía se produce irritación de la piel.

La patente estadounidense n.º 6.790.867, que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, indica que pueden usarse inyecciones subcutáneas de formulaciones que combinan un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) tal como flunixinina, con un antibiótico derivado de tianfenicol o cloranfenicol fluorado tal como florfenicol, para tratar la ERB. La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20070155799, que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, da a conocer nuevos compuestos de fenicol que pueden usarse como profármacos antibióticos y en combinación con AINE u otros antibióticos.

El NMC (anteriormente el National Mastitis Council, Consejo Nacional de Mastitis), una organización sin fines lucrativos dedicada a reducir la mastitis y mejorar la calidad de la leche, destaca la importancia de una higiene de los pezones adecuada, pero también un cuidado de los pezones adecuado para la prevención de la mastitis. El daño económico provocado por la mastitis ha conducido a mucha investigación sobre su control. Se ha notificado que los estreses físicos así como las condiciones ambientales son grandes factores de contribución a la infección de mastitis. Véase la publicación de patente estadounidense n.º: 20020051789, que se incorpora

como referencia. Desde que se documentó que la mastitis subclínica estaba directamente relacionada con un mal estado de los pezones (Neijenhuis, P. *et al.*, (2001) J. Dairy Sci. (84) 2664-2672), han surgido varias disoluciones de baño para pezones comerciales que incorporan agentes de acondicionamiento (National Mastitis Council, Summary of Peer-Reviewed Publications on Efficacy of Premilking and Postmilking Teat Disinfectants Published Since 1980; enero de 2002). Se ha mostrado que la rugosidad y la callosidad de la punta del pezón tienen una relación directa con la mastitis clínica (Neijenhuis, F. *et al.*, (2001) J. Dairy Sci. (84) 2664-2672). La reducción del agrietamiento y la irritación de los pezones así como mantener el pezón flexible es muy importante para controlar las infecciones de mama. También se ha usado la glicerina como acondicionador para pezones en disoluciones de baño para pezones. Sin embargo, estudios indican que no hay una disminución significativa en las bacterias que provocan mastitis tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, o coliformes cuando se aumenta el contenido en glicerina desde el 2% hasta el 10% en una disolución de baño para 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 tanto, aunque están disponibles productos tales como disoluciones de baño para pezones, todavía existe una necesidad no resuelta de modular la incidencia, recurrencia y/o gravedad de la mastitis.

La patente estadounidense n.º 5.849.883, que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, da a conocer varios antibióticos usados en el tratamiento de la mastitis incluyendo, pero sin limitarse a, antibióticos betalactámicos tales como penicilinas (ampicilina, cloxacilina, hetacilina, nafcilina, penicilina G, (bencil-penicilina), procaína-penicilina) y cefalosporinas (cefoperazona, cefuroxima, cefalonio, cefapirina, cefoxazol, cefracetril); antibióticos aminoglicósidos (framicetina, neomicina, novobiocina, estreptomina); antibióticos macrólidos (eritromicina); tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina); y antibióticos polipeptídicos

(polimixina B). El tratamiento con antibióticos para la mastitis se administra habitualmente mediante infusiones intramamarias, o bien en vacas lactantes cuando se detecta mastitis clínica, o bien en la seca (terapia de vaca seca). (Bovine Mastitis, citado anteriormente, en la pág. 69). En casos en los que
5 está presente la enfermedad clínica grave, deben administrarse antibióticos por vía parenteral ya que las infusiones intramamarias son ineficaces debido al bloqueo de los conductos.

No se han conseguido las esperanzas iniciales de que los antibióticos permitirían un control completo de la enfermedad. Ninguno de los
10 antibióticos mencionados anteriormente utilizados hasta ahora ha sido totalmente satisfactorio. Adicionalmente, se ha encontrado que es muy deseable sustituir el tratamiento con antibióticos por un tratamiento mediante compuestos de fármacos quimioterápicos no antibióticos, por los siguientes motivos: (1) no deben usarse en la medicina veterinaria antibióticos eficaces
15 en la medicina humana, con el fin de no acumular resistencia de cepa de bacterias que aparecen en enfermedades humanas; (2) los antibióticos deben reservarse para enfermedades para las que no hay un compuesto de fármaco quimioterápico disponible, ya que se ha demostrado que las cepas bacterianas acumulan resistencia a un antibiótico tras un uso prolongado de
20 tal antibiótico; y (3) *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos indicados anteriormente, ya ha acumulado resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina.

Un método de este tipo para el tratamiento mediante un compuesto de fármaco quimioterápico no antibiótico se describe en la patente
25 estadounidense n.º 4.610.993, que se incorpora como referencia al presente documento, que reivindica un método para tratar animales para la mastitis bovina con una cantidad eficaz de al menos un compuesto de disulfuro de N-óxido de piridina. Otro método de los mismos inventores se describe en la
30 patente estadounidense n.º 4.401.666, que se incorpora como referencia al presente documento, que reivindica un método para tratar animales para la mastitis bovina con una cantidad eficaz de al menos una sal metálica de 2-

tiona-N-óxido de piridina. A pesar de estos varios métodos publicados, sigue siendo muy importante encontrar métodos rentables utilizando compuestos no antibióticos que superen sustancialmente los inconvenientes de los antibióticos usados hasta ahora y sin embargo sean eficaces en el tratamiento y la prevención de la mastitis.

Otra enfermedad común que afecta a la industria ganadera es la fiebre de embarque (enfermedad respiratoria bovina). Las enfermedades respiratorias son una causa principal de pérdida por enfermedad en el ganado vacuno. La expresión "fiebre de embarque" se usa para describir el complejo de enfermedades respiratorias observado en el ganado de 6 meses de edad o más tras el embarque o bien a explotaciones ganaderas de engorde o bien a pastizales. El estrés del destete, la castración, el descornado, el ayuno, la sobrepoblación, la exposición a agentes infecciosos, los cambios en la dieta, el transporte, las temperaturas ambientales extremas y otros factores de estrés combinados con infecciones virales, bacterianas, micoplásmicas y/o por clamidias contribuyen al complejo de fiebre de embarque. La mezcla de terneros de diferentes granjas y/o granjas de venta facilita enormemente la exposición a agentes infecciosos. La patente estadounidense n.º 6.497.869, que se incorpora como referencia al presente documento, describe algunos de los agentes infecciosos iniciales que pueden afectar al ganado. La mezcla de población puede ser un factor de predisposición más importante para la fiebre de embarque que los factores de estrés, aunque la enfermedad puede producirse sin mezclar y los factores de estrés habitualmente empeoran drásticamente la enfermedad respiratoria. Algunas veces los intentos por reducir el estrés del destete, la castración, el descornado, etc. y aclimatar el ganado a nuevas dietas días o semanas antes del embarque son satisfactorios (pero pueden no ser rentables) para reducir la incidencia de fiebre de embarque. Algunas veces la vacunación contra algunos de los agentes infecciosos implicados en la fiebre de embarque es útil, pero sólo

hay vacunas disponibles y eficaces para unos pocos de los agentes que se sabe que están implicados en el complejo de enfermedades.

5 Generalmente se reconoce que la causa final de muerte en la mayoría de los casos de fiebre de embarque es una neumonía bacteriana (habitualmente *Pasteurella*). La *Pasteurella haemolytica*, particularmente de tipo 1A, es la bacteria más común aislada de los casos de enfermedad respiratoria en Norteamérica. Habitualmente, los intentos por reproducir experimentalmente la neumonía bacteriana en ganado no son satisfactorios sin un grave estrés y con predisposición al daño de las vías respiratorias.

10 Generalmente se cree que durante momentos de estrés, los virus, el micoplasma y/o las clamidias con más frecuencia provocan el daño inicial a las vías respiratorias, lo que predispone a la infección bacteriana grave y la enfermedad.

15 Un brote típico de enfermedad respiratoria clínica comienza habitualmente en el plazo de horas o días desde la llegada del ganado a la explotación ganadera de engorde. El ganado recién embarcado en el intervalo de peso de 400 a 500 libras tiene comúnmente una morbilidad del 10 al 80% y una mortalidad del 1 al 10%, o más, en cuanto a la enfermedad de las vías respiratorias. Cuando se analiza el suero de ganado para un

20 aumento de anticuerpos de cuatro veces (seroconversión) y se someten las vías respiratorias y sus secreciones a aislamientos microbiológicos, puede identificarse una miríada de agentes etiológicos. Puede mostrarse que muchos animales, los enfermos y los aparentemente sanos, han experimentado infección por uno o más agentes (probablemente la

25 enfermedad de las vías respiratorias se debe rara vez a un único agente infeccioso). Aunque el complejo de enfermedad respiratoria bovina se reconoce clínicamente en la explotación ganadera de engorde tras la llegada, las infecciones que dan lugar a la enfermedad clínica comienzan probablemente en las granjas de venta, en las que se reúne por primera vez

30 ganado de diferentes granjas. Véase también Bovine Respiratory Disease,

Loan, R. W. Texas A & M University Press, 1984, incorporado al presente documento como referencia.

La administración de un compuesto que trata o modula la incidencia, recurrencia, duración y/o gravedad de la mastitis o la enfermedad respiratoria en ganado u otras infecciones en animales no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ganado, aves de corral, cerdos, caballos, perros y gatos, sería útil en la medicina veterinaria. Ejemplos de tales infecciones incluyen, pero no se limitan a, septicemia neonatal en caballos, pleuroneumonía en cerdos, y neumonía en animales no humanos. Tales compuestos pueden restaurar o modular la función de los neutrófilos en el animal.

La familia de supergenes 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. e 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 haz de cuatro hélices. Aunque hay todavía más miembros de la familia aún por identificar, algunos miembros de la familia incluyen los siguientes: hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (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 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-I) ("la familia de supergenes de GH"). Los miembros de la familia de supergenes de GH tienen estructuras secundarias y terciarias similares, a pesar del hecho de que generalmente tienen una identidad de secuencia de ADN o aminoácidos limitada. Las características

estructurales compartidas permiten identificar fácilmente nuevos miembros de la familia génica. Se describen polipéptidos de haz de cuatro hélices en el documento WO 2005/074650 titulado "Modified Human Four Helical Bundle Polypeptides and Their Uses", que se incorpora como referencia en su totalidad.

Un miembro de la familia de supergenes 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 diversos factores de crecimiento de glicoproteínas conocidos como factores estimulantes de colonias (CSF) porque soportan la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas. G-CSF estimula la proliferación de células precursoras de médula ósea específicas y su diferenciación para dar 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 de neutrófilos y la maduración *in vivo* (Cohen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 2484-2488 véase también Heidari *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol. 2001; 81: 45-57, incorporado al presente documento como referencia). El G-CSF también puede 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 mostrado que el G-CSF ceba los granulocitos humanos y potencia la liberación de superóxido estimulada por el péptido quimiotáctico, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (S. Kitagawa, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 144: 1143-1146, y C. F. Nathan, Blood 1989; 74:301-306), y activa la fagocitosis mediada por IgA de neutrófilo humano (Weisbart, R. H., *et al.*, Nature 1988; 332: 647-649).

Los neutrófilos son un componente crítico de los mecanismos de defensa del huésped contra infecciones bacterianas y fúngicas. El G-CSF

puede inducir un aumento del número absoluto de neutrófilos circulantes y potencia la función de los neutrófilos.

Se ha descrito la clonación de ADNc y la expresión de G-CSF humano (hG-CSF) recombinante, y se ha confirmado que el hG-CSF recombinante muestra la mayoría de, si no todas, las propiedades biológicas de la molécula nativa (Souza, L. *et al.* Science 232, 61-65 (1986)). El análisis de secuencia de clones de ADN genómico y ADNc 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 174 aminoácidos de longitud y no presenta ningún posible sitio de glicosilación unida a N pero presenta varios posibles sitios para la glicosilación unida a O. Se ha descrito la clonación y la expresión de ADNc que codifica para G-CSF humano por dos grupos (Nagata, S. *et al.*, Nature 319, 415-418 (1986); Souza, L. M. *et al.*, 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 notificaron que también habían identificado un clon de ADNc para G-CSF que codificaba para una proteína que carecía de un tramo de tres aminoácidos. Esta forma más corta de ADNc de G-CSF expresa la actividad de G-CSF esperada. El segundo informe describe una secuencia de ADNc idéntica a esta forma corta y no menciona nada de 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 o bien una variante de corte y empalme minoritaria o bien el resultado de un artefacto de clonación.

Matsumoto *et al.*, en Infection and Immunity, vol. 55, n.º 11, pág. 2715 (1987) tratan el efecto protector de G-CSF humano sobre la infección microbiana en ratones neutropénicos.

Las siguientes publicaciones de patente se refieren a G-CSF: el documento WO 8703689, que se incorpora como referencia al presente documento, describe hibridomas que producen anticuerpos monoclonales

específicos para G-CSF humano y su uso en la purificación de G-CSF; el documento WO 8702060, que se incorpora como referencia al presente documento, da a conocer polipéptidos similares a G-CSF humano y métodos de producción de los mismos; la patente estadounidense n.º 4.810.643, que se incorpora como referencia al presente documento, da a conocer polipéptidos similares a G-CSF humano, secuencias que codifican para los mismos y métodos para su producción; y los documentos WO 8604605 y WO 8604506, que se incorporan como referencia al presente documento, dan a conocer un gen que codifica para 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 estadounidenses n.ºs 4.810.643; 4.999.291; 5.580.755; y 6.716.606, que se incorporan como referencia al presente documento.

El G-CSF es una proteína farmacéuticamente activa que regula la proliferación, diferenciación y activación funcional de los granulocitos neutrófilos (Metcalf, *Blood* 67:257 (1986); Yan, *et al.* *Blood* 84(3): 795-799 (1994); Bensinger, *et al.* *Blood* 81(11): 3158-3163 (1993); Roberts, *et al.*, *Expt'l Hematology* 22: 1156-1163 (1994); Neben, *et al.* *Blood* 81(7): 1960-1967 (1993); Welte *et al.* *PNAS-USA* 82: 1526-1530 (1985); Souza *et al.* *Science* 232: 61-65 (1986) y Gabrilove, J. *Seminars in Hematology* 26:2 1-14 (1989)). Se purificó G-CSF hasta homogeneidad a partir de sobrenadantes de cultivo celular de la línea celular de carcinoma de vejiga humano 5637 (Welte *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci* (1985) 82:1526-30). La secuencia del ADNc que codifica para hG-CSF nativo se conoce a partir de Souza *et al.*, *Science* (1986) 232:61-65. Como consecuencia del corte y empalme alternativo en el segundo intrón existen dos formas que se producen de manera natural de hG-CSF con 204 ó 207 aminoácidos de los cuales los 30 primeros representan un péptido señal (Lymphokines, IRL Press, Oxford, Washington D.C., Editores D. Male y C. Rickwood). Se ha mostrado que la proteína madura tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa y

tiene 5 residuos de cisteína que pueden formar puentes disulfuro intermoleculares o intramoleculares. Estudios de unión han mostrado que el hG-CSF se une a granulocitos neutrófilos. Se observa de poca a ninguna unión con líneas celulares eosinófilas linfoides, eritroideas, así como con macrófagos.

En seres humanos, el G-CSF endógeno puede detectarse en el plasma sanguíneo (Jones *et al.* Bailliere's Clinical Hematology 2: 1 83-111 (1989)). El hG-CSF se produce por fibroblastos, macrófagos, células 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 a una especie de ARNm que se procesa de manera diferencial, dando como resultado dos formas de ARNm de hG-CSF, codificando una versión para una proteína de 177 aminoácidos, codificando la otra para una proteína de 174 aminoácidos (Nagata *et al.* 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 reacciona de manera cruzada entre especies, de manera que cuando se administra G-CSF humano a otro mamífero tal como un ratón, perro o mono, se provoca una leucocitosis de neutrófilos sostenida (Moore *et al.* PNAS-USA 84: 7134-7138 (1987)).

El G-CSF puede obtenerse y purificarse a partir de varias fuentes. Puede aislarse G-CSF humano natural (nhG-CSF) a partir de sobrenadantes de líneas celulares de tumor humano en cultivo. El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.810.643 (Souza) incorporada en el presente documento como referencia, ha permitido la producción de cantidades a escala comercial de G-CSF en forma glicosilada como producto de la expresión en células huésped eucariotas, y de G-CSF en forma no glicosilada como producto de la expresión en células huésped procariotas.

Se ha encontrado que G-CSF es útil en el tratamiento de indicaciones en las que un aumento de neutrófilos proporcionará beneficios. El G-CSF puede movilizar células madre y precursoras a partir de médula ósea y se usa para tratar a pacientes cuyos granulocitos se han agotado mediante quimioterapia, o como fase previa a trasplantes de médula ósea. Por ejemplo, para pacientes con cáncer, el G-CSF es beneficioso como medio para estimular selectivamente la producción de neutrófilos para compensar los déficit hematopoyéticos resultantes de la quimioterapia o la radioterapia. Otras indicaciones incluyen el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas y estados relacionados, tales como sepsis, que está provocada normalmente por un metabolito de bacterias. El G-CSF también es útil solo, o en combinación con otros compuestos, tales como otras citocinas, 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 de factor de crecimiento/citocinas/hematopoyéticos, que incluye varios otros receptores de factor de crecimiento, tales como los receptores de interleucina (IL)-3, 4 y 6, el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el receptor de eritropoyetina (EPO), así como los receptores de prolactina y hormona del crecimiento. Véase, Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 6934-6938 (1990). Los miembros de la familia de receptores de citocinas contienen cuatro residuos de cisteína conservados y un motivo de triptófano-serina-X-triptófano-serina colocado justo fuera de la región transmembrana. Se piensa que las secuencias conservadas participan en interacciones proteína-proteína. Véase, por ejemplo, Chiba *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Comm. 184: 485-490 (1992). El receptor de G-CSF consiste en una cadena de péptido sencilla con un peso molecular de aproximadamente 150 kD (Nicola, Immunol. Today 8 (1987), 134).

Se ha comparado el hG-CSF glicosilado con el hG-CSF desglicosilado, preparado mediante digestión enzimática *in vitro* con

neuraminidasa y endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, con respecto a su estabilidad como una función del pH y la temperatura (Oh-eda *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265 (20): 11432-35). El hG-CSF desglicosilado, disuelto a una concentración de 1 μ g/ml en tampón fosfato 20 mM que contiene NaCl 0,2 M y Tween 20 al 0,01% se inactivó rápidamente dentro del intervalo de pH de desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8 tras una incubación de dos días a 37°C. En cambio, el hG-CSF glicosilado conservó 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 el hG-CSF desglicosilado era menos estable térmicamente que la forma nativa de hG-CSF.

Se han empleado varios enfoques con el fin de proporcionar composiciones de G-CSF farmacéuticamente aceptables, estables. Un enfoque para mejorar la estabilidad de la composición de G-CSF implica la síntesis de derivados de la proteína. La patente estadounidense n.º 5.665.863 da a conocer la formación de proteínas quiméricas recombinantes que comprenden G-CSF acoplado con albúmina, que tienen nuevas propiedades farmacocinéticas. La patente estadounidense n.º 5.824.784 y la patente estadounidense n.º 5.320.840, dan a conocer la unión química de polímeros solubles en agua a proteínas para mejorar la estabilidad y proporcionar protección frente a la degradación proteolítica, y más específicamente, moléculas de G-CSF modificadas en el extremo N-terminal que llevan polímeros unidos químicamente, incluyendo polietilenglicol.

Se han determinado las estructuras de varias citocinas, incluyendo G-CSF (Zink *et al.*, FEBS Lett, 314:435 (1992); Zink *et al.*, Biochemistry 33:8453 (1994); Hill *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5167 (1993)), GM-CSF (Diederichs, K., *et al.* Science 154: 1779-1782 (1991); Walter *et al.*, J. Mol. Biol. 224:1075-1085 (1992)), IL-2 (Bazan, J. F. Science 257: 410-411 (1992); McKay, D. B. Science 257: 412 (1992)), IL-4 (Redfield *et al.*, Biochemistry 30: 11029-11035 (1991); Powers *et al.*, Science 256:1673-

1677 (1992)), e IL-5 (Milburn *et al.*, Nature 363: 172-176 (1993)) mediante estudios de difracción de rayos X y RMN y muestran una conservación sorprendente con la estructura de la GH, a pesar de una falta de homología de secuencia primaria significativa.

5 Un enfoque alternativo para aumentar la estabilidad de G-CSF en composición implica la alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína. La patente estadounidense n.º 5.416.195 da a conocer análogos modificados por ingeniería genética de G-CSF que tienen una estabilidad en
10 composición mejorada, en los que el residuo de cisteína que se encuentra normalmente en la posición 17 de la cadena del polipéptido maduro, el residuo de ácido aspártico que se encuentra en la posición 27, y al menos uno de los residuos de prolina en tándem que se encuentran en las posiciones 65 y 66, están todos sustituidos por un residuo de serina. La patente estadounidense n.º 5.773.581 da a conocer los análogos de G-CSF
15 modificados por ingeniería genética que se han conjugado de forma covalente a un polímero soluble en agua.

 Las diversas formas de G-CSF humano, incluyendo su preparación y purificación, útiles en un método para tratar o prevenir la mastitis se describen en detalle en la patente estadounidense n.º 4.810.643, que se
20 incorpora al presente documento como referencia. La patente estadounidense n.º 4.810.643 describe y reivindica segmentos génicos novedosos, plásmidos recombinantes biológicamente funcionales y vectores de ADN viral y células huésped procariontas y eucariotas, que contienen un gen de G-CSF o una variante modificada por ingeniería genética de un gen de G-CSF. Las células huésped expresan G-CSF biológicamente activo o
25 una variante modificada por ingeniería genética de G-CSF. La patente estadounidense n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932 describen diversos estudios con G-CSF humano en ganado. Los estudios se realizaron para evaluar enfermedades respiratorias (*Pasteurella hemolytica*),
30 respuestas a exposiciones bacterianas (*Klebsiella pneumonia*), o mastitis coliforme (*E. coli*) en ganado.

La patente estadounidense n.º 5.849.883, que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, presenta la secuencia de polipéptido y polinucleótido de G-CSF bovino maduro (bG-CSF), y describe métodos para clonar, aislar y purificar el polipéptido y análogos del mismo.

5 El b-GCSF maduro tiene 174 aminoácidos de longitud (SEQ ID NO: 1) que tienen un 82% de homología con el hG-CSF. Se muestra un polipéptido bG-CSF con un residuo de aminoácido metionina inicial como SEQ ID NO: 2. La secuencia de polinucleótido que codifica para SEQ ID NO: 1 se muestra como SEQ ID NO: 3. La secuencia de polinucleótido que codifica para SEQ

10 ID NO: 2 se muestra como SEQ ID NO: 4. Heidari *et al.* 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 poli(etilenglicol), abreviado PEG, es un método para aumentar la solubilidad en agua, biodisponibilidad,

15 aumentar la semivida en suero, aumentar la semivida terapéutica, modular la inmunogenicidad, modular la actividad biológica, o extender el tiempo en circulación de muchas moléculas biológicamente activas, incluyendo proteínas, péptidos y particularmente moléculas hidrófobas. Se ha usado PEG ampliamente en productos farmacéuticos, en implantes artificiales, y en

20 otras aplicaciones en las que la biocompatibilidad, falta de toxicidad y falta de inmunogenicidad son importantes. Con el fin de maximizar las propiedades deseadas de PEG, el peso molecular total y el estado de hidratación del polímero o polímeros de PEG unidos a la molécula biológicamente activa deben ser suficientemente altos para conferir las

25 características ventajosas asociadas normalmente con la unión a polímero de PEG, tales como aumento de la solubilidad en agua y semivida circulante, sin afectar al mismo tiempo de manera adversa a la bioactividad de la molécula original.

Los derivados de PEG se unen con frecuencia a moléculas

30 biológicamente activas mediante funcionalidades químicas reactivas, tales como residuos de lisina, cisteína e histidina, el extremo N terminal y los

restos de hidratos de carbono. Las proteínas y otras moléculas con frecuencia tienen un número limitado de sitios reactivos disponibles para la unión a polímero. Con frecuencia, los sitios más adecuados para la modificación mediante unión a polímero desempeñan un papel significativo en la unión a receptores, y son necesarios para conservar la actividad biológica de la molécula. Como resultado, la unión indiscriminada de cadenas de polímero a tales sitios reactivos en una molécula biológicamente activa con frecuencia conduce a una reducción significativa o incluso pérdida total de la actividad biológica de la molécula modificada con polímero, R. Clark *et al.*, (1996), *J. Biol. Chem.*, 271 :21969-21977. Para formar conjugados que tienen un peso molecular de polímero suficiente para conferir las ventajas deseadas a una molécula diana, los enfoques de la técnica anterior han supuesto normalmente la unión al azar de numerosos brazos de polímero a la molécula, aumentando así el riesgo de una reducción o incluso pérdida total de la bioactividad de la molécula original.

Los sitios reactivos que forman los loci para la unión de derivados de PEG a proteínas vienen dictados por la estructura de la proteína. Las proteínas, incluyendo enzimas, están compuestas por diversas secuencias de alfa-aminoácidos, que tienen la estructura general $H_2N-CHR-COOH$. El resto amino alfa (H_2N-) de un aminoácido se une al resto carboxilo ($-COOH$) de un aminoácido adyacente para formar uniones amida, que pueden representarse como $-(NH-CHR-CO)_n-$, en los que el subíndice "n" puede ser igual a cientos o miles. El fragmento representado por R puede contener sitios reactivos para la actividad biológica de la proteína y para la unión de derivados de PEG.

Por ejemplo, en el caso del aminoácido lisina, existe un resto $-NH_2$ en la posición épsilon así como en la posición alfa. El $-NH_2$ épsilon está libre para su reacción 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 su unión al resto $-NH_2$ épsilon de residuos de lisina presentes en proteínas. "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced

PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, págs. 1-17. Sin embargo, estos derivados de PEG tienen todos la limitación común de que no pueden instalarse de manera selectiva entre los residuos de lisina, con frecuencia numerosos, presentes en las superficies de proteínas. Esto puede ser una limitación significativa en los casos en los que un residuo de lisina es importante para la actividad de la proteína, existiendo por ejemplo en un sitio activo enzimático, o en los casos en los que un residuo de lisina desempeña un papel en la mediación de la interacción de la proteína con otras moléculas biológicas, tal como en el caso de sitios de unión a receptores.

Una segunda, e igualmente importante, complicación de los métodos existentes para la pegilación de proteínas es que los derivados de PEG pueden experimentar reacciones secundarias no deseadas con residuos distintos de los deseados. La histidina contiene un resto imino reactivo, representado estructuralmente como $-N(H)-$, pero muchas especies químicamente reactivas que reaccionan con $-NH_2$ épsilon también pueden reaccionar con $-N(H)-$. De manera similar, la cadena lateral del aminoácido cisteína lleva un grupo sulfhidrilo libre, representado estructuralmente como $-SH$. En algunos casos, los derivados de PEG dirigidos al grupo $-NH_2$ épsilon de lisina también reaccionan con cisteína, histidina u otros residuos. Esto puede crear mezclas heterogéneas complejas de moléculas bioactivas derivatizadas con PEG y riesgos de destruir la actividad de la molécula bioactiva que se selecciona como diana. Sería deseable desarrollar derivados de PEG que permitan introducir un grupo funcional químico en un único sitio dentro de la proteína, lo que entonces permitiría el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la molécula bioactiva en sitios específicos en la superficie de la proteína que tanto están bien definidos como son predecibles.

Además de los residuos 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. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.610.281 que se incorpora como referencia al presente documento, y "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, págs. 1-17.

5 Puede introducirse un residuo de cisteína de manera selectiva para el sitio en la estructura de proteínas usando mutagénesis dirigida al sitio y otras técnicas conocidas en la técnica, y puede hacerse reaccionar el resto sulfhidrilo libre resultante con derivados de PEG que llevan grupos funcionales reactivos con tiol. Sin embargo, este enfoque es complicado
10 porque la introducción de un grupo sulfhidrilo libre puede complicar la expresión, el plegamiento y la estabilidad de la proteína resultante. Por tanto, sería deseable tener un medio para introducir un grupo funcional químico en moléculas bioactivas que permita el acoplamiento selectivo de uno o más polímeros de PEG a la proteína al tiempo que simultáneamente
15 sea compatible con (es decir, no intervenga en reacciones secundarias no deseadas) sulfhidrilos y otros grupos funcionales químicos que se encuentran normalmente en proteínas.

Tal como puede observarse a partir de una muestra de la técnica, muchos de estos derivados que se han desarrollado para su unión a las
20 cadenas laterales de proteínas, en particular, el resto $-NH_2$ en la cadena lateral del aminoácido lisina y el resto $-SH$ en la cadena lateral de cisteína, han demostrado ser problemáticos en cuanto a su síntesis y uso. Algunos forman uniones inestables con la proteína que se ven sometidas a hidrólisis y por tanto se descomponen, degradan o son de otro modo inestables en
25 entornos acuosos, tales como en el torrente sanguíneo. Algunos forman uniones más estables, pero se ven sometidas a hidrólisis antes de formarse la unión, lo que significa que el grupo reactivo en el derivado de PEG puede inactivarse antes de que pueda unirse la proteína. Algunos son algo tóxicos y por tanto son menos adecuados para su uso *in vivo*. Algunos tardan
30 demasiado en reaccionar como para ser útiles en la práctica. Algunos dan como resultado una pérdida de la actividad de la proteína uniéndose a sitios

responsables de la actividad de la proteína. Algunos no son específicos en cuanto a los sitios a los que se unen, lo que también puede dar como resultado una pérdida de la actividad deseable y una falta de reproducibilidad de los resultados. Con el fin de superar los desafíos asociados con la modificación de proteínas con restos de poli(etilenglicol), se han desarrollado derivados de PEG que son más estables (por ejemplo, la patente estadounidense 6.602.498, que se incorpora como referencia al presente documento) o que reaccionan de manera selectiva con restos tiol en las moléculas y superficies (por ejemplo, la patente estadounidense 6.610.281, que se incorpora como referencia al presente documento). Existe claramente una necesidad en la técnica de derivados de PEG que sean químicamente inertes en entornos fisiológicos hasta que se recurra a ellos para reaccionar de manera selectiva para formar enlaces químicos estables.

El uso de conjugados de hidroxialquilalmidón, y en particular el uso de hidroxietilalmidón (HES), unidos de forma covalente a un polipéptido, se ha dado a conocer con el fin de alterar posiblemente la inmunogenicidad y/o alergenicidad del polipéptido. HESylation (tratamiento con HES) es una tecnología alternativa que se ha dado a conocer en una serie de solicitudes de patente cedidas a Fresenius Kabi AB incluyendo las publicaciones de patente estadounidense n.º 20050063943, 20060121073, 20010100163, 20050234230, 20050238723, 20060019877, 20070134197, 20070087961, así como la patente estadounidense n.º 7.285.661, todas las cuales se incorporan al presente documento como referencia. HES es un polímero natural modificado que se ha usado clínicamente como expansor de volumen de plasma y la HESylation representa la tecnología de acoplar principios activos a derivados de HES con el fin de modificar las características del fármaco, tales como la farmacocinética o solubilidad en agua. Esto también incluye la prolongación de la circulación en plasma de la proteína mediante un aumento de la estabilidad de la molécula y una reducción del aclaramiento renal, dando como resultado un aumento de la actividad biológica. Además, pueden reducirse la inmunogenicidad o

alergenicidad. Variando diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, puede diseñarse a medida una amplia gama de conjugados de HES. No obstante, el hidroxietilalmidón comparte una desventaja común con todos los demás polímeros disponibles actualmente: su polidispersidad. Los conjugados poliméricos son una mezcla de moléculas que tienen pesos moleculares distribuidos alrededor de un valor promedio. Esta falta de homogeneidad da como resultado un nivel bajo de caracterización química y bioquímica y puede impedir que el componente farmacéuticamente activo alcance su sitio de acción (receptor, enzima, etc.). En estos casos el fármaco para ser activo requiere su administración en la forma original no conjugada, y por tanto se requiere la escisión del polímero mediante reacciones metabólicas para su eficacia farmacéutica.

Recientemente, se ha notificado una tecnología totalmente nueva en la ciencia de proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones específicas del sitio de proteínas. Específicamente, se han añadido nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas de la *Escherichia coli* procariota (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, *et al.*, (2001), *Science* 292:498-500) y la *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) eucariota (por ejemplo, J. Chin *et al.*, *Science* 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no codificados de manera genética en proteínas *in vivo*. Varios aminoácidos nuevos con propiedades químicas, físicas o biológicas novedosas, incluyendo marcadores de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, aminoácidos de fotoreticulación (véanse, por ejemplo, Chin, J. W., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 99: 11020-11024; y, Chin, J. W., *et al.*, (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027), ceto-aminoácidos, aminoácidos que contienen átomos pesados y aminoácidos glicosilados, se han incorporado de manera eficaz y con alta fidelidad en proteínas en *E. coli* y en levadura en respuesta al codón ámbar, TAG, usando esta metodología. Véanse, por ejemplo, J. W. Chin *et al.*, (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002),

ChemBioChem 3(11):1135-1137; J. W. Chin, *et al.*, (2002), PNAS United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11. Todas las referencias se incorporan como referencia en su totalidad. Estos estudios han demostrado que es posible introducir de manera selectiva y rutinaria grupos funcionales químicos, tales como grupos cetona, grupos alquino y restos azida, que no se encuentran en proteínas, que son químicamente inertes frente a todos los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes, codificados de manera genética y que pueden usarse para reaccionar de manera eficaz y selectiva para formar uniones covalentes estables.

La capacidad de incorporar aminoácidos no codificados de manera genética en proteínas permite la introducción de grupos funcionales químicos que podrían proporcionar valiosas alternativas a los grupos funcionales que se producen de manera natural, tales como el -NH₂ épsilon de lisina, el sulfhidrilo -SH de cisteína, el grupo imino de histidina, etc. Se sabe que determinados grupos funcionales químicos son inertes frente a los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes, codificados de manera genética pero reaccionan de manera limpia y eficaz para formar uniones estables. Se conoce en la técnica que los grupos azida y acetileno, por ejemplo, experimentan una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen en condiciones acuosas en presencia de una cantidad catalítica de cobre. Véanse, por ejemplo, Tornøe, *et al.*, (2002) L Org. Chem, 67:3057-3064; y, Rostovtsev, *et al.*, (2002) Angew. Chem, Int. Ed, 41 :2596-2599. Introduciendo un resto azida en una estructura proteica, por ejemplo, puede incorporarse un grupo funcional que es químicamente inerte frente a aminas, sulfhidrilos, ácidos carboxílicos, grupos hidroxilo que se encuentran en proteínas, pero que también reacciona suave y eficazmente con un resto acetileno para formar un producto de cicloadición. De manera importante, en ausencia del resto acetileno, la azida permanece químicamente inerte y no reactiva en presencia de otras cadenas laterales de proteína y en condiciones fisiológicas.

La presente invención trata, entre otras cosas, problemas asociados con la actividad y producción de polipéptidos bG-CSF, y también trata la producción de un polipéptido bG-CSF con propiedades biológicas o farmacológicas mejoradas y/o semivida terapéutica mejorada.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona polipéptidos bG-CSF que comprenden uno o más aminoácidos no codificados de manera natural.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una o más modificaciones postraduccionales. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF se une a un ligador, polímero o molécula biológicamente activa. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF se une a un polímero bifuncional, ligador bifuncional, o al menos un polipéptido bG-CSF adicional.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural se une al polímero soluble en agua con un ligador o se une al polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero bifuncional. En algunas realizaciones, el polímero bifuncional se une a un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es un polipéptido bG-CSF.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende al menos dos aminoácidos unidos a un polímero soluble en agua que comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, al menos un aminoácido es un aminoácido no codificado de manera natural.

En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones en bG-CSF: antes de la posición 1 (es decir en el extremo N-terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).

En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de las mismas de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en la posición 62 de bG-CSF

(SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en la posición 133 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no naturales en una secuencia líder o señal que es N o C terminal con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF.

En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: antes de la posición 1 (es decir en el extremo N-terminal), 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 terminal de la proteína) , y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).

En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones; 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173,, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los

aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 62 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 133 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en la secuencia líder o señal N o C terminal con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF se une a un polímero soluble en agua.

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, pero sin limitarse a, una proteína, polipéptido, molécula pequeña o ácido nucleico. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la estabilidad del polipéptido bG-CSF en comparación con la estabilidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o

deleción. La estabilidad y/o solubilidad puede medirse usando varios ensayos diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, SE-HPLC y RP-HPLC. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción que modula la inmunogenicidad del polipéptido bG-CSF en comparación con la inmunogenicidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción que modula la semivida en suero o el tiempo en circulación del polipéptido bG-CSF en comparación con la semivida en suero o el tiempo en circulación del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o deleción.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la solubilidad acuosa del polipéptido bG-CSF en comparación con la solubilidad acuosa del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción 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 deleción. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción 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 bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o deleción. 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 algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción que aumenta la resistencia a proteasas del polipéptido bG-CSF en comparación con la resistencia a proteasas del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o deleción.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o deleción que modula la actividad de transducción de

señales del receptor en comparación con la actividad del receptor tras la interacción con el polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que modula su unión a otra molécula tal como un receptor en comparación con la unión del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que modula la hematopoyesis en comparación con la hematopoyesis del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que modula la proliferación de neutrófilos en comparación con la proliferación de neutrófilos del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que modula la maduración de neutrófilos en comparación con la maduración de neutrófilos del polipéptido bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF comprende una sustitución, adición o delección que aumenta la compatibilidad del polipéptido bG-CSF con conservantes farmacéuticos (por ejemplo, w-cresol, fenol, alcohol bencílico) en comparación con la compatibilidad del bG-CSF correspondiente sin la sustitución, adición o delección. Esta compatibilidad aumentada permitirá la preparación de una formulación farmacéutica con conservantes que mantiene las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento.

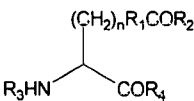
En algunas realizaciones, se crea uno o más enlaces diseñados mediante ingeniería con uno o más aminoácidos no naturales. El enlace intramolecular puede crearse de muchas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, una reacción entre dos aminoácidos en la proteína en condiciones adecuadas (uno o ambos aminoácidos pueden ser un aminoácido no natural); una reacción con dos aminoácidos, cada uno de los

cuales puede estar codificado de manera natural o no estar codificado de manera natural, con un ligador, polímero, u otra molécula en condiciones adecuadas; etc.

5 En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácido en el polipéptido bG-CSF pueden ser por uno o más aminoácidos que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural. En algunas realizaciones las sustituciones de aminoácido en el polipéptido bG-CSF pueden ser por aminoácidos que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural, siempre que al menos una sustitución sea por un aminoácido no codificado de manera natural. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácido en el polipéptido bG-CSF pueden ser por uno o más aminoácidos que se producen de manera natural, y adicionalmente al menos una sustitución es por un aminoácido no codificado de manera natural.

15 En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

20 En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:

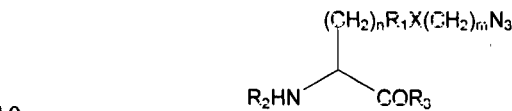


25 en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal.

30 En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo aminooxilo. En algunas realizaciones, el

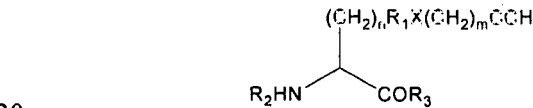
aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo hidrazida.
En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural
comprende un grupo hidrazina. En algunas realizaciones, el residuo de
aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo
5 semicarbazida.

En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido no codificado de
manera natural comprende un grupo azida. En algunas realizaciones, el
aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:



en la que n es 0-10; R₁ 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; R₂
es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo
amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de
15 modificación de extremo carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera
natural comprende un grupo alquino. En algunas realizaciones, el
aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo
sustituido; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R₂ es H, un
aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino
25 terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de
modificación de extremo carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, el polipéptido es un agonista, agonista
parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido

bG-CSF. En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de manera natural unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de manera natural y una o más modificaciones postraduccionales, ligadores, polímeros o moléculas biológicamente activas.

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con las SEQ ID NO: 3, 4 o ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de las SEQ ID NO: 1, 2. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 3, 4 o polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con polinucleótidos que codifican para polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1, 2 en los que el polinucleótido comprende al menos un codón selector. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica para los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1, 2. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica para los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1, 2 con uno o más aminoácidos no codificados de manera natural. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que varios polinucleótidos diferentes pueden codificar para cualquier polipéptido de la presente invención.

En algunas realizaciones, el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases.

La presente invención también proporciona métodos de preparación de un polipéptido bG-CSF unido a un polímero soluble en agua. En algunas

realizaciones, el método comprende poner en contacto un polipéptido bG-CSF aislado que comprende un aminoácido no codificado de manera natural con un polímero soluble en agua que comprende un resto que reacciona con el aminoácido no codificado de manera natural. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF es reactivo frente a un polímero soluble en agua que por lo demás no es reactivo frente a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF es reactivo frente a un ligador, polímero o molécula biológicamente activa que por lo demás no es reactivo frente a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida se une a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida se une a la molécula de poli(etilenglicol) mediante un enlace de carbamato.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que comprende un grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene alquino con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un resto azida. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino se une a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene azida con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un resto alquino. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino se une a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.

En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. En algunas realizaciones, cada ramificación del polímero ramificado de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 1 kDa y 100 kDa, o entre 1 kDa y 50 kDa.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua unido al polipéptido bG-CSF comprende un resto de polialquilenglicol, en algunas realizaciones, el residuo de aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF comprende un grupo carbonilo, un grupo aminoóxido, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF comprende un resto carbonilo y el polímero soluble en agua comprende un resto aminoóxido, hidrazida, hidrazina o semicarbazida. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF comprende un resto alquino y el polímero soluble en agua comprende un resto azida, en algunas realizaciones, el residuo de aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF comprende un resto azida y el polímero soluble en agua comprende un resto alquino.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no

codificado de manera natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua.

5 La presente invención también proporciona células que comprenden un polinucleótido que codifica para el polipéptido bG-CSF que comprende un codón selector. En algunas realizaciones, las células comprenden una ARN sintetasa ortogonal y/o un ARNt ortogonal para sustituir un aminoácido no codificado de manera natural en el polipéptido bG-CSF.

10 La presente invención también proporciona métodos de preparación de un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural. En algunas realizaciones, los métodos comprenden cultivar células que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican para un polipéptido bG-CSF, una ARN sintetasa ortogonal y/o un ARNt ortogonal en condiciones para permitir la expresión del polipéptido bG-CSF; y purificar el polipéptido bG-CSF de las células y/o el medio de cultivo.

15 La presente invención también proporciona métodos de aumento de la semivida terapéutica, semivida en suero o tiempo en circulación de polipéptidos bG-CSF. La presente invención también proporciona métodos de modulación de la inmunogenicidad de polipéptidos bG-CSF. En algunas realizaciones, los métodos comprenden sustituir uno cualquiera o más aminoácidos en polipéptidos bG-CSF que se producen de manera natural por un aminoácido no codificado de manera natural y/o unir el polipéptido bG-CSF a un ligador, un polímero, un polímero soluble en agua, o una molécula biológicamente activa.

25 La presente invención también proporciona métodos de tratamiento de un paciente que necesita un tratamiento de este tipo con una cantidad eficaz de una molécula de bG-CSF de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas

30

realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF está glicosilado. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF no está glicosilado.

5 La presente invención también proporciona polipéptidos bG-CSF que comprenden una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2, o cualquier otra secuencia de polipéptido bG-CSF, excepto porque se sustituye al menos un aminoácido es por un aminoácido no codificado de manera natural. La presente invención también proporciona polipéptidos bG-CSF
10 que comprenden una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1, 2. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural comprende un
15 grupo carbonilo, un grupo aminoóxido, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino,

 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID
20 NO: 1, 2, o cualquier otra secuencia de polipéptido bG-CSF, en la que se sustituye al menos un aminoácido por un aminoácido no codificado de manera natural. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID
25 NO: 1, 2. En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural comprende un resto sacárido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua se une al polipéptido por medio de un resto sacárido. En algunas realizaciones, un ligador, polímero o molécula biológicamente activa se une al polipéptido bG-CSF por medio de un resto sacárido.

30 La presente invención también proporciona un polipéptido bG-CSF que comprende un polímero soluble en agua unido mediante un enlace

covalente al polipéptido bG-CSF en un único aminoácido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido unido de forma covalente al polímero soluble en agua es un aminoácido no codificado de manera natural presente en el polipéptido.

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

La presente invención proporciona un polipéptido bG-CSF que comprende al menos un ligador, polímero o molécula biológicamente activa, en el que dicho ligador, polímero o molécula biológicamente activa se une al polipéptido a través de un grupo funcional de un aminoácido no codificado de manera natural incorporado de manera ribosómica en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido está monopegilado. La presente invención también proporciona un polipéptido bG-CSF que comprende un ligador, polímero o molécula biológicamente activa que se une a uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en el que dicho aminoácido no codificado de manera natural se incorpora de manera ribosómica en el polipéptido en sitios preseleccionados.

Dentro del alcance de esta invención se incluye la secuencia líder o señal de bG-CSF unida a una región codificante para bG-CSF, así como una secuencia señal heteróloga unida a una región codificante para bG-CSF. La secuencia líder o señal heteróloga seleccionada debe ser una que se reconoce y procesa, por ejemplo, por el sistema de secreción de la célula huésped para secretar y posiblemente se escinde mediante una peptidasa señal, por la célula huésped. Un método de tratamiento de un estado o

trastorno con el bG-CSF de la presente invención se pretende que implique tratar con bG-CSF con o sin un péptido señal o líder.

5 La presente invención proporciona un método de tratamiento y prevención de infecciones en animales. La presente invención también proporciona un método de tratamiento y prevención de la mastitis y la fiebre de embarque en animales bovinos. La presente invención también proporciona un método de tratamiento de infecciones en animales sin
10 acumulación de resistencia de cepa de bacterias. Además, la presente invención proporciona un polipéptido purificado y aislado que tiene parte o la totalidad de la confirmación estructural primaria y una o más de las propiedades biológicas de G-CSF bovino que se produce de manera natural, y secuencias de ADN que codifican para tal G-CSF bovino.

En otra realización de la invención, se administran uno o más factores estimulantes de colonias adicionales al animal infectado con G-CSF, incluyendo, pero sin limitarse a, GM-CSF, M-CSF y multi-CSF (IL-3). Los
15 CSF se administran juntos o por separado. En una realización adicional, se tratan infecciones de animales administrando G-CSF con uno o más de: los interferones incluyendo, pero sin limitarse a, interferón α , IL2, y TNF o con antibióticos tradicionales incluyendo, pero sin limitarse a, penicilinas, cefalosporinas, y aminoglicósidos.
20

En otra realización, se usa tratamiento con bG-CSF de una manera profiláctica. Puede usarse bG-CSF como terapia profiláctica para aumentar la defensa de huésped de animales que están en riesgo de adquirir una infección bacteriana, por levaduras o fúngica. Por ejemplo, puede usarse
25 bG-CSF como terapia profiláctica en animales normales con riesgo de adquirir una infección, incluyendo, pero sin limitarse a, neumonía. El término "normal" tal como se usa en el presente documento significa un animal que tiene una función inmunitaria normal y fórmula leucocitaria y recuento de glóbulos blancos normales. Se trata el ganado de manera profiláctica antes
30 del embarque u otras situaciones que pueden debilitar al ganado, con el fin de reforzar y sensibilizar su capacidad para luchar contra infecciones. La

administración del bG-CSF puede realizarse en el momento en el que se procesa el ganado, es decir, se vacuna, se marca, etc. El tratamiento con bG-CSF también puede realizarse durante la terapia de vacas sin lactancia y/o justo antes de que la vaca de a luz con el fin de reducir la posibilidad de infecciones intrauterinas posparto, y de mastitis durante las fases tempranas de lactancia. Véanse Kehrli *et al*, Am. J. Vet. Res., 50, n.º 2, 207 (1989); Oliver *et al*, J. Dairy Sci. 71 :2584-2606 (1988); y Kehrli *et al*, J Dairy Sci. 74:4399-4412 (1991) para una descripción de la función bovina de los neutrófilos durante el periodo periparturiente. De manera convencional, no hay ningún tratamiento con antibióticos justo antes del nacimiento debido a residuos que aparecerían en la leche de las vacas haciendo que no fuese adecuada para su uso.

En otra realización, la conjugación del polipéptido bG-CSF que comprende uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural con otra molécula, incluyendo, pero sin limitarse a, PEG, proporciona bG-CSF sustancialmente purificado debido a la reacción química única usada para la conjugación con el aminoácido no natural. La conjugación de bG-CSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural con otra molécula, tal como PEG, puede realizarse con otras técnicas de purificación realizadas antes o después de la etapa de conjugación para proporcionar bG-CSF sustancialmente puro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

Figura 2 - se muestran detalles referentes a una línea de célula huésped usada para expresar bG-CSF.

Figura 3 - se muestra análisis de SDS-PAGE de la expresión de polipéptidos bG-CSF de la presente invención.

Figura 4 - se muestra análisis de SDS-PAGE de fracciones de picos de la columna CM FF de bG-CSF antes de la pegilación.

Figura 5 - se muestra análisis de SDS-PAGE de fracciones de picos de la columna SP HP de bG-CSF-T133pAF pegilado.

Figura 6 - se muestra análisis de SDS-PAGE de b-GCSF antes y después de la pegilación.

5 Figura 7a - se muestra la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm).

Figura 7b - se muestra la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm).

10 Figura 8a - se muestra la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm).

Figura 8b - se muestra la digestión con tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm).

Figura 9a - se muestra la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm).

15 Figura 9b - se muestra la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm).

Figura 10a - se muestra la digestión con Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm).

20 Figura 10b - se muestra la digestión con Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm).

Figura 11 - se muestra un análisis de SEC-HPLC del polipéptido bG-CSF pegilado.

Figura 12 - se muestra un análisis de SEC-HPLC del polipéptido bG-CSF.

25 Figura 13 - se muestran valores de EC50 sin tratar del ensayo de proliferación de M-NFS60 de G-CSF T133pAF bovino pegilado de 20 K y de tipo natural.

30 Figura 14 - se muestran diferencias de EC50 en el ensayo de proliferación de M-NFS60 de G-CSF T133pAF bovino pegilado de 20 K frente a tipo natural.

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

Figura 16 - se muestran resultados de la administración de bG-CSF pegilado sobre el ANC.

5 Figura 17 - una gráfica lineal que muestra el recuento absoluto de neutrófilos (media $\pm$ error estándar) en terneros tratados o bien con tampón de formulación o bien con bG-CSF pegilado tras una única inyección subcutánea a 40 μ g/kg.

10 Figura 18 - una gráfica lineal que muestra la producción de leche diaria media de vacas del ejemplo de 40 μ g/kg.

15 Figura 19 - una gráfica de barras que muestra las diferencias en los recuentos de células somáticas en los días 3, 5, 7 y 10 tras el parto entre cuatro grupos de vacas incluyendo un grupo control, un grupo tratado con bG-CSF no pegilado tratado diariamente, un grupo al que se le inyecta BG-CSF pegilado 40 μ g/kg, y un grupo al que se le inyecta BG-CSF pegilado 20 μ g/kg

DEFINICIONES

20 Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, constructos y reactivos particulares descritos en el presente documento y como tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente para los fines de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que se limitará

25 únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

30 Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, referencia a "bGCSF" "G-CSF bovino", "bG-CSF", "bG-CSF", "polipéptido G-CSF bovino" o "polipéptido bG-CSF" y diversas formas con guión y sin guión son una referencia a una o más de tales proteínas e

incluyen equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia para el fin de describir y dar a conocer, por ejemplo, los constructos y metodologías que se describen en las publicaciones, que pueden usarse en relación con la invención descrita ahora. Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse nada en el presente documento como admisión de que los inventores no tienen derecho a una fecha anterior a tal divulgación en virtud de la invención previa o por cualquier otro motivo.

La expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un polipéptido bG-CSF que puede estar sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con la proteína según se encuentra en su entorno que se produce de manera natural, es decir una célula nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos bG-CSF producidos de manera recombinante. Los polipéptido bG-CSF que pueden estar sustancialmente libres de material celular incluyen preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, o menos de

aproximadamente el 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido bG-CSF o variante del mismo se produce de manera recombinante por las células huésped, la proteína puede estar presente a aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, o aproximadamente el 1% o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido bG-CSF o variante del mismo se produce de manera recombinante 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 tanto, un polipéptido bG-CSF "sustancialmente purificado" según se produce mediante los métodos de la presente invención puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 75%, 80%, 85%, y más específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 90%, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 95%, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 99% o mayor según se determina mediante métodos apropiados tales como análisis de 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 método usado para la inserción, por ejemplo, captación directa,

transducción, apareamiento f, u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, puede integrarse en el genoma huésped.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "medio" o "medios" incluye cualquier medio de cultivo, disolución, sólido, semi-sólido, o soporte rígido que puede 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 procariontes, *E. coli*, o células huésped de *Pseudomonas*, y contenidos celulares. Por tanto, el término puede abarcar medio en el que se ha hecho crecer la célula huésped, por ejemplo, medio en el que se ha secretado el polipéptido bG-CSF, incluyendo medio o bien antes o bien después de la etapa de proliferación. El término también puede abarcar tampones o reactivos que contienen lisados de célula huésped, tales como en el caso en el que el polipéptido bG-CSF se produce de manera intracelular y las células huésped se lisan o alteran para liberar el polipéptido bG-CSF.

20 "Agente reductor", tal como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de la proteína, se define como cualquier compuesto o material que mantiene los grupos sulfhidrilo en el estado reducido y reduce los puentes disulfuro intra o intermoleculares. Agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a, ditioneol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioneol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanotiol), y glutatión reducido. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que una amplia variedad de agentes reductores son adecuados para su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención.

25 "Agente oxidante", tal como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de la proteína, se define como cualquier compuesto o material que puede extraer un electrón de un compuesto que está oxidándose. Agentes oxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan

a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitól oxidado y oxígeno. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que una amplia variedad de agentes oxidantes son adecuados para su uso en los métodos de la presente invención.

5 "Agente de desnaturalización" o "desnaturalizante", tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier compuesto o material que provocará un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente de desnaturalización o desnaturalizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del agente de desnaturalización o

10 desnaturalizante particular. Agentes de desnaturalización o desnaturalizantes particulares pueden ser caotrops, detergentes, disolventes orgánicos, disolventes miscibles con agua, fosfolípidos o una combinación de dos o más de tales agentes. Caotrops adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea, guanidina, y tiocianato de sodio. Detergentes

15 útiles pueden incluir, pero no se limitan a, detergentes fuertes tales como dodecilsulfato de sodio, o éteres de polioxietileno (por ejemplo detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes no iónicos suaves (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves tales como N-2,3-(dioleiloxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes zwitteriónicos incluyendo,

20 pero sin limitarse a, sulfobetainas (Zwittergent), 3-(3-cloramidopropil)dimetilamonio-1-propano-sulfato (CHAPS), y 3-(3-cloramidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano-sulfonato (CHAPSO). Pueden usarse como desnaturalizantes disolventes orgánicos miscibles con

25 agua tales como acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente alcoholes C₂-C₄ tales como etanol o isopropanol), o alcanodíoles inferiores (especialmente alcanodíoles C₂-C₄ tales como etilenglicol). Fosfolípidos útiles en la presente invención pueden ser fosfolípidos que se producen de manera natural tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, y fosfatidilinositol o derivados o variantes de fosfolípidos

30 sintéticos tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilholina.

“Replegamiento”, tal como se usa en el presente documento describe cualquier proceso, reacción o método que transforma polipéptidos que contienen puentes disulfuro de un estado plegado de manera inapropiada o no plegado a una conformación nativa o plegada de manera apropiada con respecto a los puentes disulfuro.

“Plegamiento conjunto”, tal como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a procesos, reacciones o métodos de replegamiento que emplean al menos dos polipéptidos que interaccionan entre sí y dan como resultado la transformación de polipéptidos no plegados o plegados de manera inapropiada en polipéptidos nativos, plegados de manera apropiada.

Tal como se usa en el presente documento, “factor estimulante de colonias de granulocitos” o “G-CSF” incluirá los polipéptidos y proteínas que tienen al menos una actividad biológica de G-CSF (tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 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 que se incorporan como referencia al presente documento), así como análogos de G-CSF, isoformas de G-CSF, compuestos miméticos de G-CSF, fragmentos de G-CSF, proteínas G-CSF híbridas, oligómeros y multímeros de proteínas de fusión, homólogos, variantes de patrón de glicosilación, y muteínas, independientemente de la actividad biológica de los mismos, y además independientemente del método de síntesis o preparación de los mismos incluyendo, pero sin limitarse a, métodos recombinantes (ya se produzcan a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), sintéticos, transgénicos y activados por genes. Ejemplos específicos de G-CSF incluyen, pero no se limitan a, pegfilgrastim (NEULASTA®), filgrastim (NEUPOGEN®), análogo de G-CSF, mutantes de G-CSF, G-CSF glicosilado alterado, y análogos de G-CSF conjugados con PEG. Ejemplos específicos de líneas celulares modificadas para la expresión de G-CSF humano endógeno se describen en Devlin *et al.*, J.

Leukoc. Biol. 41: 306 (1987); las patentes estadounidenses n.^{os} 6.716.606; 6.379.661; 6.004.548; 5.830.705; 5.582.823; 4.810.643; y 6.242.218, que se incorporan como referencia al presente documento.

5 Tal 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 bG-CSF, así como análogos de bG-CSF, isoformas de bG-CSF, compuestos miméticos de bG-CSF, fragmentos de bG-CSF, proteínas bG-CSF híbridas, multímeros y oligómeros de proteínas de fusión, homólogos,
10 variantes de patrón de glicosilación, y muteínas, independientemente de la actividad biológica de los mismos, y además independientemente del método de síntesis o preparación de los mismos incluyendo, pero sin limitarse a, métodos recombinantes (ya se produzcan a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de ácido nucleico), sintéticos,
15 transgénicos y activados por genes. Ejemplos específicos de G-CSF incluyen, pero no se limitan a, mutantes de bG-CSF, G-CSF glicosilado alterado, y análogos de G-CSF conjugados con PEG.

La expresión "G-CSF bovino (bG-CSF)" o "polipéptido bG-CSF" se refiere a factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF bovino tal como se describió anteriormente, así como un polipéptido que conserva al
20 menos una actividad biológica de bG-CSF que se produce de manera natural. Los polipéptidos bG-CSF incluyen las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables, y profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes
25 biológicamente activas y estereoisómeros del G-CSF bovino que se produce de manera natural así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas del G-CSF bovino que se produce de manera natural y fusiones de polipéptidos del mismo. Ejemplos de polipéptidos y compuestos miméticos de bG-CSF incluyen los descritos en el documento WO 89/10932, las
30 patentes estadounidenses n.^{os} 5.849.883 y 6.497.869, que se incorporan como referencia al presente documento en su totalidad. Las fusiones que

comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal, extremo carboxilo terminal, o ambos, quedan abarcadas por la expresión "polipéptido bG-CSF". Fusiones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, metionil-bG-CSF en el que se une una metionina al extremo N terminal de bG-CSF (tal como el polipéptido en la SEQ ID NO: 2) resultante de la expresión recombinante de la forma madura de bG-CSF, fusiones para los fines de purificación (incluyendo, pero sin limitarse a, polihistidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas tales como albúmina sérica. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de bG-CSF que se produce de manera natural para las formas de longitud completa y madura se conoce, al igual que variantes tales como variantes de un único aminoácido y variantes de corte y empalme. Para la secuencia de aminoácidos de bG-CSF maduro así como 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 para 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 incluyendo, pero sin limitarse a, unión a su receptor, provocando dimerización de su receptor, estimulación de producción de neutrófilos, y estimulación de proliferación y diferenciación celular. Ejemplos de algunas de las actividades biológicas de factor estimulante de colonias de granulocitos y hG-CSF se describieron anteriormente y en las patentes estadounidenses n.ºs 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, que se incorporan como referencia al presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido G-CSF bovino", "polipéptido bG-CSF", "G-CSF bovino" o "bG-CSF" y formas con guión y sin guión de los mismos 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 alterado, bG-CSF conjugado con PEG, isoformas de bG-CSF, compuestos miméticos de bG-CSF, fragmentos de bG-CSF, proteínas bG-CSF híbridas, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes de patrón de
 5 glicosilación, variantes, variantes de corte y empalme, y muteínas, de los mismos, independientemente de la actividad biológica de los mismos, y además independientemente del método de síntesis o preparación de los mismos incluyendo, pero sin limitarse a, métodos recombinantes (ya se produzcan a partir de ADNc, ADN genómico, ADN sintético u otra forma de
 10 ácido nucleico), *in vitro*, *in vivo*, mediante microinyección de moléculas de ácido nucleico, sintéticos, transgénicos y activados por genes. Las expresiones "polipéptido G-CSF bovino", "polipéptido bG-CSF", "G-CSF bovino" o "bG-CSF" abarcan polipéptidos bG-CSF que comprenden una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido. Véase la patente estadounidense n.º 5.849.883, que se incorpora como referencia al presente documento, para análogos de G-CSF bovino.

Se han descrito sustituciones en una amplia variedad de posiciones de aminoácido en bG-CSF. Las sustituciones incluyendo, pero sin limitarse a, las que modulan la estabilidad farmacéutica, aumentan la actividad
 20 agonista, aumentan la resistencia a proteasa, convierten el polipéptido en un antagonista, etc. quedan abarcadas por las expresiones "polipéptido bG-CSF", "polipéptido G-CSF bovino", "G-CSF bovino", o "bG-CSF".

En un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes que codifican para las proteínas variantes, vectores de
 25 expresión que contienen los ácidos nucleicos variantes, células huésped que comprenden los ácidos nucleicos variantes y/o vectores de expresión, y métodos para producir las proteínas variantes. En un aspecto adicional, la invención proporciona tratar una infección administrando a un animal una proteína variante, habitualmente con un vehículo farmacéutico, en una
 30 cantidad terapéuticamente eficaz.

Mutantes de bG-CSF tratados en la patente estadounidense n.º 5.849.863, que se incorpora como referencia en su totalidad, incluyen polipéptidos diseñados con optimización de codones para *E. coli* y proteínas híbridas generadas con secuencia de G-CSF bovino y humano. La patente estadounidense n.º 5.416.195, que se incluye en el presente documento como referencia, en su totalidad, describe mutantes de hG-CSF en los que se ha realizado al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácido (la numeración de aminoácidos es con referencia a la proteína madura; por tanto cuando hay una metionina N-terminal presente, se le asigna la posición -1 ó 0): Cys17 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ser17, Asp27 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ser27, Leu 15 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Glu15, Lys23 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Arg23, Gly28 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ala28, Lys40 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Arg40, Pro44 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ala44, Leu49 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Lys49, Gly55 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ala55, Cys60 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ser60, Pro111 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Glu111, Thr115 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Ser115, y Tyr165 de la secuencia nativa sustituido por un residuo Arg165. Muchos de estos residuos están presentes en la secuencia de bG-CSF y una o más de estas sustituciones pueden encontrarse en un polipéptido bG-CSF de la invención. Carter *et al.* Biologicals (2004) 32:37 describen hG-CSF mutado que carece de sitios de glicosilación. Pueden encontrarse mutaciones similares en polipéptidos bG-CSF de la invención.

En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la invención son sustancialmente idénticos a las SEQ ID NO; 1, 2, o cualquier otra secuencia de un polipéptido bG-CSF. Se conocen bien moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos bG-CSF, incluyendo mutantes y métodos para expresar y purificar polipéptidos bG-CSF.

La expresión "polipéptido bG-CSF" también incluye las sales y profármacos farmacéuticamente aceptables, y profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros del bG-CSF que se produce de manera natural así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas del bG-CSF que se produce de manera natural y fusiones de polipéptidos de los mismos. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal, extremo carboxilo terminal o ambos, quedan abarcadas por la expresión "polipéptido bG-CSF". Fusiones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, metionil-bG-CSF en el que se une una metionina 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 parte del mismo (se une una metionina al extremo N-terminal de bG-CSF resultante de la expresión recombinante), fusiones para el fin de la purificación (incluyendo, pero sin limitarse a, polihistidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas tales como albúmina sérica. La patente estadounidense n.º 5.750.373, que se incorpora como referencia al presente documento, describe un método para seleccionar proteínas novedosas tales como hormona del crecimiento y variantes de fragmento de anticuerpo que tienen propiedades de unión alteradas para sus moléculas receptoras respectivas. El método comprende fusionar un gen que codifica para una proteína de interés con el dominio carboxilo terminal del gen III de la proteína de recubrimiento del fago filamentoso M13. Moléculas quiméricas que comprenden bG-CSF y una o más de otras moléculas. La molécula quimérica puede contener regiones o fragmentos específicos de uno o ambos de bG-CSF y la(s) otra(s) molécula(s). Cualquiera de tales fragmentos puede prepararse a partir de las proteínas mediante métodos bioquímicos convencionales, o expresando un polinucleótido que codifica para el fragmento, bG-CSF, o un fragmento del mismo, puede producirse como proteína de fusión que comprende albúmina sérica humana (HSA), Fc,

o una parte de la misma. Tales constructos de fusión son adecuados para potenciar la expresión del bG-CSF, o fragmento del mismo, en una célula huésped eucariota. Partes de HSA a modo de ejemplo incluyen el polipéptido N-terminal (aminoácidos 1-369, 1-419, y longitudes intermedias comenzando con el aminoácido 1), tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.766.883, y la publicación WO 97/24445, que se incorporan como referencia al presente documento. Otros polipéptidos quiméricos pueden incluir una proteína HSA con bG-CSF, o fragmentos del mismo, unido a cada uno de los extremos C-terminal y N-terminal de la HSA. Pueden crearse otras fusiones mediante 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 dan a conocer la modificación de polipéptidos mediante conjugación con polímero o glicosilación. La expresión "polipéptido bG-CSF" incluye polipéptidos conjugados con un polímero tal como PEG y pueden estar compuestos por una o más derivatizaciones adicionales de cisteína, lisina u otros residuos. Además, el polipéptido bG-CSF puede comprender un ligador o polímero, en el que el aminoácido con el que se conjuga el ligador o polímero puede ser un aminoácido no natural según la presente invención, o puede conjugarse con un aminoácido codificado de manera natural usando técnicas conocidas en la técnica tales como acoplamiento a lisina o cisteína.

Se ha notificado la modificación con polímero de polipéptidos. Se menciona IFN β como ejemplo de un polipéptido que pertenece a la superfamilia de la hormona del crecimiento. El documento WO 00/23114 da a conocer IFN β glicosilado y pegilado. El documento WO 00/23472 da a conocer proteínas de fusión con IFN β . La patente estadounidense n.º 4.904.584 da a conocer polipéptidos empobrecidos en lisina pegilados, en los que al menos un residuo de lisina se ha delecionado o sustituido por otro residuo de aminoácido. El documento WO 99/67291 da a conocer un procedimiento para conjugar una proteína con PEG, en el que se deleciona

al menos un residuo de aminoácido en la proteína y se pone en contacto la proteína con PEG en condiciones suficientes para lograr la conjugación con la proteína. El documento WO 99/03887 da a conocer variantes pegiladas de polipéptidos que pertenecen a la superfamilia de la hormona del crecimiento, en las que se ha sustituido un residuo de cisteína por un residuo de aminoácido no esencial ubicado en una región específica del polipéptido. El documento WO 00/26354 da a conocer un método de producción de variante de polipéptido glicosilada con alergenicidad reducida, que en comparación con un polipéptido original correspondiente comprende al menos un sitio de glicosilación adicional. La patente estadounidense n.º 5.218.092, que se incorpora como referencia al presente documento, da a conocer la modificación de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y otros polipéptidos de modo que se introduce 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 limitarse a, polipéptidos glicosilados en cualquier posición de aminoácido, formas glicosiladas unidas a N o unidas a O del polipéptido. También se consideran variantes que contienen cambios de un único nucleótido como variantes biológicamente activas de polipéptido bG-CSF. También se consideran variantes que contienen cambios de un único nucleótido como variantes biológicamente activas de bG-CSF. Además, también se incluyen variantes de corte y empalme. La expresión "polipéptido bG-CSF" también incluye heterodímeros, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros de bG-CSF de uno cualquiera o más bG-CSF o cualquier otro polipéptido, proteína, hidrato de carbono, polímero, molécula pequeña, ligador, ligando u otra molécula activa de cualquier tipo, unida mediante medios químicos o expresada como proteína de fusión (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.261.550; 6.166.163; 6.204.247; 6.261.550; 6.017.876, que se incorporan como referencia al presente documento), así como análogos de polipéptido que contienen, por ejemplo, delecciones específicas u otras modificaciones y todavía mantienen la

actividad biológica (patentes estadounidenses n.^{os} 6.261.550; 6.004.548; 6.632.426, que se incorporan como referencia al presente documento).

5 Todas las referencias a posiciones de aminoácido en bG-CSF descritas en el presente documento se basan en la posición en la SEQ ID NO: 1, a menos que se especifique lo contrario (es decir, cuando se menciona que la comparación se basa en la SEQ ID NO: 2, u otra secuencia de bG-CSF). Por ejemplo, el aminoácido en la posición 1 de la SEQ ID NO: 1, es una treonina y la treonina correspondiente se ubica en la SEQ ID NO: 2 en la posición 2. Los expertos en la técnica apreciarán que las posiciones de aminoácido correspondientes a las posiciones en la SEQ ID NO: 1 pueden identificarse fácilmente en cualquier otra molécula de bG-CSF tal como la SEQ ID NO: 2. Los expertos en la técnica apreciarán que las posiciones de aminoácido correspondientes a las posiciones en la SEQ ID NO: 1, 2, o cualquier otra secuencia de bG-CSF pueden identificarse fácilmente en cualquier otra molécula de bG-CSF tal como fusiones de bG-CSF, variantes, fragmentos, etc. Por ejemplo, pueden usarse programas de alineación de secuencias tales como BLAST para alinear e identificar una posición particular en una proteína que corresponde a una posición en la SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF. Se pretende que las sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos descritas en el presente documento con referencia a SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF, también se refieran a sustituciones, deleciones o adiciones en posiciones correspondientes en fusiones de bG-CSF, variantes, fragmentos, etc. descritas en el presente documento o conocidas en la técnica y abarcadas expresamente por la presente invención.

25 Las expresiones "polipéptido bG-CSF" o "bG-CSF" abarcan polipéptidos bG-CSF que comprenden una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácido. Los polipéptidos bG-CSF de la presente invención pueden estar compuestos por modificaciones con uno o más aminoácidos naturales junto con modificación de uno o más aminoácidos no naturales. Se han descrito sustituciones a modo de ejemplo en una amplia

30

variedad de posiciones de aminoácido en polipéptidos bG-CSF que se producen de manera natural, incluyendo, pero sin limitarse a, sustituciones que modulan la estabilidad farmacéutica, que modulan una o más de las actividades biológicas del polipéptido bG-CSF, tales como, pero sin limitarse a, aumentan la actividad agonista, aumentan la solubilidad del polipéptido, disminuyen la sensibilidad a la proteasa, convierten el polipéptido en un antagonista, etc. y quedan abarcadas por la expresión "polipéptido bG-CSF". En algunas realizaciones, el antagonista de bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de manera natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión a receptor de la molécula de bG-CSF.

En algunas realizaciones, el polipéptidos bG-CSF comprende además una adición, sustitución o delección que modula la actividad biológica del polipéptido bG-CSF. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden además una adición, sustitución o delección que modula la proliferación, función y/o diferenciación de los neutrófilos del polipéptido bG-CSF. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o delecciones pueden modular una o más propiedades o actividades de bG-CSF. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o delecciones pueden modular la afinidad por un receptor, modular la semivida circulante, 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 vía de administración particular. De manera similar, los polipéptidos bG-CSF pueden comprender secuencias de escisión por proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG, poli-His, GST, etc), o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitarse a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitarse a, GFP), purificación u otros rasgos del polipéptido.

La expresión "polipéptido bG-CSF" también abarca homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que están unidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los unidos directamente mediante cadenas laterales de aminoácidos no codificados de manera natural, o bien a la misma o bien a otra cadena lateral de aminoácidos no codificados de manera natural, a cadenas laterales de aminoácidos codificados de manera natural, o indirectamente mediante un ligador. Ligadores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, compuestos orgánicos pequeños, polímeros solubles en agua de una variedad de longitudes tales como poli(etilenglicol) o povidexano, o polipéptidos de diversas longitudes.

Un "aminoácido no codificado de manera natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otras expresiones que pueden usarse de manera sinónima a la expresión "aminoácido no codificado de manera natural" son "aminoácido no natural", "aminoácido que no se produce de manera natural", y diversas versiones con guión y sin guión de las mismas. La expresión "aminoácido no codificado de manera natural" también incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se producen mediante modificación (por ejemplo modificaciones postraduccionales) de un aminoácido codificado de manera natural (incluyendo, pero sin limitarse a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no se incorporan a su vez de manera natural en una cadena de polipéptido en crecimiento mediante el complejo de traducción. Ejemplos de tales aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, pero no se limitan a, JV-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina, y O-fosfotirosina.

Un "grupo de modificación de extremo amino terminal" se refiere a cualquier molécula que puede unirse al extremo amino terminal de un polipéptido. De manera similar, un "grupo de modificación de extremo carboxilo terminal" se refiere a cualquier molécula que puede unirse al extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Los grupos de modificación de extremo terminal incluyen, pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos

o proteínas solubles en agua tales como albúmina sérica, u otros restos que aumentan la semivida en suero de péptidos.

Las expresiones "grupo funcional", "resto activo", "grupo activante", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo" se usan en la técnica y en el presente documento para hacer referencia a partes o unidades diferenciadas, 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 son reactivas con otras moléculas.

Los términos "enlace" o "ligador" se usan en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que se forman normalmente como resultado de una reacción química y normalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles, incluyendo, pero sin limitarse a, en condiciones fisiológicas durante un periodo prolongado de tiempo, quizás incluso indefinidamente. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en disoluciones acuosas, incluyendo por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace puede degradarse por una o más enzimas. Tal como se entiende en la técnica, PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura del polímero o en el grupo ligador entre la estructura del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de PEG-ácidos carboxílicos o PEG-ácidos carboxílicos activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo se hidrolizan generalmente en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero no se limitan a, enlaces carbonato; enlaces imina resultantes de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster fosfato formados haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son un producto de reacción de

una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluyendo, pero sin limitarse a, en un extremo de un polímero tal como PEG₅ y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidita, incluyendo, pero sin limitarse a, en el extremo de un polímero, y un grupo 5¹ hidroxilo de un oligonucleótido.

Las expresiones "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usan en el presente documento significan cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema, ruta, molécula o interacción biológica relacionada con un organismo, incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, bacteriófagos, transposón, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos, en particular, tal como se usa en el presente documento, moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, cualquier sustancia prevista para el diagnóstico, cura, alivio, tratamiento o prevención de enfermedad en seres humanos u otros animales, o potenciar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de molécula pequeña, vacunas, inmunógenos, drogas duras, drogas blandas, hidratos de carbono, moléculas o átomos inorgánicos, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, 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 celular, liposomas, micropartículas y micelas. Los polipéptidos bG-CSF pueden añadirse en una formulación micelular. Clases de agentes biológicamente activos que son adecuadas para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, fármacos, profármacos, radionúclidos, agentes de obtención de imágenes, polímeros, antibióticos,

fungicidas, agentes antivirales, agentes anti-inflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes antiansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios, y similares.

5 Un "polímero bifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales diferenciados que pueden reaccionar específicamente con otros restos (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un ligador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un
10 componente biológicamente activo particular, y otro grupo reactivo con un grupo en un segundo componente biológico, puede usarse para formar un conjugado que incluye el primer componente biológicamente activo, el ligador bifuncional y el segundo componente biológicamente activo. Se conocen muchos procedimientos y moléculas de ligador para la unión de
15 diversos compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea n.º 188.256; las patentes estadounidenses n.ºs 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789 que se incorporan como referencia al presente documento. Un "polímero multifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales
20 diferenciados que pueden reaccionar específicamente con otros restos (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede ser de cualquier longitud o peso molecular deseados, y puede seleccionarse para proporcionar una separación o
25 conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas al bG-CSF y su receptor o bG-CSF.

 Cuando se especifican grupos sustituyentes por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de
30 escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura -CH₂O- es equivalente a la estructura -OCH₂-.

El término "sustituyentes" incluye, pero no se limita a, "sustituyentes que no interfieren". Los "sustituyentes que no interfieren" son aquellos grupos que proporcionan compuestos estables. Radicales o sustituyentes que no interfieren adecuados incluyen, pero no se limitan a, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, alcoxilo C₁-C₁₀, aralquilo C₁-C₁₂, alquilarilo C₁-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquenilo C₃-C₁₂, fenilo, fenilo sustituido, toluilo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C₂-C₁₂, alcoxiarilo C₂-C₁₂, arioxialquilo C₇-C₁₂, oxiarilo C₇-C₁₂, alquilsulfinilo C₁-C₆, alquilsulfonilo C₁-C₁₀, $\sim(\text{CH}_2)_m\text{--O--}(\text{alquilo C}_1\text{--C}_{10})$ en el que m es de desde 1 hasta 8, arilo, arilo sustituido, alcoxilo sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO₂, -CN, -NRC(O)-(alquilo C₁-C₁₀), -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀), alquil-tioalquilo C₂-C₁₀, -C(O)O-(alquilo C₁-C₁₀), -OH, -SO₂, =S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀)-CF₃, -C(O)-CF₃, $\sim\text{C(O)NR}_2$, -(arilo C₁-C₁₀)-S-(arilo C₆-C₁₀), -C(O)-(arilo C₁-C₁₀), $\sim(\text{CH}_2)_m\text{O--}(\text{alquilo C}_1\text{--C}_{10})$ en el que cada m es de desde 1 hasta 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos, y similares. Cada R tal 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", en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar totalmente saturado, mono o poliinsaturado, y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan

a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir los derivados de alquilo definidos en más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo".

El término "alquileno" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, tal como se muestra a modo de ejemplo, pero no se limita, por 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". Normalmente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá desde 1 hasta 24 átomos de carbono, siendo los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono una realización particular de los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

Los términos "alcóxilo", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcóxilo) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante 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 hidrocarbonado estable de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que el nitrógeno y el azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El/Los heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que se une el grupo alquilo al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2-$

$\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, -CH=CH-O-CH_3 , $\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$, $\text{-CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$, y $\text{-CH=CH-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3$.
 Puede haber hasta dos heteroátomos consecutivos, tal como, por ejemplo, $\text{-CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ y $\text{-CH}_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_3$. De manera similar, el término
 5 "heteroalquileo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, tal como se muestra como ejemplo, pero no se limita, por $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ y $\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$. Para los grupos heteroalquileo, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno cualquiera o ambos de los
 10 extremos terminales de la cadena (incluyendo, pero sin limitarse a, alquilenoxilo, alquilendioxilo, alquilenamino, alquilendiamino, aminooxialquileo, y similares). Todavía adicionalmente, para los grupos de unión alquileo y heteroalquileo, no se implica ninguna orientación del grupo de unión por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de
 15 unión. Por ejemplo, la fórmula $\text{-C(O)}_2\text{R}'$ representa tanto $\text{C(O)}_2\text{R}'$ como $\text{R}'\text{C(O)}_2$.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", en sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente.
 20 Por tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluye enlaces de anillo saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que se une el heterociclo al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-
 25 ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares. Adicionalmente, el término
 30 abarca estructuras de anillo bicíclicas y tricíclicas. De manera similar, el término "heterocicloalquileo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente

significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. La unión de polímeros solubles en agua a polipéptidos bG-CSF puede dar como resultado cambios incluyendo, pero sin limitarse a, aumento o modulación de la semivida en suero, o aumento o modulación de la semivida terapéutica en relación con la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas tales como agregación y formación de multímeros, unión a receptor alterada, unión alterada a una o más parejas de unión, y dimerización o multimerización de receptor alterada. El polímero soluble en agua puede tener o no su propia actividad biológica, y puede usarse como ligador para unir bG-CSF a otras sustancias, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más polipéptidos bG-CSF, o una o más moléculas biológicamente activas. Polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polietilenglicol-propionaldehído, derivados de mono-alcoxilo C₁-C₁₀ o ariloxilo de los mismos (descritos en la patente estadounidense n.º 5.252.714 que se incorpora como referencia al presente documento), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poliaminoácidos, anhídrido maléico de divinil éter, JV-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano incluyendo sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo, pero sin limitarse a, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados del mismo, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, poli(vinil etil éteres), y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida], y similares, o mezclas de los mismos. Ejemplos de tales polímeros solubles en agua incluyen, pero no se

limitan a, polietilenglicol y albúmina sérica. Los documentos WO 03/074087 y WO 03/074088 describen la conjugación de proteínas o moléculas pequeñas con hidroxialquilalmidón (HAS). Ejemplos de hidroxialquilalmidones incluyen, pero no se limitan a, hidroxietilalmidón. Conjugados de hidroxialquilalmidón y otra molécula, por ejemplo, pueden comprender un enlace covalente entre grupos aldehído terminales de HAS y grupos reactivos de la otra molécula.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polialquilenglicol" o "poli(alquenglicol)" se refiere a polietilenglicol (poli(etilenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol, y derivados de los mismos. El término "polialquilenglicol" abarca tanto polímeros lineales como ramificados y pesos moleculares promedio de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Otras realizaciones a modo de ejemplo se indican, 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 anillo único o múltiples anillos (incluyendo, pero sin limitarse a, desde 1 hasta 3 anillos) que se condensan juntos o se unen de forma covalente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el/los átomos de nitrógeno está(n) opcionalmente cuaternizado(s). Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula mediante un heteroátomo. Ejemplos no limitativos de grupos de arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-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. Sustituyentes para cada uno de los sistemas cíclicos arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

5 Por motivos de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (incluyendo, pero sin limitarse a, ariloxilo, ariltioxilo, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo tal como se definieron anteriormente. Por tanto, se pretende que el término "arilalquilo" incluya los radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluyendo, pero sin limitarse a, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) 10 incluyendo aquellos grupos alquilo en los que se ha sustituido un átomo de carbono (incluyendo, pero sin limitarse a, un grupo metileno) por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (incluyendo, pero sin limitarse a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

15 Se pretende que cada uno de los términos anteriores (incluyendo, pero sin limitarse a, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluya tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. A continuación se proporcionan sustituyentes a modo de ejemplo para cada tipo de radical.

20 Sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos denominados con frecuencia alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitarse a: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR' R", -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que oscila desde cero hasta (2m'+1), en el que m'^j es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, 30 heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido,

incluyendo, pero sin limitarse a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxilo o tioalcoxilo, 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 esos grupos presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, se pretende que -NR'R'' incluya, pero no se limite a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que se pretende que el término "alquilo" incluya grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitarse a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero sin limitarse a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan de, pero no se limitan a: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxilo C₁-C₄ y fluoroalquilo C₁-C₄, en un número que oscila desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y en los que R', R'', R''' y R'''' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo. 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 esos grupos presente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "semivida en suero modulada" significa el cambio positivo o negativo en la semivida circulante de un bG-CSF modificado con respecto a su forma no modificada.

La semivida en suero se mide tomando muestras de sangre a diversos puntos de tiempo tras 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 el cálculo de la semivida en suero. Una semivida en suero aumentada tiene de manera deseable al menos aproximadamente el doble, pero un aumento menor puede ser útil, por ejemplo cuando permite un régimen de dosificación satisfactorio o evita un efecto tóxico. En algunas realizaciones, el aumento es de al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente diez veces.

La expresión "semivida terapéutica modulada" tal 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 tras la administración. Una semivida terapéutica aumentada permite de manera deseable un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. En algunas realizaciones, la semivida terapéutica aumentada resulta de una potencia aumentada, unión aumentada o disminuida de la molécula modificada a su diana, descomposición aumentada o disminuida de la molécula por enzimas tales como proteasas, o un aumento o disminución de otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada o un aumento o disminución del aclaramiento mediado por el receptor de la molécula.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, significa que el ácido nucleico o la proteína está libre de al menos algunos de los componentes celulares con los que se asocia en el 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*. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado o

bien seco o bien semiseco, o en disolución, incluyendo, pero sin limitarse a, una disolución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado está separado de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican para una proteína distinta del gen de interés. El término "purificado" significa que un ácido nucleico o una proteína da lugar sustancialmente a una banda en un gel electroforético. Particularmente, puede significar que el ácido nucleico o la proteína es puro en al menos el 85%, puro en al menos el 90%, puro en al menos el 95%, puro en al menos el 99% o más.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, o ribonucleótidos y polímeros de los mismos o bien en forma monocatenaria o bien bicatenaria. A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos que se producen de manera natural. A menos que se limite específicamente de otro modo, la expresión también se refiere a análogos de oligonucleótidos incluyendo PNA (ácido nucleico peptídico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (tioatos de fósforo, fosforoamidatos, y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma (incluyendo, pero sin limitarse a, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codón degenerado pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de

uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, Mot. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

5 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Es decir, una descripción que se refiere a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a
10 polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un aminoácido no codificado de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácido de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los
15 residuos de aminoácido están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural, así como a análogos de aminoácidos y compuestos miméticos de aminoácidos que
20 funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se codifican de manera 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
25 valina) y pirrolisina y seleno-cisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, tal como, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como
30 norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma

estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos proteogénicos que se producen de manera natural; D-aminoácidos, aminoácidos químicamente modificados tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como β -alanina, ornitina, etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades que se sabe en la técnica que son características de aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen, pero no se limitan a, α -metilo-aminoácidos (por ejemplo, α -metil-alanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil- histidina), aminoácidos que tienen un metileno extra en la cadena lateral (aminoácidos "homo"), y aminoácidos en los que se sustituye un grupo funcional ácido carboxílico en la cadena lateral por un grupo ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cistéico). La incorporación de aminoácidos no naturales, incluyendo aminoácidos sintéticos no nativos, aminoácidos sustituidos, o uno o más D-aminoácidos en las proteínas de la presente invención puede ser ventajosa de varias maneras diferentes. Los péptidos que contienen D-aminoácidos, etc., muestran una estabilidad *in vitro* o *in vivo* aumentada en comparación con sus equivalentes que contienen L-aminoácidos. Por tanto, la construcción de péptidos, etc., que incorporan D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se desea o se requiere una mayor estabilidad intracelular. Más específicamente, los D-péptidos, etc., son resistentes a proteasas y peptidasas endógenas, proporcionando así una biodisponibilidad de la molécula mejorada, y vidas *in vivo* prolongadas cuando se desean tales propiedades. Adicionalmente, los D-péptidos, etc., no pueden procesarse eficazmente para la presentación limitada por complejo principal de histocompatibilidad de clase II a células T auxiliares, y por tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en el organismo completo.

En el presente documento puede hacerse referencia a los aminoácidos o bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, puede hacerse referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de letras únicas comúnmente aceptados.

"Variantes modificadas de manera conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, "variantes modificadas de manera conservativa" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una clase de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica para un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren,

añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" en la que la alteración da como resultado la delección de un aminoácido, adición de un aminoácido, o sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Los expertos en la técnica conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además de, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

Los expertos en la técnica conocen tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas unos de otros:

- 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);
- 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.; 2ª edición (diciembre de 1993).

Los términos "idéntico" o "identidad" en porcentaje, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente el 60% de identidad, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95% de identidad a

lo largo de una región especificada), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima a lo largo de un intervalo de comparación, o región designada según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para los expertos en la técnica) o mediante alineación manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o a lo largo de una región que tiene 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, cuando no se especifica, a lo largo de la totalidad de la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica para un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de especies distintas del ser humano, puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de examinar una biblioteca en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene una secuencia de polinucleótido de la invención o un fragmento de la misma, y aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótido. Tales técnicas de hibridación se conocen bien por el experto en la técnica.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan coordinaciones de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Pueden usarse parámetros de programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. Entonces, el algoritmo de comparación de secuencias calcula las identidades de secuencia en porcentaje para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

Un "intervalo de comparación", tal como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de las varias posiciones análogas seleccionada del grupo que consiste en desde 20 hasta 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras haber alineado de manera óptima las dos secuencias. Los expertos en la técnica conocen métodos de alineación de secuencias para la comparación. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul *et al.* (1990) *J Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis de BLAST está disponible al público mediante el Centro Nacional de Información Biotecnológica en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de

aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra de 3, y esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, esperanza (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una media de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor suma de probabilidades (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca por azar una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor suma de probabilidades en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, o inferior a aproximadamente 0,01, o inferior a aproximadamente 0,001.

La frase "se hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, formación de dúplex, o hibridación de una molécula únicamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (incluyendo, pero sin limitarse a, ARN o ADN de biblioteca o celular total).

La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN, PNA u otros compuestos miméticos de ácido nucleico, o combinaciones de los mismos en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura tal como se conoce e la técnica. Normalmente, en condiciones rigurosas una sonda se hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (incluyendo, pero sin limitarse a, ARN o ADN de biblioteca o celular total) pero no se hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las

condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas superiores. Se encuentra una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos 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). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida pH. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica definida, pH, y concentración de ácido nucleico) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas está ocupado en el equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser aquellas en las que la concentración en sal es inferior a aproximadamente ión sodio 1,0 M, normalmente una concentración de ión sodio (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (incluyendo, pero sin limitarse a, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (incluyendo, pero sin limitarse a, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces la hibridación de fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo pueden ser tal como sigue: formamida al 50%, 5X SSC, y SDS al 1%, incubar a 42°C, o 5X SSC, SDS al 1%, incubar a 65°C, con un lavado con 0,2X SSC, y SDS al 0,1% a 65°C. Tales lavados pueden realizarse durante 5, 15, 30, 60, 120, o más minutos.

Tal 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 limitarse a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

5 Tal 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 limitarse a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas*
10 *aeruginosa*, *Pseudomonas pulida*, etc.), o al dominio filogenético *Archaea* (incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* tal como *Haloferax volcanii* y especies de *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix*, etc.).

15 El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en algunas realizaciones un mamífero, y en otras realizaciones 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), animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas,
20 cerdos, caballos, y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).

La expresión "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad del polipéptido de aminoácido no natural modificado que se administra que aliviará en alguna medida uno o más de
25 los síntomas de la enfermedad, estado o trastorno que está tratándose. Las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácido no natural modificado descritas en el presente documento pueden administrarse para tratamientos profilácticos, de potenciación y/o terapéuticos.

Los términos "potenciar" o "de potenciación" significan aumentar o
30 prolongar o bien la potencia o bien la duración de un efecto deseado. Por tanto, con respecto a la potenciación del efecto de agentes terapéuticos, el

término “de potenciación” se refiere a la capacidad para aumentar o prolongar o bien la potencia o bien la duración del efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una “cantidad eficaz de potenciación”, tal 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 usa en un animal, las cantidades eficaces para su uso dependerán de la gravedad y el transcurso de la enfermedad, trastorno o estado, terapia previa, el estado de salud del animal y respuesta a los fármacos, y el criterio del veterinario encargado.

El término “modificado”, tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier cambio realizado a un polipéptido dado, tal como cambios a la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, modificación cotraduccional, o modificación postraduccional de un polipéptido. La expresión forma “(modificada)” significa que los polipéptidos que están tratándose están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos que están tratándose pueden estar modificados o no modificados.

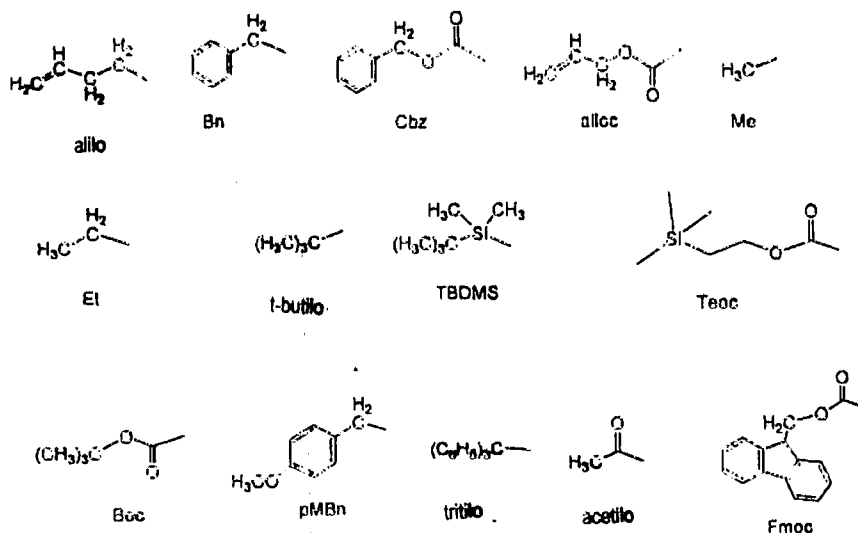
La expresión “modificado postraduccionalmente” se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en tal aminoácido tras haberse incorporado en una cadena de polipéptido. La expresión abarca, únicamente a modo de ejemplo, modificaciones *in vivo* cotraduccionales, modificaciones *in vitro* cotraduccionales (tales como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones *in vivo* postraduccionales, y modificaciones *in vitro* postraduccionales.

En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen el polipéptido bG-CSF a un animal susceptible de, o de otro modo en riesgo de, una enfermedad, trastorno o estado particular. Se define que tal cantidad es una “cantidad profilácticamente eficaz”, en uso, las cantidades precisas también dependen del estado de salud del animal, el peso y similares. Se considera que se encuentra dentro de la experiencia en la técnica determinar tales cantidades profilácticamente eficaces mediante

experimentación de rutina (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento a escala de la dosis).

El término "protegido" se refiere a la presencia de un resto o "grupo protector" que impide la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que está protegiéndose. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse del grupo de terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9- fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfido. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico y propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo, o terc-butilo. También pueden usarse otros grupos protectores conocidos en la técnica en o con los métodos y composiciones descritos en el presente documento, incluyendo grupos fotolábiles tales como Nvoc y MeNvoc. También pueden usarse otros grupos protectores conocidos en la técnica en o con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Únicamente a modo de ejemplo, pueden seleccionarse grupos de bloqueo/protectores de:



Se describen otros grupos protectores en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

5 En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones que contienen el polipéptido de aminoácido no natural modificado a un animal que ya padece una enfermedad, estado o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad, trastorno o estado. Se define que tal cantidad es una "cantidad
10 terapéuticamente eficaz", y dependerá de la gravedad y transcurso de la enfermedad, trastorno o estado, la terapia previa, el estado de salud del animal y la respuesta a los fármacos y el criterio del veterinario encargado. Se considera que se encuentra dentro de la experiencia en la técnica determinar tales cantidades terapéuticamente eficaces mediante
15 experimentación rutinaria (por ejemplo, un ensayo clínico de aumento a escala de la dosis).

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

Polipéptidos de aminoácido no codificado de manera natural
20 presentados en el presente documento pueden incluir compuestos marcados isotópicamente con uno o más átomos sustituidos por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes
25 compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{19}F , ^{36}Cl , respectivamente. Determinados compuestos marcados isotópicamente descritos en el presente documento, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , pueden ser útiles en
30 ensayos de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Además, la sustitución por isótopos tales como deuterio, es decir, ^2H puede

proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos.

5 Todos los isómeros incluyendo, pero sin limitarse a, diastereómeros, enantiómeros, y mezclas de los mismos, se consideran como parte de las composiciones descritas en el presente documento. En otras realizaciones o adicionales, los polipéptidos de aminoácido no codificado de manera natural se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que entonces se usa para producir un efecto deseado, 10 incluyendo un efecto terapéutico deseado. En otras realizaciones o adicionales, son metabolitos activos de polipéptidos de aminoácido no codificado de manera natural.

15 En algunas situaciones, pueden existir polipéptidos de aminoácido no codificado de manera natural como tautómeros. Además, los polipéptidos de aminoácido no codificado de manera natural descritos en el presente documento pueden existir en formas tanto sin solvatar como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptable tales como agua, etanol y similares. También se considera que las formas solvatadas se dan a conocer en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán 20 que algunos de los compuestos en el presente documento pueden existir en diversas formas tautoméricas. Todas de tales formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.

25 A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectrometría de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia en la técnica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Introducción

30 Se proporcionan moléculas de b-GCSF que comprenden al menos un aminoácido no natural en la invención. En determinadas realizaciones de la

invención, el polipéptido b-GCSF con al menos un aminoácido no natural
 incluye al menos una modificación postraducciona. En una realización, la al
 menos una modificación postraducciona comprende la unión de una
 molécula incluyendo, pero sin limitarse a, hidroxialquilalmidón (HAS),
 5 hidroxietilalmidón (PfES), un marcador, un colorante, un polímero, un
 polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un agente de
 fotorreticulación, un radionúclido, 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
 10 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 soluble en agua,
 una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una
 nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, un resto que contiene
 15 metal, un resto radiactivo, un grupo funcional novedoso, un grupo que
 interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un
 resto fotoenjaulado, un resto excitable mediante radiación actínica, un resto
 fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, un
 resto que incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un
 20 grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a
 carbono, un agente activo redox, un aminotioácido, un resto tóxico, un resto
 marcado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un
 grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un
 grupo de intercalación, un cromóforo, un agente de transferencia de energía,
 25 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 comprende un segundo grupo reactivo a al menos un
 30 aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo utilizando
 metodología química que un experto en la técnica sabe que es adecuada

para los grupos reactivos particulares. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es un resto alquínico (incluyendo, pero sin limitarse a, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina, en el que el grupo propargilo también se denomina a veces resto acetileno) y el segundo grupo reactivo es un resto azido, y se utilizan metodologías químicas de cicloadición [3+2]. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto azido (incluyendo, pero sin limitarse a, en el aminoácido no natural Δ -azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto alquínico. En determinadas realizaciones del polipéptido b-GCSF modificado de la presente invención, se usa al menos un aminoácido no natural (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácido no natural que contiene un grupo funcional ceto) que comprende al menos una modificación postraducciona, en el que la al menos una modificación postraducciona comprende un resto de sacárido. En determinadas realizaciones, la modificación postraducciona se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. Un ligador, polímero, polímero soluble en agua u otra molécula puede unir la molécula al polipéptido. La molécula puede unirse directamente al polipéptido.

En determinadas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* mediante una célula huésped, en la que la modificación postraducciona no se realiza normalmente mediante otro tipo de célula huésped. En determinadas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* mediante una célula eucariota, en la que la modificación postraducciona no se realiza normalmente mediante una célula no eucariota. Ejemplos de modificaciones postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación por unión de glicolípidos, y similares.

En algunas realizaciones, el polipéptido b-GCSF comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural para la glicosilación, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de

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

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

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

En una realización, la modificación postraducciona comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina mediante una unión GlcNAc-asparagina (incluyendo, pero sin limitarse a, en la que el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man^A-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación postraducciona comprende la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitarse a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina mediante una unión GalNAc-serina, GalNAc-treonina, GlcNAc-serina, o GlcNAc-treonina. En determinadas realizaciones, una proteína o un polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de secreción o localización, una cola de epítipo, una cola FLAG, una cola de polihistidina, una fusión de GST, y/o similares. Los ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, pero no se limitan a, una secuencia señal de secreción procariota, una secuencia señal de secreción eucariota, una secuencia señal de secreción eucariota optimizada en 5' para expresión bacteriana, una secuencia señal de secreción novedosa, secuencia señal de secreción de pectato liasa, secuencia señal de secreción Omp A y una secuencia señal de secreción de fago. Los ejemplos de secuencias señal de secreción, incluyen, pero no se limitan a, STII (procariota), Fd GIII y MI3 (fago), Bgl2 (levadura), y la secuencia señal bla derivada de un transposón. Cualquier secuencia de este tipo puede modificarse para proporcionar un resultado deseado con el polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, sustituir una secuencia señal por una secuencia señal diferente, sustituir una secuencia líder por una secuencia líder diferente, etc.

La proteína o el polipéptido de interés puede contener 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. En determinadas realizaciones, al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en una versión que se produce de manera natural de la proteína se sustituye por un aminoácido no natural.

La presente invención proporciona métodos y composiciones basados en b-GCSF que comprende al menos un aminoácido no codificado de manera natural. La introducción de al menos un aminoácido no codificado de manera natural en b-GCSF puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que suponen reacciones químicas específicas, incluyendo, pero sin limitarse a, con uno o más aminoácidos no codificados de manera natural mientras que no reaccionan con los 20 aminoácidos que se producen comúnmente. En algunas realizaciones, b-GCSF que comprende el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG), por medio de la cadena lateral del aminoácido no codificado de manera natural. Esta invención proporciona un método altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas con derivados de PEG, que implica la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos aminoácidos que contienen grupos funcionales o sustituyentes que no se encuentran en los 20 aminoácidos incorporados de manera natural, incluyendo, pero sin limitarse a, un resto cetona, azida o acetileno, en proteínas en respuesta a un codón selector y la posterior modificación de esos aminoácidos con un derivado de PEG reactivo de manera adecuada. Una vez incorporado, las cadenas laterales del aminoácido pueden modificarse entonces utilizando metodologías químicas que los expertos en la técnica saben que son adecuadas para los grupos funcionales o sustituyentes particulares presentes en el aminoácido no codificado de

manera natural. Metodologías químicas conocidas de una amplia variedad son adecuadas para su uso en la presente invención para incorporar un polímero soluble en agua en la proteína. Tales metodologías incluyen, pero no se limitan a, una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen (véanse, por ejemplo, Padwa, A. en *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, págs. 1069-1109; y, Huisgen, R. en *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, págs. 1-176) con, incluyendo, pero sin limitarse a, derivados de acetileno o azida, respectivamente.

Dado que el método de cicloadición [3+2] de Huisgen implica una cicloadición en vez de una reacción de sustitución nucleófila, pueden modificarse proteínas con una selectividad extremadamente alta. Puede llevarse a cabo la reacción 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. Véanse, por ejemplo, Tomoe, *et al.*, (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y, Rostovtsev, *et al.*, (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 2596-2599; y el documento WO 03/101972. Una molécula que puede añadirse a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un grupo funcional o sustituyente adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas pueden añadirse a un aminoácido no natural con un grupo acetileno, incluyendo, pero sin limitarse a, p-propargiloxifenilalanina, o grupo azido, incluyendo, pero sin limitarse a, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

El anillo de cinco miembros que resulta de la cicloadición [3+2] de Huisgen no es generalmente reversible en entornos reductores y es estable frente a la hidrólisis durante periodos prolongados en entornos acuosos. Por consiguiente, las características físicas y químicas de una amplia variedad de sustancias pueden modificarse en condiciones acuosas exigentes con los derivados de PEG activos de la presente invención. De manera incluso más importante, dado que los restos azida y acetileno son específicos el uno

para el otro (y no reaccionan, por ejemplo, con ninguno de los 20 aminoácidos comunes, codificados genéticamente), pueden modificarse proteínas en uno o más sitios específicos con una selectividad extremadamente alta.

5 La invención también proporciona derivados solubles en agua e hidrolíticamente estables de los derivados de PEG y polímeros hidrófilos relacionados que tienen uno o más restos acetileno o azida. Los derivados poliméricos de PEG que contienen restos acetileno son altamente selectivos para el acoplamiento con restos azida que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector. De manera similar, los derivados poliméricos de PEG que contienen restos azida son altamente selectivos para el acoplamiento con restos acetileno que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector.

10 Más específicamente, los restos azida comprenden, pero no se limitan a, alquil-azidas, aril-azidas y derivados de estas azidas. Los derivados de las alquil y aril-azidas pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de acetileno. Los restos 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 azida.

20 La presente invención proporciona conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, con otras sustancias incluyendo, pero sin limitarse a, hidroxialquilalmidón (HAS); hidroxietilalmidón (HES); un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un agente de fotorreticulación; un radionúclido; 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 soluble en agua;

una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radiactivo; un grupo funcional novedoso; un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas; un
5 resto fotoenjaulado; un resto excitable mediante radiación actínica; un resto fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; un resto 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 aminotioácido; un resto tóxico; un resto
10 marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrodenso; un grupo magnético; un grupo de intercalación; 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
15 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 restos azida o acetileno con los derivados poliméricos de PEG que tienen los restos acetileno o azida correspondientes. Por ejemplo, un
20 polímero de PEG que contiene un resto azida puede acoplarse a una molécula biológicamente activa en una posición en la proteína que contiene un aminoácido no codificado genéticamente que lleva una funcionalidad acetileno. La unión mediante la que se acoplan el PEG y la molécula biológicamente activa incluye pero no se limita al producto de la cicloadición
25 [3+2] de Huisgen.

Está bien establecido en la técnica que puede usarse PEG para modificar las superficies de biomateriales (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 6.610.281; Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1): 125-136 (2000) que se incorporan como referencia al presente documento). La
30 invención también incluye biomateriales que comprenden una superficie que tiene uno o más sitios reactivos de azida o acetileno y uno o más de los

polímeros con contienen azida o acetileno de la invención acoplados a la superficie por medio de la unión mediante cicloadición [3+2] de Huisgen. Los biomateriales y otras sustancias también pueden acoplarse a los derivados poliméricos activados por azida o acetileno a través de una unión distinta a la unión azida o acetileno, tal como a través de una unión que comprende un resto ácido carboxílico, amina, alcohol o tiol, para dejar el resto azida o acetileno disponible para posteriores reacciones.

La invención incluye un método 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 puede unirse directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene azida puede prepararse mediante la unión de un agente de unión que tiene el resto azida en un extremo terminal a un polímero activado convencional de modo que el polímero resultante tiene el resto azida en su extremo terminal. En el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, el acetileno puede unirse directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene acetileno puede prepararse mediante la unión de un agente de unión que tiene el resto acetileno en un extremo terminal a un polímero activado convencional de modo que el polímero resultante tiene el resto acetileno en su extremo terminal.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene azida, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo activo experimenta una reacción para producir un polímero sustituido que tiene un resto más reactivo, tal como un grupo saliente mesilato, tresilato, tosilato o halógeno, en el mismo. La preparación y el uso de derivados de PEG que contienen sulfonilo, haluros de ácido, átomos de halógeno y otros grupos salientes los conocen los expertos en la técnica. El polímero sustituido resultante experimenta entonces una reacción para sustituir para el resto más reactivo un resto azida en el extremo terminal del polímero. Alternativamente, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto

nucleófilo o electrófilo activo experimenta una reacción con un agente de unión que tiene una azida en un extremo terminal de modo que se forma un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de unión y el resto azida se sitúa en el extremo terminal del polímero. Restos nucleófilos y electrófilos, incluyendo, aminas, tioles, hidrazidas, hidrazinas, alcoholes, carboxilatos, aldehídos, cetonas, tioésteres y similares, los conocen los expertos en la técnica.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto hidroxilo activo experimenta una reacción para desplazar un halógeno u otro grupo saliente activado de un precursor que contiene un resto acetileno. Alternativamente, un polímero soluble en agua que tiene al menos un resto nucleófilo o electrófilo activo experimenta una reacción con un agente de unión que tiene un acetileno en un extremo terminal de modo que se forma un enlace covalente entre el polímero de PEG y el agente de unión y el resto acetileno se sitúa en el extremo terminal del polímero. El uso de restos de halógeno, grupo saliente activado, restos nucleófilos y electrófilos en el contexto de la síntesis orgánica y la preparación y el uso de derivados de PEG está bien establecido para los profesionales en la técnica.

La invención también proporciona un método para la modificación selectiva de proteínas para añadir otras sustancias a la proteína modificada, incluyendo, pero sin limitarse a, polímeros solubles en agua tales como PEG y derivados de PEG que contienen un resto azida o acetileno. Los derivados de PEG que contienen azida y acetileno pueden usarse para modificar las propiedades de superficies y moléculas en las que son importantes la biocompatibilidad, estabilidad, solubilidad y falta de inmunogenicidad, mientras que al mismo tiempo se proporcionan medios más selectivos de unión de los derivados de PEG a proteínas que se conocían previamente en la técnica.

//. GCSF bovino

Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden usarse para mejorar o prevenir infecciones en animales. Las actividades biológicas así como los ensayos para caracterizar las actividades biológicas de G-CSF bovino y humano los conoce un experto en la técnica. Los ensayos que implican una evaluación del número de neutrófilos y la función de los neutrófilos los conoce un experto en la técnica.

///. Métodos con ácidos nucleicos recombinantes generales para su uso con la invención

En numerosas realizaciones de la presente invención, se aislarán, clonarán y a menudo alterarán ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido bG-CSF de interés usando métodos recombinantes. Se usan tales realizaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, para la expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión, u otras secuencias derivadas de un polipéptido bG-CSF. En algunas realizaciones, las secuencias que codifican para los polipéptidos de la invención están operativamente unidas a un promotor heterólogo. El aislamiento de hG-CSF y la producción de G-CSF en células huésped se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 4.810.643; 4.999.291; 5.580.755; y 6.716.606, que se incorporan como referencia al presente documento.

Una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural puede sintetizarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido original, incluyendo, pero sin limitarse a, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, 2 y luego cambiando la secuencia de nucleótidos de modo que se efectúe la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o eliminación (es decir, delección o sustitución) del/de los residuo(s) de aminoácido relevante(s). La secuencia de nucleótidos puede modificarse convenientemente mediante mutagénesis dirigida al sitio según métodos convencionales. Alternativamente, la

secuencia de nucleótidos puede prepararse mediante síntesis química, incluyendo, pero sin limitarse a, mediante el uso de un sintetizador de oligonucleótidos, en el que se diseñan oligonucleótidos basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado, y preferiblemente seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios pequeños oligonucleótidos que codifican para partes del polipéptido deseado y ensamblarse mediante reacción en cadena de ligamiento o ligamiento mediante PCR_s. Véanse, por ejemplo, Barany, *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); la patente estadounidense 6.521.427 que se incorporan como referencia al presente documento.

Esta invención utiliza técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Textos básicos que dan a conocer los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 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 *et al.*, Molecular Cloning – A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una edición conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementada en 1999) ("Ausubel")). Estos textos describen mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados con, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 pares de los mismos.

Se usan diversos tipos de mutagénesis en la invención para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitarse a, producir sintetasas o ARNt novedosos, mutar moléculas de ARNt, mutar polinucleótidos que codifican para sintetasas, producir bibliotecas de ARNt, producir bibliotecas de sintetasas, producir codones selectores, insertar codones selectores que codifican para aminoácidos no naturales en una proteína o un polipéptido de interés. Incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio, puntual al azar, recombinación homóloga, intercambio de ADN u otros métodos de mutagénesis recursivos, construcción quimérica, mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato, mutagénesis usando ADN dúplex discontinuo o similares, mutagénesis mediada por PCT, o cualquier combinación de los mismos. Los métodos adecuados adicionales incluyen reparación de un apareamiento erróneo puntual, mutagénesis usando cepas huésped deficientes en la reparación, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis de delección, mutagénesis mediante síntesis génica total, reparación de rotura de doble cadena, y similares. También están incluidas las mutagénesis, incluyendo, pero sin limitarse a, que implican constructos quiméricos, en la presente invención. En una realización, la mutagénesis puede estar guiada por información conocida de la molécula que se produce de manera natural o la molécula que se produce de manera natural alterada o mutada, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, estructura cristalina o similares.

Los textos y ejemplos que se encuentran en el presente documento describen estos procedimientos. Se encuentra información adicional en las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas: Ling *et al.*, Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale *et al.*, Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol Biol*, 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein &

- Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229: 1193-1201 (1985); Carter, Site-directed Mutagenesis, *Biochem J.* 237:1-7 (1986); Kimkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, en *Nucleic Acids & 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. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel *et al.*, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass *et al.*, Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using MIS-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Tailor *et al.*, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Tailor *et al.*, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers *et al.*, 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers *et al.*, Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer *et al.*, The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of

mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer *et al.*, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz *et al.*, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer *et al.*, Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Cartel *et al.*, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13 : 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells *et al.*, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar *et al.*, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells *et al.*, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations in defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundstrom *et al.*, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, *et al.*, *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); y, I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995). Pueden encontrarse detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores en *Methods in Enzymology Volumen 154*, que también

describe controles útiles para resolver los problemas de diversos métodos de mutagénesis.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en mutagénesis de la presente invención, por ejemplo, que mutan bibliotecas de sintetasas, o alteran ARNt, normalmente se sintetizan químicamente según el método 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 se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984).

La invención también se refiere a células huésped eucariotas, células huésped no eucariotas, y organismos para la incorporación *in vivo* de un aminoácido no natural por medio de pares de ARNt/RS ortogonales. Las células huésped se modifican mediante ingeniería genética (incluyendo, pero sin limitarse a, transformar, transducir o transfectar) con los polinucleótidos de la invención o constructos que incluyen un polinucleótido de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 que va a derivatizarse 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 cósmido, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en células y/o microorganismos mediante métodos habituales incluyendo electroporación (Fromm *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)), infección mediante vectores virales, penetración balística de alta velocidad mediante pequeñas partículas con el ácido nucleico o bien dentro de la matriz de pequeñas perlas o partículas, o bien en la superficie (Klein *et al.*, Nature 327, 70-73 (1987)), y/o similares. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico a células *in vitro* incluyen el uso de liposomas, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el

método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia génica *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, transfección con vectores virales (normalmente retrovirales) y transfección mediada por liposoma-proteína de la envuelta viral [Dzau *et al* , Trends in Biotechnology 11: 205-210 (1993)]. En algunas situaciones puede ser deseable dotar la fuente de ácido nucleico de un agente que selecciona como diana las células diana, tal como un anticuerpo específico para 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, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis para seleccionar como diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas típicos para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en ciclos, proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la salud-vida intracelular

Las células huésped modificadas mediante ingeniería genética pueden cultivarse en medios de nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para actividades tales como, por ejemplo, etapas de examen, activación de promotores o selección de transformantes. Estas células pueden cultivarse opcionalmente en organismos transgénicos. Otras referencias útiles, incluyendo, pero sin limitarse a, para aislamiento y cultivo celular (por ejemplo, para posterior aislamiento de ácidos nucleicos) incluyen Freshney (1994) *Cultivation of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en ese documento, Payne *et al* (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY, Gamborg y Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Beilm Heidelberg New York) y Atlas y Paiks (eds). *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Están disponibles varios métodos bien conocidos de introducción de ácidos nucleicos diana en células, cualquiera de los cuales puede usarse en la invención. Éstos incluyen fusión de las células del receptor con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo con proyectiles e infección con vectores virales (tratados adicionalmente, a continuación), etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen constructos de ADN de esta invención. Se hacen crecer las bacterias hasta fase logarítmica y pueden aislarse los plásmidos dentro de las bacterias mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, están disponibles comercialmente kits para la purificación de plásmidos a partir de bacterias, (véanse, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene, y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan adicionalmente para producir otros plásmidos, se usan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción, y promotores útiles para regulación de la expresión del ácido nucleico diana 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 ambos, (incluyendo, pero sin limitarse a, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas, o ambos. Véanse, Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, *et al*, *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., *et al*, *Protein Expr. Purif.* 6(1): 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (todos citados anteriormente). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para la clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, *The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage* (1992) Gherna *et al.* (eds) publicado por la ATCC. También

se encuentran procedimientos básicos adicionales para la secuenciación, clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes en Watson *et al* (1992) Recombinant DNA segunda edición Scientific American Books, NY. Además, esencialmente cualquier

5 ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, ya sea convencional o no convencional) puede encargarse de manera convencional o personalizada a cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX disponible en la World Wide Web en mcr.com), The Great American Gene Company

10 (Ramona, CA disponible en la World Wide Web en genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL disponible en la World Wide Web en expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras.

CODONES SELECTORES

15 Los codones selectores de la invención expanden el armazón de codones genético de la maquinaria de biosíntesis de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, pero no se limita a, un codón de tres bases único, un codón sin sentido, tal como un codón de terminación, incluyendo, pero sin limitarse a, un codón ámbar (UAG), un codón ocre, o un codón ópalo

20 (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro bases o más, un codón raro, o similares. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que pueden introducirse en un gen o polinucleótido deseado, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más

25 en un polinucleótido individual que codifica para al menos una parte del polipéptido bG-CSF.

En una realización, los métodos implican el uso de un codón selector que es un codón de terminación para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales *in vivo*. Por ejemplo, se produce un O-ARNt que

30 reconoce el codón de terminación, incluyendo, pero sin limitarse a, UAG, y se aminoacila mediante una ORS con un aminoácido no natural deseado.

Este O-ARNt no lo reconocen las aminoacil-ARNt sintetasas del huésped que se producen de manera natural. Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio convencional para introducir el codón de terminación, incluyendo, pero sin limitarse a, TAG, en el sitio de interés en un polipéptido de interés. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., *et al.* (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 16:791-802. Cuando la O-RS, el O-ARNt y el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de interés se combinan *in vivo*, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para dar un polipéptido que contiene el aminoácido no natural en la posición especificada.

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

Los aminoácidos no naturales también pueden codificarse 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 *et al.*, *Biochemistry*. 32:7939 (1993). En este caso, el ARNt sintético compite con la Arg de ARNt que se produce de manera natural, que existe como una especie minoritaria en *Escherichia coli*. Algunos organismos no usan todos los codones triplete. Se ha utilizado un codón AGA no asignado en *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).

Pueden generarse componentes de la presente invención para usar estos codones raros *in vivo*.

Los codones selectores también comprenden codones extendidos, incluyendo, pero sin limitarse a, codones de cuatro bases o más, tales como, 5 codones de cuatro, cinco, seis o más bases. Los ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, pero no se limitan a, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Los ejemplos de codones de cinco bases incluyen, pero no se limitan a, AGGAC, CCCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC y similares. Una característica de la invención incluye usar codones extendidos basados 10 en la supresión del desplazamiento del marco de lectura. Codones de cuatro bases o más pueden insertar, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o múltiples aminoácidos no naturales en la misma proteína. Por ejemplo, en presencia de O-ARNt mutados, incluyendo, pero sin limitarse a, un ARNt supresor del desplazamiento del marco de lectura especial, con bucles anticodón, por ejemplo, con bucles anticodón de al menos 8-10 nt, el codón 15 de cuatro bases o más se lee como aminoácido individual. En otras realizaciones, los bucles anticodón pueden decodificar, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos un codón de cuatro bases, al menos un codón de cinco bases, o al menos un codón de seis bases o más. Puesto que existen 256 20 codones de cuatro bases posibles, pueden codificarse múltiples aminoácidos no naturales en la misma célula usando un codón de cuatro bases o más. Véase, Anderson *et al.*, (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769.

Por ejemplo, se han usado codones de cuatro bases para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas usando métodos biosintéticos *in vitro*. Véanse, por ejemplo, Ma *et al.*, (1993) Biochemistry, 32:7939; y 30 Hohsaka *et al.*, (1999) J. Am. Chem. Soc, 121:34. CGGG y AGGU se usaron para incorporar simultáneamente 2-naftilalanina y un derivado de NBD de

lisina en estreptavidina *in vitro* con dos ARNt supresores del desplazamiento del marco de lectura acilados químicamente. Véase, por ejemplo, Hohsaka *et al.*, (1999) J. Am. Chem. Soc, 121 :12194. En un estudio *in vivo*, Moore *et al.* examinaron la capacidad de derivados de ARNtLeu con anticodones NCUA para suprimir codones UAGN (N puede ser U, A, G o C), y encontraron que el cuádruple UAGA puede decodificarse mediante un ARNtLeu con un anticodón UCUA con una eficacia del 13 al 26% con poca decodificación en el marco 0 ó -1. Véase, Moore *et al.*, (2000) J. Mol. Biol., 298: 195. En una realización, pueden usarse codones extendidos basados en codones raros o codones sin sentido en la presente invención, que pueden reducir la lectura en sentido erróneo y la supresión del desplazamiento del marco 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 los que el sistema endógeno no usa (o usa rara vez) el codón de bases natural. Por ejemplo, esto incluye un sistema que carece de un ARNt que reconoce el codón de tres bases natural, 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 adicionalmente el alfabeto genético existente. Un par de bases extra aumenta el número de codones triplete de 64 a 125. Las propiedades de los terceros pares de bases incluyen apareamiento de bases estable y selectivo, incorporación enzimática eficaz en ADN con alta fidelidad mediante una polimerasa, y la extensión por cebadores continuada eficaz tras la síntesis del par de bases no natural naciente. Las descripciones de pares de bases no naturales que pueden adaptarse para los métodos y las composiciones incluyen, por ejemplo, Hirao, *et al.*, (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology. 20: 177-182. Véase, también, Wu, Y., *et al.*, (2002) L Am. Chem. Soc. 124:14626-14630. A continuación se indican otras publicaciones relevantes.

Para la utilización *in vivo*, el nucleósido no natural es permeable en membrana y se fosforila para formar el trifosfato correspondiente. Además, la información genética aumentada es estable y no se destruye por enzimas celulares. Los esfuerzos previos de Benner y otros se aprovechaban de patrones de puentes de hidrógeno que son diferentes de los que se encuentran en pares de Watson-Crick canónicos, cuyo ejemplo más notable es el par iso-C:iso-G. Véanse, por ejemplo, Switzer *et al.*, (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:8322; y Piccirilli *et al.*, (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602. Estas bases en general se aparean erróneamente en cierto grado con bases naturales y no pueden replicarse enzimáticamente. Kool y colaboradores demostraron que las interacciones de empaquetamiento hidrófobas entre bases pueden sustituir los puentes 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 natural que satisficiera todos los requisitos anteriores, Schultz, Romesberg y colaboradores han sintetizado sistemáticamente y estudiado una serie de bases hidrófobas no naturales. Se encuentra que un autopar PICS:PICS es más estable que los pares de bases naturales, y puede incorporarse eficazmente en ADN mediante el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (KF). Véanse, por ejemplo, McMinn *et al.*, (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6; y Ogawa *et al.*, (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274. Puede sintetizarse un auto par 3MN:3MN mediante KF con eficacia y selectividad suficientes para la función biológica. Véase, por ejemplo, Ogawa *et al.*, (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803. Sin embargo, ambas bases actúan como un terminador de cadena para la replicación adicional. Recientemente se ha desarrollado una ADN polimerasa mutante que puede usarse para replicar el autopar de PICS. Además, puede replicarse un autopar de 7AI. Véase, por ejemplo, Tae *et al.*, (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439. También se ha desarrollado un par de metalobases novedoso, Dipic:Py, que forma un par estable con la unión de Cu(II). Véase,

Meggers *et al.*, (2000) J. Am. Chem. Soc, 122:10714. Dado que los codones extendidos y los codones no naturales son intrínsecamente ortogonales a los codones naturales, los métodos de la invención pueden aprovecharse de esta propiedad para generar ARNt ortogonales para los mismos.

5 También puede usarse un sistema para sortear la traducción para incorporar un aminoácido no natural en un polipéptido deseado. En un sistema para sortear la traducción, se incorpora una secuencia grande en un gen pero no se traduce en proteína. La secuencia contiene una estructura que sirve como impulso para inducir que el ribosoma se salte la secuencia y reanude la traducción en sentido corriente abajo de la inserción.

10 En determinadas realizaciones, la proteína o el polipéptido de interés (o parte de los mismos) en los métodos y/o las composiciones de la invención se codifica por un ácido nucleico. Normalmente, el ácido nucleico comprende al menos un codón selector, al menos dos codones selectores, al menos tres codones selectores, al menos cuatro codones selectores, al menos cinco codones selectores, al menos seis codones selectores, al menos siete codones selectores, al menos ocho codones selectores, al menos nueve codones selectores, diez o más codones selectores.

15 Los genes que codifican para proteínas o polipéptidos de interés pueden mutagenizarse usando métodos conocidos por un experto en la técnica 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 que incluya uno o más codones selectores, proporcionando la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales. La invención incluye cualquier variante de este tipo, incluyendo, pero sin limitarse a, mutantes, versiones de cualquier proteína, por ejemplo, que incluyen al menos un aminoácido no natural. De manera similar, la invención también incluye los ácidos nucleicos correspondientes, es decir, cualquier ácido nucleico con 20 uno o más codones selectores que codifica para uno o más aminoácidos no naturales.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para 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 solubles en agua, proteínas, o una amplia variedad de otras moléculas, en una proteína de interés. Los métodos adecuados para la incorporación de cisteína en una posición deseada de un polipéptido los conocen los expertos en la técnica, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 6.608.183, que se incorpora como referencia al presente documento, y técnicas de mutagénesis convencionales.

IV. Aminoácidos no codificados de manera natural

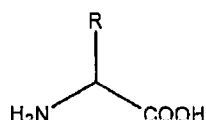
Una muy amplia variedad de aminoácidos no codificados de manera natural son adecuados para su uso en la presente invención. Cualquier número de aminoácidos no codificados de manera natural pueden introducirse en un polipéptido bG-CSF. En general, los aminoácidos no codificados de manera natural introducidos son sustancialmente inertes químicamente frente a los 20 aminoácidos comunes, codificados genéticamente (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 manera natural incluyen grupos funcionales de cadena lateral que reaccionan eficaz y selectivamente con grupos funcionales que no se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitarse a, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxilo) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido bG-CSF que incluye un aminoácido no codificado de manera natural que contiene un grupo funcional azido puede hacerse reaccionar con un polímero (incluyendo, pero sin limitarse a, poli(etilenglicol)) o, alternativamente, un segundo polipéptido que contiene un resto de alquino para formar un conjugado estable que resulta para la

reacción selectiva de los grupos funcionales azida y alquino para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen.

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

5

I



10

15

20

25

30

Un aminoácido no codificado de manera natural es normalmente cualquier estructura que tiene la fórmula indicada 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. Dado que los aminoácidos no codificados de manera natural de la invención normalmente difieren de los aminoácidos naturales sólo en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos no codificados de manera natural forman enlaces amida con otros aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, codificados de manera natural o no codificados de manera natural, de la misma manera en que se forman en polipéptidos que se producen de manera natural. Sin embargo, los aminoácidos no codificados de manera natural tienen grupos de cadena lateral que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, o similares o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos que no se producen de manera natural de interés que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden un agente de reticulación fotoactivable, aminoácidos con marcador de espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que se unen a metales, aminoácidos que

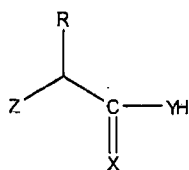
5 contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con grupos
 funcionales novedosos, aminoácidos que interaccionan de forma covalente o
 no covalente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o
 fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de
 10 biotina, aminoácidos 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,
 aminoácidos escindibles químicamente y/o fotoescindibles, aminoácidos con
 15 una cadena lateral alargada en comparación con los aminoácidos naturales,
 incluyendo, pero sin limitarse a, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga,
 incluyendo, pero sin limitarse a, más de aproximadamente 5 o más de
 aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar unidos a
 carbono, aminoácidos activos redox, aminoácidos que contiene
 20 aminotioácido, y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

Los aminoácidos no codificados de manera natural a modo de
 ejemplo que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención y
 que son útiles para reacciones con polímeros solubles en agua incluyen,
 pero no se limitan a, aquellos con grupos reactivos carbonilo, aminooxilo,
 20 hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas
 realizaciones, los aminoácidos no codificados de manera natural
 comprenden un resto de sacárido. Los ejemplos de tales 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-
 25 manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen
 ejemplos en los que la unión a N u O que se produce de manera natural
 entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por una unión covalente que
 no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitarse
 a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de
 30 tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran

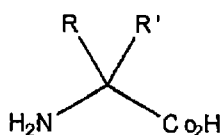
comúnmente en proteínas que se producen de manera natural tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

Muchos de los aminoácidos no codificados de manera natural proporcionados en el presente documento están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), o Peptech (Burlington, MA, EE.UU.). Los que no están disponibles comercialmente se sintetizan opcionalmente tal como se proporciona en el presente documento o usando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica. Para las técnicas de síntesis orgánica, véanse, 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 estadounidenses n.ºs 7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan como referencia al presente documento. Además de los aminoácidos no naturales que contienen cadenas laterales novedosas, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras principales modificadas, incluyendo, pero sin limitarse a, según se ilustra mediante las estructuras de fórmula II y III:

II



III



en las que Z comprende normalmente OH, NH₂, 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, se seleccionan normalmente de la misma lista de constituyentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención comprenden opcionalmente sustituciones en el grupo amino o carboxilo según se ilustra mediante las fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero no se limitan a, α -hidroxiácidos, α -tioácidos, α -aminotiocarboxilatos, incluyendo, pero sin limitarse a, con cadenas laterales correspondientes a los veinte aminoácidos naturales comunes o cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono α incluyen opcionalmente, pero no se limitan a, aminoácidos L, D, o α - α -disustituídos 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 anillos de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, α y α -aminoácidos tales como α -alanina sustituida y ácido α -aminobutírico.

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 no se limitan a, tirosinas para-sustituídas, tirosinas orto-sustituídas y tirosinas meta-sustituídas, en las que la tirosina sustituida comprende, incluyendo, pero sin limitarse a, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitarse a, un grupo acetilo), un grupo benzóilo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxilo, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo C₆-C₂₀ de cadena lineal o ramificado, un hidrocarburo saturado o insaturado, un grupo O-metilo, un grupo polióter, un grupo nitro, un grupo alquinilo o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo sustituídos de forma múltiple. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la

presente invención incluyen, pero no se limitan a, α -hidroxiderivados, derivados α -sustituidos, derivados cíclicos, y derivados de glutamina sustituidos con amida. Los análogos de fenilalanina a modo de ejemplo que

5 pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fenilalaninas para-sustituidas, fenilalaninas orto-sustituidas y fenilalaninas meta-sustituidas, en las que el sustituyente comprende, incluyendo, pero sin limitarse a, un grupo hidroxilo, un grupo metoxilo, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un

10 grupo ceto (incluyendo, pero sin limitarse a, un grupo acetilo), un benzoilo, un grupo alquililo, o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, una p-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc α -serina, una L-

15 Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina y una p-propargiloxi-fenilalanina, y similares. Se proporcionan

20 ejemplos de estructuras de una variedad de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención en, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of non-natural amino acids". Véase también Kiick *et al.*, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the

25 Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, que se incorpora como referencia al presente documento, 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", que se incorpora como referencia al presente documento, describe la

30 alquilación reductora de restos de aminas aromáticas, incluyendo, pero sin limitarse a, p-amino-fenilalanina y aminación reductora.

En una realización, se proporcionan composiciones de un polipéptido bG-CSF que incluye un aminoácido no natural (tal como p-(propargiloxy)-fenilalanina). También se proporcionan diversas composiciones que comprenden p-(propargiloxy)-fenilalanina e, incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas y/o células. En un aspecto, una composición que incluye el aminoácido no natural p-(propargiloxy)-fenilalanina, incluye además un ARNt ortogonal. El aminoácido no natural puede unirse (incluyendo, pero sin limitarse a, de forma covalente) al ARNt ortogonal, incluyendo, pero sin limitarse a, unirse de forma covalente al ARNt ortogonal a través de un enlace amino-acilo, unirse de forma covalente a un 3'OH o un 2'OH de un azúcar de ribosa terminal del ARNt ortogonal, etc.

Los restos químicos por medio de aminoácidos no naturales que pueden incorporarse en 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 varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vitro* e *in vivo*. Un aminoácido no natural con átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para datos estructurales de rayos X sobre fases. La introducción específica del sitio de átomos pesados usando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluyendo, pero sin limitarse a, fenilazida)), por ejemplo, permiten una fotorreticulación eficaz *in vivo* e *in vitro* de proteínas. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero no se limitan a, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede reticularse entonces según se desee mediante excitación del grupo fotorreactivo, proporcionando un control temporal. En un ejemplo, el grupo metilo de un amino no natural puede sustituirse con un, incluyendo, pero sin limitarse a, grupo metilo marcado isotópicamente, como sonda de la dinámica y estructura local,

incluyendo, pero sin limitarse a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional. Grupos funcionales alquínico o azido, por ejemplo, permiten la modificación selectiva de proteínas con moléculas a través de una reacción de cicloadición [3+2].

5 Un aminoácido no natural incorporado en un polipéptido en el extremo amino terminal puede componerse de un grupo R que es cualquier sustituyente distinto de uno usado en los veinte aminoácidos naturales y un 2º grupo reactivo diferente del grupo NH₂ presente normalmente en α-aminoácidos (véase la fórmula I). Un aminoácido no natural similar puede
10 incorporarse en el extremo carboxilo terminal con un 2º grupo reactivo diferente del grupo COOH presente normalmente 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
15 veinte aminoácidos naturales. Por ejemplo, el aminoácido no natural puede diseñarse o seleccionarse opcionalmente para modificar las propiedades biológicas de una proteína, por ejemplo, en la que se incorporan. Por ejemplo, pueden modificarse opcionalmente las siguientes propiedades mediante la inclusión de un aminoácido no natural en una proteína:
20 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 para reaccionar
25 con otras moléculas, por ejemplo, de forma covalente o no covalente, y similares.

ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES:
GRUPOS CARBONILO, SIMILARES A CARBONILO, CARBONILO
30 ENMASCARADO, CARBONILO PROTEGIDOS Y GRUPOS HIDROXILAMINA

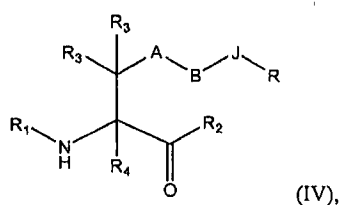
En algunas realizaciones la presente invención proporciona bG-CSF unido a un polímero soluble en agua, por ejemplo, un PEG, mediante un enlace oxima.

5 Muchos tipos de aminoácidos no codificados de manera natural son adecuados para la formación de enlaces oxima. Éstos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no codificados de manera natural que contienen un grupo carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Tales aminoácidos se describen en las publicaciones de patente estadounidense n.º 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y el documento WO 2006/069246 titulado
10 "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", que se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad. También se describen aminoácidos no codificados de manera natural en la patente estadounidense n.º 7.083.970 y la patente estadounidense n.º 7.045.337, que se incorporan como referencia
15 al presente documento en su totalidad.

Algunas realizaciones de la invención utilizan polipéptidos bG-CSF que se sustituyen en una o más posiciones con un aminoácido de para-acetilfenilalanina. La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z₁, *et al.*, Biochemistry 42: 6735-6746
20 (2003), incorporado como referencia. Otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo puede prepararlos de manera similar un experto en la técnica. Además, se presentan síntesis a modo de ejemplo no limitativo de aminoácidos no naturales que están incluidos en el presente documento en las figuras 4, 24-34 y 36-39 de la patente estadounidense n.º 7.083.970, que
25 se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad.

Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten una variedad de reacciones para unir moléculas por medio de reacciones de adición nucleófila entre otros. Tales grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo), un grupo
30 similar a carbonilo (que tiene reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) y es estructuralmente

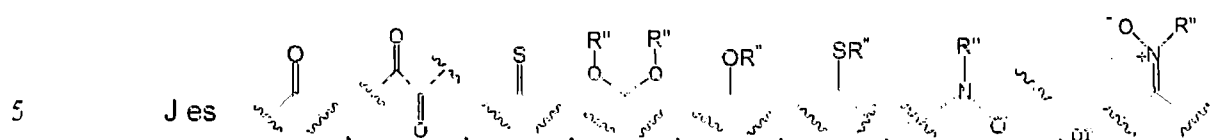
similar a un grupo carbonilo), un grupo carbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo)), o un grupo carbonilo protegido (que tiene reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) tras su desprotección). Tales aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (IV):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k, en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N-, y -C(R')₂-

$N(R')-N(R')-$, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;



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

R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

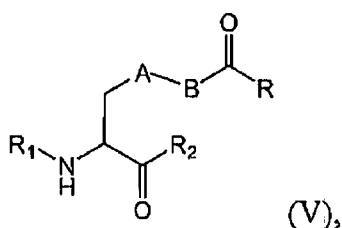
15 cada uno de R_3 y R_4 es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R_3 y R_4 o dos grupos R_3 forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

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;

20 o el grupo $-J-R$ forma en conjunto 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;

25 con la condición de que cuando A es fenileno y cada R_3 es H, B está presente; y que cuando A es $-(CH_2)_4-$ y cada R_3 es H, B no es $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y que cuando A y B están ausentes y cada R_3 es H, R no es metilo.

Además, están incluidos los que tienen la estructura de fórmula (V):



en la que:

10 A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR' - (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO- (alquileo o alquileo 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-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

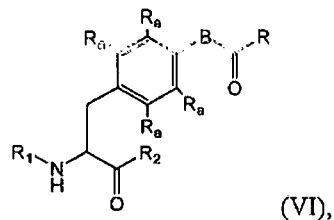
R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

5 con la condición de que cuando A es fenileno, B está presente; y que cuando A es $-(CH_2)_4-$, B no es $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y que cuando A y B están ausentes, R no es metilo.

Además, están incluidos aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (VI):

10



15

en la que:

B es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquilen inferior, alquilen inferior sustituido, alquilen inferior, alquilen inferior sustituido, heteroalquilen inferior, heteroalquilen inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

30

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

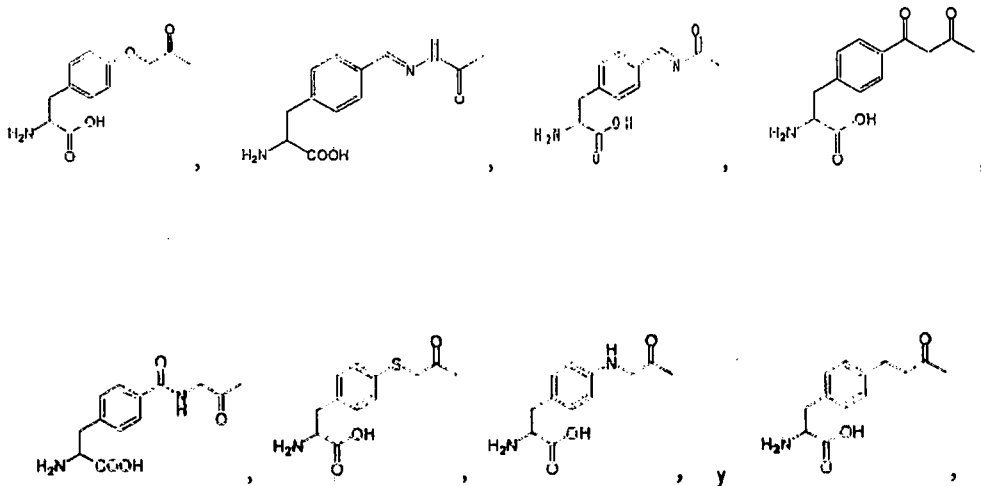
R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

5 cada R_3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en el que k es 1, 2 ó 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ y $-S(O)_kR'$, en los que cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

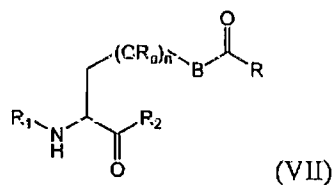
Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:

10



en los que tales compuestos son opcionalmente grupo protegido en el amino, protegido en el carboxilo o una sal de los mismos. Además, puede incorporarse cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales en un polipéptido con aminoácidos no naturales.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (VII):



en la que

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquilen inferior, alquilen inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquilen inferior, heteroalquilen inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

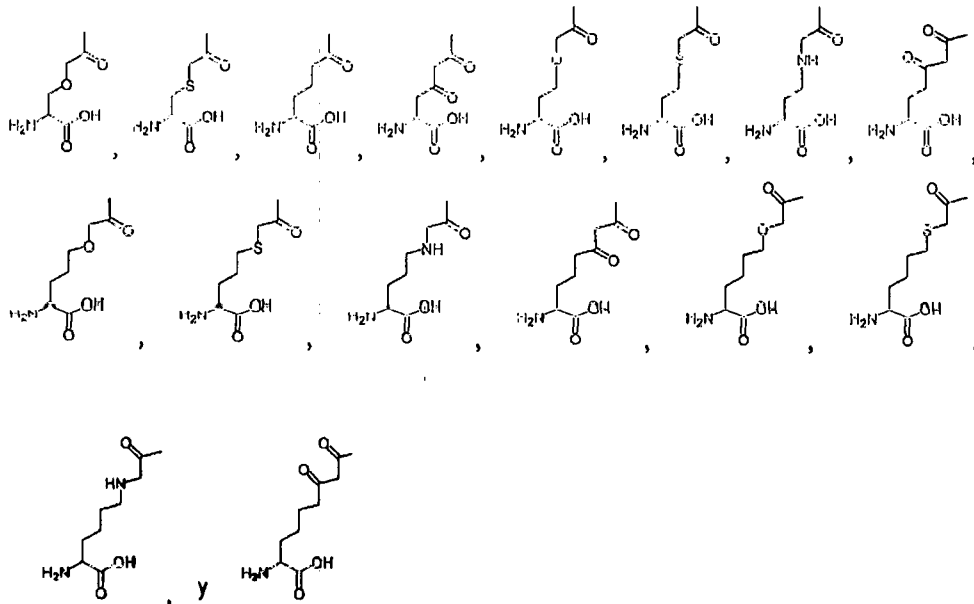
R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

cada R_3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en el que k es 1, 2 ó 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, y $-S(O)_kR'$, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es de 0 a 8;

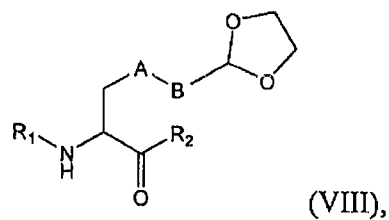
con la condición de que cuando A es $-(CH_2)_4-$, B no es $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:



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

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (VIII):



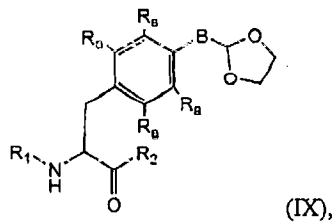
en la que A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k X- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (IX):



B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquilenilo inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

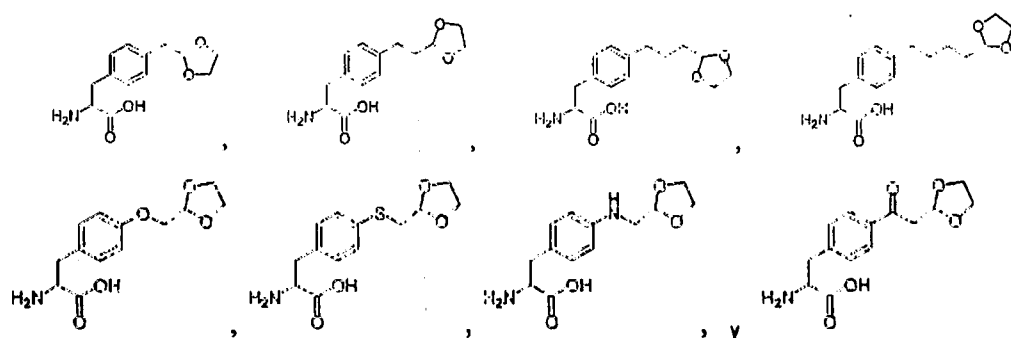
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

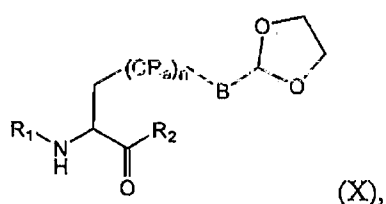
en los que cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:



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

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (X):



en la que B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

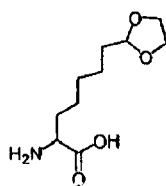
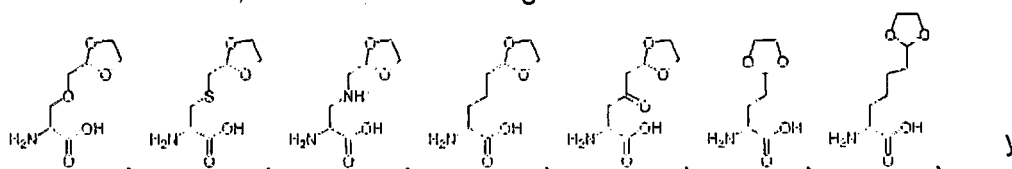
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

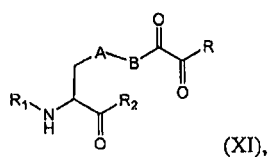
5 Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:



en los que tales compuestos están opcionalmente protegidos en el amino, opcionalmente protegidos en el carboxilo, opcionalmente protegidos en el amino y protegidos en el carboxilo, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquier de los siguientes aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un polipéptido con aminoácidos no naturales.

Además de estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden incluir grupos tales como grupos dicarbonilo, similar a dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y dicarbonilo protegido.

Por ejemplo, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XI):



en la que A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior

sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

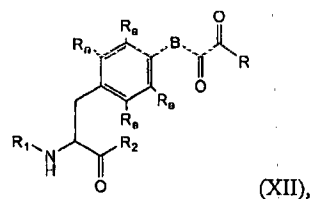
B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N((R'))-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XII):



B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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(RO-), -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')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

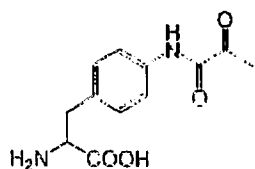
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

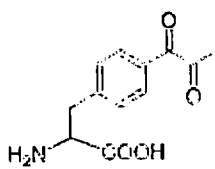
R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

en los que cada R₈ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:



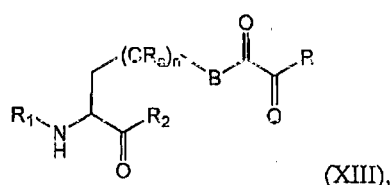
y



...os que tales compuestos están opcionalmente protegidos en el amino, opcionalmente protegidos en el carboxilo, opcionalmente protegidos en el amino y protegidos en el carboxilo, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales

y cualquier de los siguientes aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un polipéptido con aminoácidos no naturales.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XIII):



en la que B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquilen inferior, alquilen inferior sustituido, alquilen inferior, alquilen inferior sustituido, heteroalquilen inferior, heteroalquilen inferior sustituido, -O-, -O-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S-, -S-(alquilen o alquilen sustituido)-, -S(O)_k- en el que k es 1, 2 ó 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')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

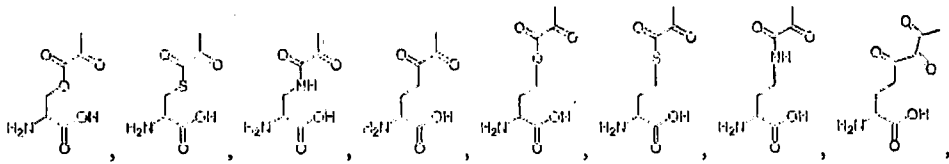
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

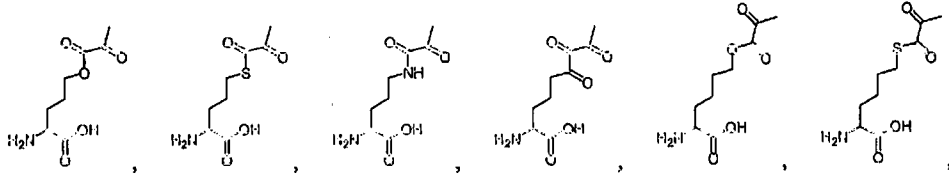
R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido, o polinucleótido;

cada R₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-C(O)_kR' en el que k es 1, 2 ó 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', en los que cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es de 0 a 8.

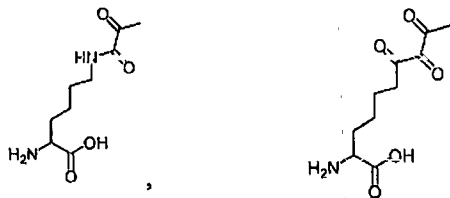
Además, están incluidos los siguientes aminoácidos:



5



10



y

, en los que tales compuestos están

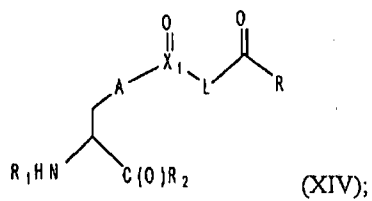
15

opcionalmente protegidos en el amino, opcionalmente protegidos en el carboxilo, opcionalmente protegidos en el amino y protegidos en el carboxilo, o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquier de los siguientes aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un polipéptido con aminoácidos no naturales.

20

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XIV):

25



en la que:

30

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno,

heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

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

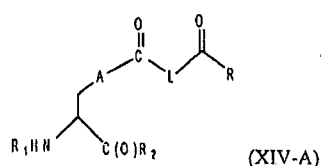
R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

10 Xi es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XIV-A):

15



20

en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

25

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

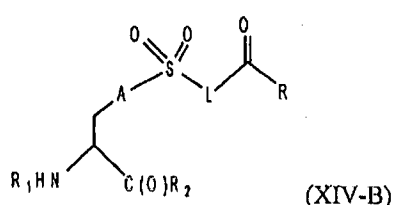
30

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XIV-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

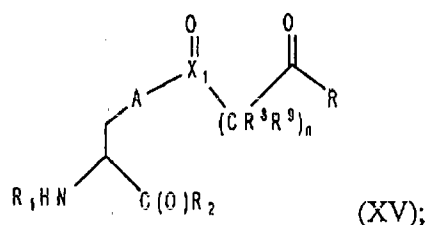
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XV):



en la que;

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

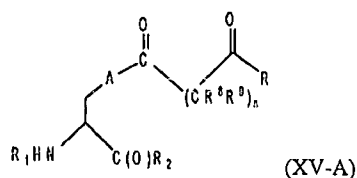
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

Xi es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcóxido, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera con los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XV-A):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

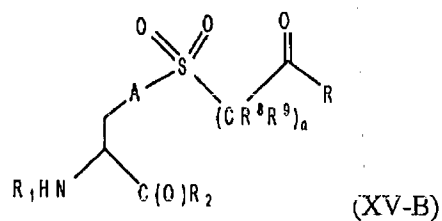
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxilo, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera con los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XV-B):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno,

heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

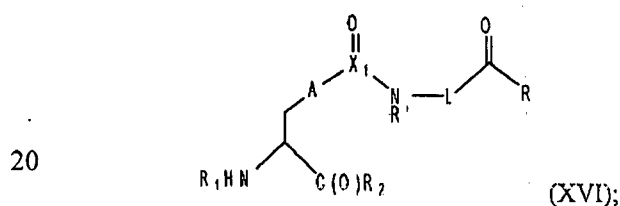
5 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

10 n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxilo, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera con grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

15 Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XVI);



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

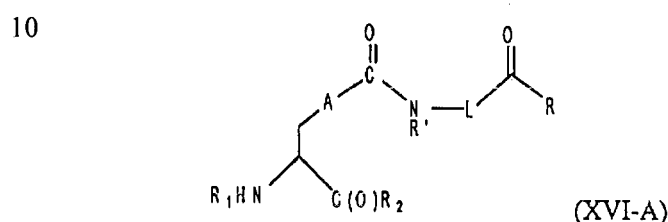
30 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

5 Xi es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XVI-A):



15

en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

20

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

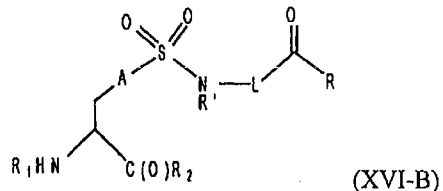
25 R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

30

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XVI-B):



en la que:

10 A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

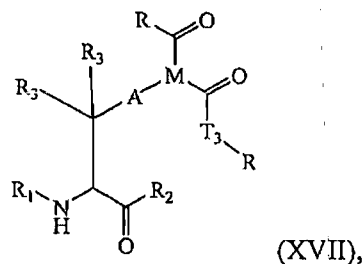
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

20 R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

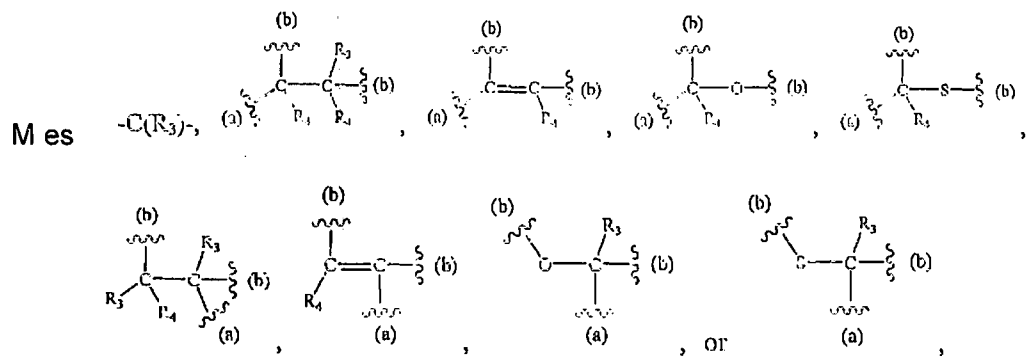
L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), en los que R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

25 Además, están incluidos aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XVII):



en la que:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;



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

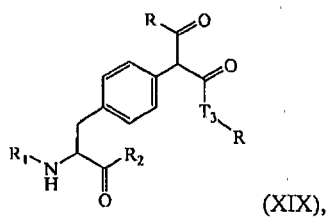
T_3 es un enlace, $C(R)(R)$, O, o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

cada R_3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en el que k es 1, 2 ó 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, y $-S(O)_kR'$, en los que cada R' es independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido.

Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XIX):

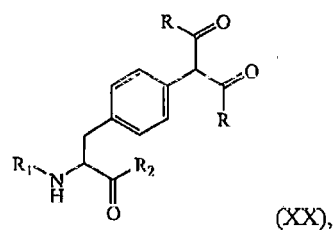


en la que:

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

T_3 es O o S.

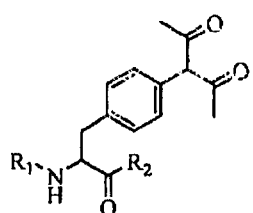
Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de fórmula (XX):



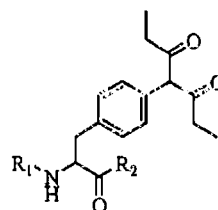
en la que: R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido.

Además, están incluidos los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de fórmula (XXI):

5



y



10

15

20

En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo reactivo. Por ejemplo, puede generarse una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, puede usarse una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o puede exponerse por medio de digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suaves usando peryodato. Véanse, por ejemplo, Gaertner, *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo N-terminal del péptido o la proteína.

25

30

En la presente invención, un aminoácido no natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina lleva un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído implican normalmente la adición de un exceso molar de metaperyodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es normalmente de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar de aproximadamente 1,5 de

metaperyodato de sodio a una disolución tamponada del polipéptido, seguido por incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo la patente estadounidense n.º 6.423.685. La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones suaves en disolución acuosa para formar la unión oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véanse, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tarn, 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 las otras cadenas laterales de aminoácido. Véanse, por ejemplo, Cornish, V. W., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem, 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al.*, Science 276:1125-1128 (1997).

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

La solicitud provisional de patente estadounidense n.º 60/638.418 se incorpora como referencia en su totalidad. Por tanto, las descripciones proporcionadas en la Sección V (titulada "Aminoácidos no naturales"), Parte B (titulada: "Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina"), en la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 60/638.418 se aplican completamente a los métodos, las composiciones (incluyendo las fórmulas I-XXXV), técnicas y estrategias para preparar, purificar, caracterizar y usar aminoácidos no naturales, polipéptidos con aminoácidos no naturales y polipéptidos con aminoácidos no naturales modificados descritos en el presente documento en la misma medida que si tales descripciones se presentaran totalmente en el presente documento. Las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y el documento WO 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses

of non-natural amino acids and polypeptides", también se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.

SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

5 Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente invención están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma (EE.UU.) o Aldrich (Milwaukee, WI, EE.UU.). Los que no están disponibles comercialmente se sintetizan opcionalmente tal como se proporciona en el presente documento o según se proporciona en diversas

10 publicaciones o usando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica. Para las técnicas de síntesis orgánica, véanse, 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

15 de Carey y Sundberg (tercera edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). 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 *et al.*, (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd,

20 D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of α -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. *et al.* (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of

25 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org.

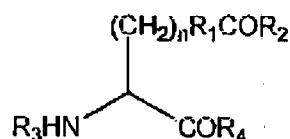
30 Chem, 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pípecolates from L-Asparagine. Application to the Total

Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. QFR. Chem. 50:1239-1246; Barton *et al.*, (1987) Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; y, Subasinghe *et al.*, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity in a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem, 35:4602-7. Véase también, la publicación de patente estadounidense n.º US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays", que se incorpora como referencia al presente documento.

A. Grupos reactivos carbonilo

Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten una variedad de reacciones para unir moléculas (incluyendo, pero sin limitarse a, PEG u otras moléculas solubles en agua) por medio de reacciones de adición nucleófila o de condensación aldólica entre otros.

Los aminoácidos que contienen carbonilo a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



en la que n es de 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y el

resto de cetona se sitúa en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo.

En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo y R_2 es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y el resto de cetona se sitúa en la posición meta con respecto a la cadena lateral de alquilo.

La síntesis de α -acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., *et al.*, Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), que se incorpora como referencia al presente documento. Otros aminoácidos que contienen carbonilo puede prepararlos de manera similar un experto en la técnica. En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de manera natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional carbonilo reactivo. Por ejemplo, puede generarse una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación a partir de una funcionalidad que tiene grupo amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, puede usarse una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o puede exponerse por medio de digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suaves usando peryodato. Véanse, por ejemplo, Gaertner, *et al.*, Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138- 146 (1992); Gaertner *et al.*, J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo N-terminal del péptido o la proteína.

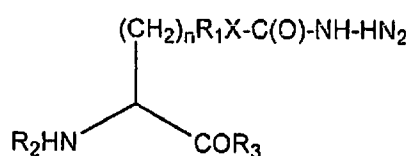
En la presente invención, un aminoácido no codificado de manera natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina lleva un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído implican normalmente la adición de un exceso molar de metaperyodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es normalmente de aproximadamente 7,0. Una

reacción típica implica la adición de un exceso molar de aproximadamente 1,5 de metaperyodato de sodio a una disolución tamponada del polipéptido, seguido por incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo la patente estadounidense n.º 6.423.685 que se incorpora al presente documento como referencia.

La funcionalidad carbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones suaves en disolución acuosa para formar las uniones hidrazona, oxima o semicarbazona correspondientes, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véanse, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tarn, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las otras cadenas laterales de aminoácido. Véanse, por ejemplo, Cornish, V. W., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem, 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al.*, Science 276:1125-1128 (1997).

B. Grupos reactivos hidrazina, hidrazida o semicarbazida

Los aminoácidos no codificados de manera natural que contienen un grupo nucleófilo, tal como una hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitarse a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Los aminoácidos que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



en la que n es de 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X, es O, N, o S o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, n es 4, R₁ no está presente, y X es N. En algunas realizaciones, n es 2, R₁ no está presente, y X no está presente. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, y el átomo de oxígeno se sitúa en para con respecto al grupo alifático en el anillo de arilo.

Los aminoácidos que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida están disponibles de fuentes comerciales. Por ejemplo, L-glutamato- α -hidrazida está disponible de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Otros aminoácidos no disponibles comercialmente puede prepararlos un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.281.211, que se incorpora como referencia al presente documento.

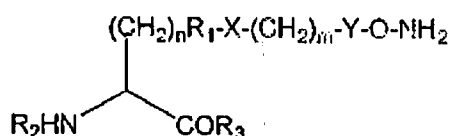
Los polipéptidos que contienen aminoácidos no codificados de manera natural que llevan funcionalidades hidrazida, hidrazina o semicarbazida puede hacerse reaccionar eficaz y selectivamente con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tarn, 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 frente a aldehídos, cetonas y otros grupos electrófilos en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitarse a, el grupo hidroxilo de serina o treonina o los grupos amino de lisina y el extremo N-terminal).

C. Aminoácidos que contienen aminooxilo

Los aminoácidos no codificados de manera natural que contienen un grupo aminooxilo (también denominado una hidroxilamina) permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados

(incluyendo, pero sin limitarse a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Como las hidrazinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilia potenciada del grupo aminooxilo le permite reaccionar eficaz y selectivamente con una variedad de moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véanse, por ejemplo, Shao, J. y Tarn, 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 hidrazona correspondiente, sin embargo, generalmente resulta una oxima de la reacción de un grupo aminooxilo con un grupo que contiene carbonilo tal como una cetona.

Los aminoácidos que contienen grupos aminooxilo a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



en la que n es de 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es de 0-10; Y = C(O) o no está presente; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1, e Y está presente. En algunas realizaciones, n es 2, R₁ y X no están presentes, m es 0, e Y no está presente.

Los aminoácidos que contienen aminooxilo pueden prepararse a partir de precursores de aminoácido fácilmente disponibles (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, J Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Determinados aminoácidos que contienen aminooxilo, tales como ácido L-2-amino-4-(aminooxi)butírico, se han aislado

de fuentes naturales (Rosenthal, G., *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997). Otros aminoácidos que contienen aminoóxido puede prepararlos un experto en la técnica.

5 D. Grupos reactivos azida y alquino

La reactividad única de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente las azidas alifáticas, y los alquinos son generalmente estables frente a condiciones químicas reactivas comunes. En particular, los grupos funcionales tanto azida como alquino son inertes frente a las cadenas laterales (es decir, grupos R) de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en los polipéptidos que se producen de manera natural. Sin embargo, cuando se ponen en estrecha proximidad, la naturaleza "accionada por resorte" de los grupos azida y alquino se revela y reaccionan selectiva y eficazmente por medio de la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen para generar el triazol correspondiente. Véanse, por ejemplo, Chin J., *et al*, *Science* 301: 964-7 (2003); Wang, Q., *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

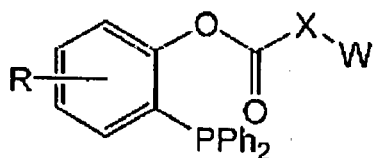
Dado que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véanse, por ejemplo, Padwa, A., en *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), págs. 1069-1109; Huisgen, R. en *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), págs. 1-176) en vez de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos no codificados de manera natural que llevan cadenas laterales que contienen azida y alquino permite que se modifiquen selectivamente los polipéptidos resultantes en la posición del aminoácido no codificado de manera natural. La reacción de cicloadición que implica polipéptido bG-CSF que contiene azida o alquino puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (incluyendo, pero sin limitarse a, en forma de una cantidad

catalítica de CuSO_4) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I) , *in situ*, en cantidad catalítica. Véanse, por ejemplo, Wang, Q., *et al*, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., *et al.*, J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). Los agentes reductores a modo de ejemplo incluyen, incluyendo, pero sin limitarse a, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe^{2+} , Co^{2+} , y un potencial eléctrico aplicado.

En algunos casos, en los que 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 manera natural que comprende un resto alquino y el polímero soluble en agua que va a unirse al aminoácido comprende un resto azida. Alternativamente, también puede llevarse a cabo la reacción opuesta (es decir, con el resto azida en el aminoácido y el resto alquino presente en el polímero soluble en agua).

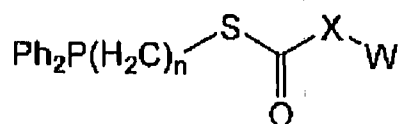
El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un éster arílico y funcionalizarse apropiadamente con un resto aril-fosfina para generar una unión amida. El grupo aril-fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona entonces eficazmente con una unión 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 o bien una alquil-azida (incluyendo, pero sin limitarse a, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o bien una aril-azida (p-azido-fenilalanina).

Los polímeros solubles en agua que contienen un éster arílico y un resto fosfina a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue;



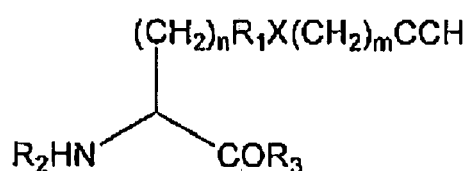
en la que X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, grupos alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR¹R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. R', R'', R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo, pero sin limitarse a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxilo o tioalcoxilo, 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 cada uno como lo son los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero no limitarse a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos a grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitarse a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero sin limitarse a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster y funcionalizarse apropiadamente con un resto aril-fosfina para generar una unión amida. El grupo aril-fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona entonces eficazmente con la unión tioéster para generar la amida correspondiente. Los polímeros solubles en agua que contienen un tioéster y un resto fosfina a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



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

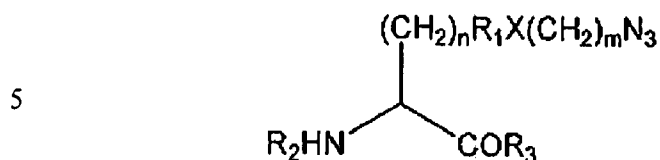
Los aminoácidos que contienen alquino a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



en la que n es de 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es de 0-10, R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y el resto acetileno se sitúa en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1 y el grupo propargiloxilo se sitúa en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunas realizaciones, n es 1, R₁ y X no están presentes y m es 0 (es decir, propargilglicina).

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles comercialmente. Por ejemplo, propargilglicina está disponible comercialmente de Peptech (Burlington, MA). Alternativamente, los aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse según métodos habituales. Por ejemplo, puede sintetizarse p-propargiloxifenilalanina, por ejemplo, según se describe en Deiters, A., *et al*, J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), y puede sintetizarse 4-alquinil-L-fenilalanina según se describe en Kayser, B., *et al*, Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Un experto en la técnica puede preparar otros aminoácidos que contienen alquino.

Los aminoácidos que contienen azida a modo de ejemplo pueden representarse tal como sigue:



10 en la que n es de 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es de 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y el resto azida se sitúa en para con respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es de 0-4 y R₁ y X no están presentes, y m=0. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 2 y el resto □-azidoetoxilo se sitúa en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo.

20 Los aminoácidos que contienen azida están disponibles de fuentes comerciales. Por ejemplo, puede obtenerse 4-azidofenilalanina de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Para aquellos aminoácidos que contienen azida que no están disponibles comercialmente, el grupo azida puede prepararse de manera relativamente sencilla usando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, por medio de desplazamiento de un grupo saliente adecuado (incluyendo, pero sin limitarse a, haluro, mesilato, tosilato) o por medio de la apertura de una lactona protegida de manera adecuada. Véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry de March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York).

30 E. Grupos reactivos aminotiol

La reactividad única de los grupos funcionales aminotiol beta-sustituidos los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído por medio de la formación de la tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao y J. Tarn, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas realizaciones, los aminoácidos de aminotiol beta-sustituidos pueden incorporarse en polipéptidos bG-CSF y entonces hacerse reaccionar con polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad aldehído. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua, conjugado de fármaco u otra carga útil puede acoplarse a un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido de aminotiol beta-sustituido por medio de la formación de la tiazolidina.

F. Grupos reactivos adicionales

Los grupos reactivos adicionales y aminoácidos no codificados de manera natural, incluyendo, pero sin limitarse a, para-amino-fenilalanina, que pueden incorporarse en polipéptidos bG-CSF de la invención se describen en las siguientes solicitudes de patente que se incorporan todas como referencia en su totalidad al presente documento: publicación de patente estadounidense n.º 2006/0194256, publicación de patente estadounidense n.º 2006/0217532, publicación de patente estadounidense n.º 2006/0217289, patente provisional estadounidense n.º 60/755.338; patente provisional estadounidense n.º 60/755.711; patente provisional estadounidense n.º 60/755.018; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/49397; documento WO 2006/069246; patente provisional estadounidense n.º 60/743.041; patente provisional estadounidense n.º 60/743.040; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/47822; patente provisional estadounidense n.º 60/882.819; patente provisional estadounidense n.º 60/882.500; y patente provisional estadounidense n.º 60/870.594. Estas solicitudes también tratan de grupos reactivos que

pueden estar presentes en PEG u otros polímeros, incluyendo, pero sin limitarse a, grupos hidroxilamina (aminooxilo) para su conjugación.

CAPTACIÓN CELULAR DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

5 La captación de aminoácidos no naturales por una célula es una cuestión que se considera normalmente cuando se diseñan y seleccionan aminoácidos no naturales, incluyendo, pero sin limitarse a, para su incorporación en una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que es improbable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales se captan en la célula eucariota por medio de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Puede realizarse un examen rápido que evalúe qué aminoácidos no naturales, si alguno, se captan por las células. Véanse, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays" que se incorpora como referencia al presente documento; y Liu, D.R. & Schultz, P. G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con diversos ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que son adecuados para rutas de captación celular es proporcionar rutas biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

25 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Ya existen muchas rutas biosintéticas en células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque puede no existir en la naturaleza un método biosintético para un aminoácido particular no natural, incluyendo, pero sin limitarse a, en una célula, la invención proporciona tales métodos. Por ejemplo, se generan opcionalmente rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales en células huésped mediante la adición de nuevas

enzimas o la modificación de rutas de células huésped existentes. Nuevas enzimas adicionales son opcionalmente enzimas que se producen de manera natural o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de 7-aminofenilalanina (tal como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas a partir de otros organismos. Los genes para estas enzimas pueden introducirse en una célula eucariota mediante transformación de la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Se facilitan ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente en los ejemplos a continuación. Se encuentran secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en Genbank. Las enzimas desarrolladas artificialmente también se añaden opcionalmente en una célula de la misma manera. De esta manera, se manipulan la maquinaria y los recursos de una célula para producir aminoácidos no naturales.

Una variedad de métodos están disponibles para producir enzimas novedosas para su uso en rutas biosintéticas o para el desarrollo de rutas existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, incluyendo, pero sin limitarse a, según se desarrolla por Maxygen, Inc. (disponible en la World Wide Web en maxygen.com), se usa opcionalmente para desarrollar rutas y enzimas y novedosas. Véanse, por ejemplo, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *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. USA.*, 91:10747-10751. De manera similar DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en la World Wide Web en genencor.com) se usa opcionalmente para la ingeniería genética de rutas metabólicas, incluyendo, pero sin limitarse a, modificar mediante ingeniería genética una ruta para crear O-metil-L-tirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye rutas existentes en organismos huésped usando una combinación de nuevos

genes, incluyendo, pero sin limitarse a, los identificados a través de genómica funcional, y desarrollo y diseño moleculares. Diversa Corporation (disponible en la World Wide Web en diversa.com) también proporciona tecnología para examinar rápidamente bibliotecas de genes y rutas génicas, incluyendo, pero sin limitarse a, para crear nuevas rutas.

Normalmente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética modificada por ingeniería genética de la invención se produce en una concentración suficiente para la biosíntesis eficaz de proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, una cantidad celular natural, pero no hasta un grado tal que afecte a la concentración de los otros aminoácidos o agote las fuentes celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que se transforma una célula con un plásmido que comprende los genes usados para producir enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, se usan opcionalmente selecciones *in vivo* para optimizar adicionalmente la producción del aminoácido no natural tanto para la síntesis ribosómica de proteínas como para el crecimiento celular.

POLIPÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS NO NATURALES

La incorporación de un aminoácido no natural puede realizarse para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitarse a, diseñar a medida cambios en la estructura y/o función de proteínas, cambiar el tamaño, la acidez, nucleofilia, puentes de hidrógeno, hidrofobicidad, accesibilidad de sitios diana de proteasas, direccionamiento a un resto (incluyendo, pero sin limitarse a, para una matriz proteica), añadir una molécula biológicamente activa, unir un polímero, unir un radionúclido, modular la semivida en suero, modular la penetración en tejido (por ejemplo, tumores), modular el transporte activo, modular la especificidad o distribución tisular, celular u orgánica, modular la inmunogenicidad, modular la resistencia a proteasa, etc. Las proteínas que incluyen un aminoácido no natural pueden tener propiedades biofísicas o catalíticas mejoradas o incluso completamente

nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente mediante la inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, capacidad catalítica, semivida (incluyendo, pero sin limitarse a, semivida en suero), capacidad para reaccionar con otras moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, de forma covalente o no covalente, y similares. Las composiciones que incluyen proteínas que incluyen al menos un aminoácido no natural son útiles para, incluyendo, pero sin limitarse a, terapéutica novedosa, diagnóstico, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos), e incluyendo, pero sin limitarse a, el estudio de la estructura y función de proteínas. Véase, por ejemplo, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

En un aspecto de la invención, una composición incluye al menos una proteína con al menos uno, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 limitarse a, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. En otro aspecto, una composición incluye una proteína con al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en la proteína se sustituye por el aminoácido no natural. Para una proteína dada con más de un aminoácido no natural, los aminoácidos no naturales pueden ser idénticos o diferentes (incluyendo, pero sin limitarse a, la proteína pueden incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales, o pueden incluir dos del mismo aminoácido no natural). Para una proteína dada con más de dos aminoácidos no naturales, los aminoácidos no naturales pueden ser iguales,

diferentes o una combinación de múltiples aminoácidos no naturales de la misma clase 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 métodos de la invención. Un excipiente (incluyendo, pero sin limitarse a, un excipiente farmacéuticamente aceptable) también puede estar presente con la proteína.

Mediante la producción de proteínas o polipéptidos de interés con al menos un aminoácido no natural en células eucariotas, las proteínas o los polipéptidos incluirán normalmente modificaciones postraduccionales eucariotas. En determinadas realizaciones, una proteína incluye al menos un aminoácido no natural y al menos una modificación postraducciona que se realiza *in vivo* mediante una célula eucariota, en la que la modificación postraducciona no se realiza mediante una célula procariota. Por ejemplo, la modificación postraducciona incluye, incluyendo, pero sin limitarse a, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación por unión de glicolípidos, glicosilación, y similares. En un aspecto, la modificación postraducciona incluye la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitarse a, (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc)) a una asparagina mediante una unión GlcNAc-asparagina. Véase la tabla 1 que indica algunos ejemplos de oligosacáridos unidos a N de proteínas eucariotas (también pueden estar presentes residuos adicionales, que no se muestran). En otro aspecto, la modificación postraducciona incluye la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero sin limitarse a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina mediante una unión GalNAc-serina o GalNAc-treonina, o una unión GlcNAc-serina o GlcNAc-treonina.

TABLA 1: EJEMPLOS DE OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE ENLACE GlcNAc

	TIPO	ESTRUCTURA BASE
5	Alta Manosa	Manα1-6 Manα1-3 Manα1-6 Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
10	Híbrido	Manα1-6 GlcNAcβ1-2 Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
	Complejo	GlcNAcβ1-2 GlcNAcβ1-2 Manα1-6 Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
15	Xilosa	Manα1-6 Xylβ1-2 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn

Aún en otro aspecto, la modificación postraduccional incluye procesamiento proteolítico de precursores (incluyendo, pero sin limitarse a, precursor de calcitonina, precursor de péptido relacionado con el gen de calcitonina, hormona preproparatiroidea, preproinsulina, proinsulina, prepro-opiomelanocortina, proopiomelanocortina y similares), ensamblaje en una proteína de múltiples subunidades o ensamblaje macromolecular, traducción en otro sitio en la célula (incluyendo, pero sin limitarse a, orgánulos, tales como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondria, cloroplastos, vacuolas, etc., o a través de la ruta secretora). En determinadas realizaciones, la proteína comprende una secuencia de secreción o localización, una cola de epítipo, una cola FLAG, una cola de polihistidina, una fusión de GST, o similares.

Una ventaja de un aminoácido no natural es que presenta restos químicos adicionales que pueden usarse para añadir moléculas adicionales. Esas modificaciones pueden realizarse *in vivo* en una célula eucariota o no eucariota, o *in vitro*. Por tanto, en determinadas realizaciones, la

modificación postraducciona es a través del aminoácido no natural. Por ejemplo, la modificación postraducciona puede ser a través de una reacción nucleófilo-electrófilo. La mayoría de las reacciones actualmente usadas para la modificación selectiva de proteínas implican la formación de enlace covalente entre parejas de reacción nucleófila y electrófila, incluyendo, pero sin limitarse a, la reacción de α -halocetonas con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en esos casos se determina mediante el número y la accesibilidad de los residuos nucleófilos en la proteína. En proteínas de la invención, pueden usarse otras reacciones más selectivas tales como la reacción de un ceto-aminoácido no natural con hidrazidas o compuestos de aminooxilo, *in vitro* e *in vivo*. Véase, por ejemplo, Cornish, *et al.*, (1996) J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151; Mahal, *et al.*, (1997) Science. 276:1125-1128; Wang, *et al.*, (2001) Science 292:498-500; Chin, *et al.*, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026- 9027; Chin, *et al.*, (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99:11020-11024; Wang, *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. 100:56-61; Zhang, *et al.*, (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; y Chin, *et al.*, (2003) Science. 301: 964-7, todos los cuales se incorporan como referencia al presente documento. Esto permite el marcaje selectivo de prácticamente cualquier proteína con una gran cantidad de reactivos incluyendo fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos y moléculas citotóxicas. Véase también, la patente estadounidense n.º 6.927.042 titulada "Glycoprotein synthesis", que se incorpora como referencia al presente documento. También pueden realizarse modificaciones postraduccionales, incluyendo, pero sin limitarse a, a través de un aminoácido azido, mediante el ligadura de Staudinger (incluyendo, pero sin limitarse a, con reactivos de triarilfosfina). Véase, por ejemplo, Kiick *et al.*, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

Esta invención proporciona otro método altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas, que implica la incorporación genética de aminoácidos no naturales, incluyendo, pero sin limitarse a, que contienen un

resto azida o alquinilo en proteínas en respuesta a un codón selector. Estas cadenas laterales de aminoácidos pueden modificarse entonces mediante, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 limitarse a, derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Dado que este método implica una cicloadición en vez de una sustitución nucleófila, pueden modificarse proteínas con una selectividad extremadamente alta. Esta reacción puede llevarse 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, Tornøe, *et al.*, (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y, Rostovtsev, *et al.*, (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 2596-2599. Otro método que puede usarse es el intercambio de ligandos en un compuesto bisarsénico con un motivo de tetracisteína, véase, por ejemplo, Griffin, *et al.*, (1998) *Science* 281: 269-272.

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

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

El polipéptidos bG-CSF de la invención puede generarse *in vivo* usando ARNt modificado y ARNt sintetasas para añadir o sustituir aminoácidos que no se codifican en sistemas que se producen de manera natural.

Métodos para generar ARNt y ARNt sintetasas que usan aminoácidos que no se codifican en sistemas que se producen de manera natural se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 7.045.337 y 7.083.970 que se incorporan como referencia al presente documento. Estos métodos implican generar una maquinaria de traducción que funciona independientemente de las sintetasas y los ARNt endógenos al sistema de traducción (y por tanto algunas veces se denomina "ortogonal"). Normalmente, el sistema de traducción comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (ORS). Normalmente, la ORS aminoacila preferiblemente el O-ARNt con al menos un aminoácido que no se produce de manera natural en el sistema de traducción y el O-ARNt reconoce al menos un codón selector que no se reconoce mediante otros ARNt en el sistema. El sistema de traducción inserta por tanto el aminoácido no codificado de manera natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, "sustituyendo" así un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

Se ha descrito en la técnica una amplia variedad de ARNt y aminoacil-ARNt sintetasas ortogonales para insertar aminoácidos sintéticos particulares en polipéptidos, y generalmente son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, se describen O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas específicas de ceto en Wang, L., *et al.* Proc. Natl Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003) y Zhang, Z. *et al.*, Biochem. 42(22):6735-6746 (2003). O-RS a modo de ejemplo, o partes de la misma, se codifican mediante secuencias de polinucleótido e incluyen secuencias de aminoácidos dadas a conocer en las patentes estadounidenses n.^{os} 7.045.337 y 7.083.970,

incorporada cada una en el presente documento como referencia. También se describen moléculas de O-ARNt correspondientes para su uso con las O-RS en las patentes estadounidenses n.^{os} 7.045.337 y 7.083.970 que se incorporan como referencia al presente documento. 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.

Se describe un ejemplo de un sistema O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específico de azida en Chin, J. W., *et al*, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002). Secuencias de O-RS a modo de ejemplo para p-azido-L-Phe incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 14-16 y 29-32 y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 46-48 y 61-64 tal como se dan a conocer en la patente estadounidense n.^o 7.083.970 que se incorpora como referencia al presente documento. Secuencias de O-ARNt a modo de ejemplo adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1-3 tal como se dan a conocer en la patente estadounidense n.^o 7.083.970, que se incorpora como referencia al presente documento. Otros ejemplos de pares de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específicos para aminoácidos particulares no codificados de manera natural se describen en la patente estadounidense n.^o 7.045.337 que se incorpora como referencia al presente documento. O-RS y O-ARNt que incorporan aminoácidos que contienen tanto ceto como azida en *S. cerevisiae* se describen en Chin, J. W., *et al*, Science 301: 964-967 (2003).

Se han notificado varios otros pares ortogonales. Glutaminilo (véase, por ejemplo, Liu, D. R., y Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:4780-4785), aspartilo (véase, por ejemplo, Pastrnak, M., *et al.*, (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286), y tirosilo (véase, por ejemplo, Ohno, S., *et al.*, (1998) J. Biochem. (Tokio, Jpn). 124:1065-1068; y, Kowal, A. K., *et al.*, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:2268-2273) se han descrito sistemas derivados de ARNt y sintetasas de *S. cerevisiae* para la posible incorporación de aminoácidos no naturales en *E. coli*. Se han descrito

sistemas derivados de glutaminilo (véase, por ejemplo, Kowal, A. K., *et al.*, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:2268-2273) y tirosilo (véase, por ejemplo, Edwards, H., y Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) sintetizadas 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., *et al.*, (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699. El uso de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetizadas implica la selección de un codón específico que codifica para el aminoácido no codificado de manera natural. Mientras que puede usarse cualquier codón, generalmente es deseable seleccionar un codón que se use con poca frecuencia o nunca en la célula en la que se expresa la O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa. Por ejemplo, codones a modo de ejemplo incluyen codón sin sentido tal como codones de terminación (ámbar, ocre y ópalo), codones de cuatro bases o más y otros codones de tres bases naturales que se usan con poca frecuencia o no se usan.

Pueden(n) introducirse codón/codones selector(es) específico(s) en posiciones apropiadas en la secuencia que codifica para polinucleótido bG-CSF usando métodos de mutagénesis conocidos en la técnica (incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis específica del sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción, etc.).

Métodos para generar componentes de la maquinaria biosintética de proteínas, tales como O-RS, O-ARNt y pares de O-ARNt/O-RS ortogonales que pueden usarse para incorporar un aminoácido no codificado de manera natural se describen en Wang, L., *et al.*, Science 292: 498-500 (2001); Chin, J. W., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. *et al.*, Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Métodos y composiciones para la incorporación *in vivo* de aminoácidos no codificados de manera natural se describen en la patente estadounidense n.º 7.045.337, que se incorpora como referencia al presente documento. Métodos para seleccionar un par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en un sistema de traducción *in vivo* de un organismo también se describen en las patentes

estadounidenses n.ºs 7.045.337 y 7.083.970 que se incorporan como referencia al presente documento. La publicación PCT n.º WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins", que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de cetaminoácidos. La publicación PCT n.º WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code", que se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad, describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de aminoácidos no codificados de manera natural en células huésped eucariotas.

Métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (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 limitarse a, 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 examinar) la biblioteca de RS (opcionalmente RS mutantes) para determinar miembros que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido no codificado de manera natural y un aminoácido natural, proporcionando así una reserva de RS (opcionalmente mutantes) activas; y/o, (c) seleccionar (opcionalmente a través de selección negativa) la reserva para determinar RS activas (incluyendo, pero sin limitarse a, RS mutantes) que aminoacilan preferiblemente el O-ARNt en ausencia del aminoácido no codificado de manera natural, proporcionando así al menos una O-RS recombinante; en el que la al menos una O-RS recombinante aminoacila preferiblemente el O-ARNt con el aminoácido no codificado de manera natural.

En una realización, la RS es una RS inactiva. La RS inactiva puede generarse mutando 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 para dar aminoácidos diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, alanina.

5 Pueden generarse bibliotecas de RS mutantes usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, diseño racional basándose en estructura de RS tridimensional de proteína, o mutagénesis de nucleótidos de RS en una técnica de diseño al azar o racional. Por ejemplo, las RS mutantes pueden generarse mediante
10 mutaciones específicas del sitio, mutaciones al azar, mutaciones de recombinación que generan diversidad, constructos quiméricos, diseño racional y mediante otros métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

En una realización, la selección (y/o el examen) de la biblioteca de RS
15 (opcionalmente RS mutantes) para determinar miembros que son activos, incluyendo, pero sin limitarse a, que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido no codificado de manera natural y un aminoácido natural, incluye: introducir un marcador de selección o examen positivo, incluyendo, pero sin limitarse a, un gen de resistencia a antibióticos,
20 o similar, y la biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células, en la que el marcador de selección y/o examen positivo comprende al menos un codón selector, incluyendo, pero sin limitarse a, un codón ámbar, ocre u ópalo; hacer crecer la pluralidad de células en presencia de un agente de selección; identificar las células que sobreviven
25 (o muestran una respuesta específica) en presencia del agente de selección y/o examen suprimiendo el al menos un codón selector en el marcador de selección o examen positivo, proporcionando así un subconjunto de células seleccionadas de manera positiva que contienen la reserva de RS (opcionalmente mutantes) activas. Opcionalmente, puede hacerse variar la
30 concentración de agente de selección y/o examen.

En un aspecto, el marcador de selección positivo es un gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) y el codón selector es un codón de terminación ámbar en el gen de CAT. Opcionalmente, el marcador de selección positivo es un gen de β -lactamasa y el codón selector es un codón de terminación ámbar en el gen de β -lactamasa. En otro aspecto el marcador de examen positivo comprende un marcador de examen fluorescente o luminiscente o un marcador de examen basado en afinidad (incluyendo, pero sin limitarse a, un marcador de superficie celular).

En una realización, seleccionar o examinar de manera negativa la reserva para detectar RS (opcionalmente mutantes) activas que aminoacilan preferiblemente el O-ARNt en ausencia del aminoácido no codificado de manera natural incluye: introducir un marcador de examen o de selección negativo con la reserva de RS (opcionalmente mutantes) activas de la selección o el examen positivo en una pluralidad de células de un segundo organismo, en el que el marcador de examen o de selección negativo comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitarse a, un gen de resistencia a antibióticos, incluyendo, pero sin limitarse a, un gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT)); e, identificar células que sobreviven o muestran una respuesta de examen específica en un primer medio complementado con el aminoácido no codificado de manera natural y un agente de selección o de examen, pero no logran sobrevivir o mostrar la respuesta específica en un segundo medio no complementado con el aminoácido no codificado de manera natural y el agente de selección o de examen, proporcionando así células que sobreviven o células examinadas con la al menos una O-RS recombinante. Por ejemplo, un protocolo de identificación de CAT actúa opcionalmente como una selección positiva y/o un examen negativo en la determinación de O-RS recombinantes apropiadas. Por ejemplo, se replica opcionalmente una reserva de clones en placas de crecimiento que contienen CAT (que comprende al menos un codón selector) o bien con o bien sin uno o más aminoácidos no codificados de manera natural. Por tanto se considera que las colonias que crecen

exclusivamente en las palcas que contienen aminoácidos no codificados de manera natural contienen O-RS recombinante. En un aspecto, se varía la concentración del agente de selección (y/o examen). En algunos aspectos el primer y el segundo organismo son diferentes. Por tanto, el primero y/o el

5 segundo organismo comprende opcionalmente: un procariota, un eucariota, un mamífero, un *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una archaeobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc. En otras realizaciones, el marcador de examen comprende un marcador de examen fluorescente o luminiscente o un marcador de examen basado en

10 afinidad.

En otra realización, el examen o la selección (incluyendo, pero sin limitarse a, selección negativa) de la reserva para detectar RS (opcionalmente mutantes) activas incluye: aislar la reserva de RS mutantes activas de la etapa de selección positiva (b); introducir un marcador de

15 examen o de selección negativo, en el que el marcador de examen o de selección negativo comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero sin limitarse a, un gen marcador tóxico, incluyendo, pero sin limitarse a, un gen de ribonucleasa bamasa, que comprende al menos un codón selector), y la reserva de RS (opcionalmente mutantes) activas en una pluralidad de

20 células de un segundo organismo; e identificar células que sobreviven o muestran una respuesta de examen específica en un primer medio no complementado con el aminoácido no codificado de manera natural, pero no logran sobrevivir o mostrar una respuesta de examen específica en un segundo medio complementado con el aminoácido no codificado de manera

25 natural, proporcionando así células que sobreviven o examinadas con la al menos una O-RS recombinante, en el que la al menos una O-RS recombinante es específica para el aminoácido no codificado de manera natural. En un aspecto, el al menos un codón selector comprende aproximadamente dos o más codones selectores. Tales realizaciones

30 pueden incluir opcionalmente 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 limitarse a, cada organismo es opcionalmente, incluyendo, pero sin limitarse a, un procariota, un eucariota, un mamífero, un *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una archaeobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc.).

5 Además, algunos aspectos incluyen en los que el marcador de selección negativo comprende un gen de ribonucleasa bamaasa (que comprende al menos un codón selector). Otros aspectos incluyen en los que el marcador de examen comprende opcionalmente un marcador de examen fluorescente o luminiscente o un marcador de examen basado en afinidad. En las
10 realizaciones en el presente documento, los exámenes y/o las selecciones incluyen opcionalmente la variación de la rigurosidad de examen y/o selección.

En una realización, los métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) recombinante pueden
15 comprender además: (d) aislar la al menos una O-RS recombinante; (e) generar un segundo conjunto de O-RS (opcionalmente mutadas) derivadas de la al menos una O-RS recombinante; y, (f) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se obtiene una O-RS mutada que comprende una capacidad para aminoacilar preferiblemente el O-ARNt. Opcionalmente, se repiten las
20 etapas (d)-(f), incluyendo, pero sin limitarse a, al menos aproximadamente dos veces. En un aspecto, el segundo conjunto de O-RS mutadas derivadas de al menos una O-RS recombinante puede generarse mediante mutagénesis, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis al azar, mutagénesis específica del sitio, recombinación o una combinación de las
25 mismas.

La rigurosidad de las etapas de selección/examen, incluyendo, pero sin limitarse a, la etapa de selección/examen positiva (b), la etapa de selección/examen negativa (c) o las etapas de selección/examen tanto positiva como negativa (b) y (c), en los métodos descritos anteriormente,
30 incluye opcionalmente hacer variar la rigurosidad de la selección/examen. En otra realización, la etapa de selección/examen positiva (b), la etapa de

selección/examen negativa (c) o las etapas de selección/examen tanto positiva como negativa (b) y (c) comprenden usar un indicador, en el que el indicador se detecta mediante citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) o en el que el indicador se detecta mediante luminiscencia. Opcionalmente, el indicador se presenta en una superficie celular, en una presentación en fago o similares y se selecciona basándose en la afinidad o actividad catalítica que implica el aminoácido no codificado de manera natural o un análogo. En una realización, la sintetasa mutada se presenta en una superficie celular, en una presentación en fago o similares.

Métodos para producir un ARNt ortogonal (O-ARNt) recombinante incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt, incluyendo, pero sin limitarse a, un ARNt supresor, a partir de un primer organismo; (b) seleccionar (incluyendo, pero sin limitarse a, selección negativa) o examinar la biblioteca para detectar ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan mediante una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así una reserva de ARNt (opcionalmente mutantes); y, (c) seleccionar o examinar la reserva de ARNt (opcionalmente mutantes) para detectar miembros que se aminoacilan mediante una RS ortogonal (O-RS) introducida, proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante; en el que el al menos un O-ARNt recombinante reconoce un codón selector y no se reconoce de manera eficaz mediante la RS del segundo organismo y se aminoacila preferiblemente mediante la O-RS. En algunas realizaciones el al menos un ARNt es 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 terminación ópalo. En una realización, el OARNt recombinante tiene una mejora de ortogonalidad. Se apreciará que en algunas realizaciones, el OARNt se importa opcionalmente en un primer organismo a partir de un segundo organismo sin necesidad de modificación. En diversas

realizaciones, el primer y el segundo organismo son o bien iguales o bien diferentes y se eligen opcionalmente de, incluyendo, pero sin limitarse a, procariotas (incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, etc.), eucariotas, mamíferos, hongos, levaduras, archaeobacteria, eubacteria, plantas, insectos, protistas, etc. Adicionalmente, el ARNt recombinante se aminoacila opcionalmente mediante un aminoácido no codificado de manera natural, en el que el aminoácido no codificado de manera natural se biosintetiza *in vivo* o bien de manera natural o bien a través de manipulación genética. El aminoácido no codificado de manera natural se añade opcionalmente a un medio de crecimiento para al menos el primer o el segundo organismo.

En un aspecto, seleccionar (incluyendo, pero sin limitarse a, selección negativa) o examinar la biblioteca para detectar ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan mediante una aminoacil-ARNt sintetasa (etapa (b)) incluye: introducir un gen marcador tóxico, en el que el gen marcador tóxico comprende 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 tal 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 que sobreviven, en las que las células que sobreviven contienen la reserva de ARNt (opcionalmente mutantes) que comprende al menos un ARNt ortogonal o ARNt no funcional. Por ejemplo, pueden seleccionarse células que sobreviven usando un ensayo de densidad celular con razón de comparación.

En otro aspecto, el gen marcador tóxico puede incluir dos o más codones selectores. En otra realización de los métodos, el gen marcador tóxico es un gen de ribonucleasa barnasa, en el 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.

En una realización, seleccionar o examinar la reserva de ARNt (opcionalmente mutantes) para detectar miembros que se aminoacilan mediante una RS ortogonal (O-RS) introducida puede incluir: introducir un gen marcador de examen o de selección positivo, en el que el gen marcador positivo comprende un gen de resistencia a fármacos (incluyendo, pero sin limitarse a, gen de β -lactamasa, que comprende al menos uno de los codones selectores, tales como al menos un codón de terminación ámbar) o un gen esencial para el organismo, o un gen que conduce a la destoxificación de un agente tóxico, junto con la O-RS, y la reserva de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; e, identificar células que sobreviven o se examinan que se hacen crecer en presencia de un agente de selección o examen, incluyendo, pero sin limitarse a, un antibiótico, proporcionando así una reserva de células que presentan el al menos un ARNt recombinante, en el que el al menos un ARNt recombinante se aminoacila mediante la O-RS e inserta un aminoácido en un producto de traducción codificado mediante el gen marcador positivo, en respuesta a al menos un codón selector. En otra realización, se hace variar la concentración del agente de selección y/o examen.

Se proporcionan métodos para generar pares de O-ARNt/O-RS específicos. Los métodos incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt de un primer organismo; (b) examinar o seleccionar de manera negativa la biblioteca para detectar ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan mediante una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así una reserva de ARNt (opcionalmente mutantes); (c) seleccionar o examinar la reserva de ARNt (opcionalmente mutantes) para detectar miembros que se aminoacilan mediante una RS ortogonal (O-RS) introducida, proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante. El al menos un O-ARNt recombinante reconoce un codón selector y no se reconoce eficazmente mediante la RS del segundo

organismo y se aminoacila preferiblemente mediante la O-RS. El método también incluye (d) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un tercer organismo; (e) seleccionar o examinar la biblioteca de RS mutantes para
 5 detectar miembros que aminoacilan preferiblemente el al menos un O-ARNt recombinante en presencia de un aminoácido no codificado de manera natural y un aminoácido natural, proporcionando así una reserva de RS (opcionalmente mutantes) activas; y, (f) seleccionar o examinar de manera negativa la reserva para detectar RS (opcionalmente mutantes) activas que
 10 aminoacilan preferiblemente el al menos un O-ARNt recombinante en ausencia del aminoácido no codificado de manera natural, proporcionando así el al menos un par de O-ARNt/O-RS específico, en el que el al menos un par de O-ARNt/O-RS específico comprende al menos una O-RS recombinante que es específica para el aminoácido no codificado de manera natural y el al menos un O-ARNt recombinante. Se incluyen pares de O-ARNt/O-RS específicos producidos mediante los métodos. Por ejemplo, el par de O-ARNt/O-RS específico puede incluir, incluyendo, pero sin limitarse a, un par mutRNATyr-mutTyrRS, tal como un par mutRNATyr-SSU12TyrRS, un par mutRNALeu-mutLeuRS, un par mutRNAThr-mutThrRS, un par
 15 mutRNAGlu-mutGluRS, o similares. Adicionalmente, tales métodos incluyen en los que el primer y el tercer organismo son el mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*).

Métodos para seleccionar un par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en un sistema de traducción *in vivo* de un segundo organismo también se incluyen en la presente invención. Los métodos incluyen:
 25 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 duplicado de un segundo organismo; y, seleccionar para
 30 detectar células que sobreviven en el primer conjunto que no logran sobrevivir en el conjunto de células duplicado o examinar para detectar

células que muestran una respuesta de examen específica que no logran dar tal respuesta en el conjunto de células duplicado, en el que el primer conjunto y el conjunto de células duplicado se hacen crecer en presencia de un agente de selección o de examen, en el que las células que sobreviven o examinadas comprenden el par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en el sistema de traducción *in vivo* del segundo organismo. En una realización, comparar y seleccionar o examinar incluye un ensayo de complementación *in vivo*. La concentración del agente de selección o examen puede variarse.

Los organismos de la presente invención comprenden una variedad de organismos y una variedad de combinaciones. Por ejemplo, el primer y el segundo organismo de los métodos de la presente invención pueden ser iguales o diferentes. En una realización, los organismos son opcionalmente un organismo procariota, incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares. Alternativamente, los organismos comprenden opcionalmente un organismo eucariota, incluyendo, pero sin limitarse a, plantas (incluyendo, pero sin limitarse a, plantas complejas tales como monocotiledóneas o dicotiledóneas), algas, protistas, hongos (incluyendo, pero sin limitarse a, levadura, etc.), animales (incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos, insectos, artrópodos, etc.), o similares. En otra realización, el segundo organismo es un organismo procariota, incluyendo, pero sin limitarse a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, o similares. Alternativamente, el segundo organismo puede ser un organismo eucariota, incluyendo, pero sin limitarse a, una levadura, una célula animal, una célula vegetal, un hongo, una célula de mamífero, o similares. En diversas realizaciones el primer y el segundo organismo son diferentes.

VI. Ubicación de aminoácidos que no se producen de manera natural en polipéptidos bG-CSF

La presente invención contempla la incorporación de uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural en polipéptidos bG-CSF. Puede incorporarse uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural en una posición particular que no altera la actividad del polipéptido. Esto puede lograrse realizando sustituciones "conservativas", incluyendo, pero sin limitarse a, sustituir aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófobos, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrófilos por aminoácidos hidrófilos y/o insertar el aminoácido que no se produce de manera natural en una ubicación que no se requiere para la actividad.

Puede emplearse una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución por un aminoácido no codificado de manera natural dentro del polipéptido bG-CSF. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que cualquier posición de la cadena de polipéptido es adecuada para su selección para incorporar un aminoácido no codificado de manera natural, y su selección puede basarse en el diseño racional o mediante selección al azar para cualquier, o ningún, fin deseado particular. La selección de sitios deseados puede ser para producir una molécula de bG-CSF que tiene cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo, pero sin limitarse a, agonistas, super-agonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores de unión a receptor, moduladores de actividad de receptor, formación de dímeros o multímeros, ningún cambio en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido tal como solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, pueden identificarse ubicaciones en el polipéptido requeridas para la actividad biológica de polipéptidos bG-CSF usando análisis de mutación puntual, barrido con alanina, mutagénesis por saturación y barrido para determinar la actividad biológica, o métodos de barrido homólogos

conocidos en la técnica. Pueden usarse otros métodos para identificar residuos para la modificación de polipéptidos bG-CSF que incluyen, pero no se limitan a, obtención de perfil de secuencia, selecciones de bibliotecas de rotámeros, potenciales de pares de residuos, y diseño racional usando la tecnología de automatización del diseño de proteínas. (Véanse las patentes estadounidenses n.^{os} 6.188.965; 6.269.312; 6.403.312; documento WO98/47089, que se incorporan mediante referencia). Pueden mutarse residuos que son críticos para la bioactividad de bG-CSF, residuos que participan en la estabilidad farmacéutica, epítomos de anticuerpos o residuos de unión a receptor. Las patentes estadounidenses n.^{os} 5.580.723; 5.834.250; 6.013.478; 6.428.954; y 6.451.561, que se incorporan como referencia al presente documento, describen métodos para el análisis sistemático de la estructura y función de polipéptidos tales como bG-CSF mediante identificación de dominios activos que influyen sobre la actividad del polipéptido con una sustancia diana. Se describen estudios de mutagénesis por barrido con alanina de G-CSF en Reidhaar-Olson JF *et al.*, *Biochemistry* (1996) Jul 16; 35(28):9034-41, Young DC *et al.* *Protein Sci.* (1997) Jun; 6(6):1228-36, y Layton *et al.* (1997) *JBC* 272(47): 29735-29741. Residuos distintos de los identificados como críticos para la actividad biológica mediante mutagénesis por barrido con alanina u homóloga pueden ser buenos candidatos para la sustitución por un aminoácido no codificado de manera natural dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución por un aminoácido no codificado de manera natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería sencillamente preparar sustituciones en serie en cada posición en la cadena de polipéptido por un aminoácido no codificado de manera natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la técnica que cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para la sustitución

por un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en la presente invención.

La estructura y actividad de mutantes de polipéptidos bG-CSF que contienen deleciones también pueden examinarse para determinar regiones de la proteína que es probable que toleren la sustitución por un aminoácido no codificado de manera natural. De una manera similar, la digestión con proteasa y los anticuerpos monoclonales pueden usarse para identificar regiones de bG-CSF que son responsables de la unión a su receptor. Layton *et al.*, (2001) JBC 276 (39) 36779-36787 describen estudios con anticuerpo con hG-CSF y su receptor. Una vez eliminados los residuos que es probable que no toleren la sustitución por aminoácidos no codificados de manera natural, puede examinarse el impacto de sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes. Pueden generarse modelos 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 la World Wide Web en rcsb.org) es una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos. Pueden realizarse modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de polipéptidos, si no hay datos estructurales tridimensionales disponibles. Hay estructuras de RMN y cristalográficas de rayos X de hG-CSF disponibles en el Banco de Datos de Proteínas con ID de PDB: 1CD9, IPGR, IRHG, IGNC, así como en las patentes estadounidenses n.ºs 5.581.476; y 5.790.421, que se incorporan como referencia al presente documento. Por tanto, los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse por aminoácidos no codificados de manera natural.

En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la invención comprende uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural ubicados en una región de la proteína que no altera la estructura del polipéptido.

Residuos a modo de ejemplo de incorporación de un aminoácido no codificado de manera natural pueden ser los que se excluyen de posibles regiones de unión a receptor, pueden estar total o parcialmente expuestos a disolvente, tienen interacciones de puentes de hidrógeno mínimas o
 5 inexistentes con residuos cercanos, pueden estar mínimamente expuestos a residuos reactivos cercanos, pueden estar en una o más de las caras expuestas, pueden ser un sitio o sitios que están yuxtapuestos a un segundo bG-CSF, u otra molécula o fragmento de la misma, pueden estar en regiones que son altamente flexibles, o estructuralmente rígidas, según se
 10 predice mediante la estructura tridimensional secundaria, terciaria o cuaternaria de bG-CSF, unido o no unido a su receptor, o acoplado o no acoplado a otra molécula biológicamente activa, o pueden modular la conformación del propio bG-CSF o un dímero o multímero que comprende uno o más bG-CSF, mediante alteración de la flexibilidad o rigidez de la
 15 estructura completa según se desee.

Un experto en la técnica reconoce que tal análisis de bG-CSF permite la determinación de qué residuos de aminoácidos están expuestos en la superficie en comparación con residuos de aminoácidos que están enterrados dentro de la estructura terciaria de la proteína. Por tanto, una
 20 realización de la presente invención es sustituir un aminoácido no codificado de manera natural por un aminoácido que es un residuo expuesto en la superficie.

En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones en bG-CSF: antes de la posición 1 (es decir en el extremo N terminal), 1, 2, 3,
 25 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,
 30 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).

En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de las mismas de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en la posición 62 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en la posición 133 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones

o deleciones de aminoácido natural. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no naturales en una secuencia líder o señal que es N o C terminal con respecto a la SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia bG-CSF. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 1) y el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural no incluyen histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como β -alanina, ornitina, etc. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 2) y el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural no incluyen histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como α -alanina, ornitina, etc. En algunas realizaciones, el aminoácido incorporado en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 2, es un aminoácido distinto de histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como α -alanina, ornitina, etc.

En algunas realizaciones, se incorpora de manera ribosómica uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 1) y el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural no incluyen histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen

de manera natural tales como α -alanina, ornitina, etc. En algunas realizaciones, se incorpora de manera ribosómica uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 2) y el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural no incluyen histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como α -alanina, ornitina, etc. En algunas realizaciones, el aminoácido incorporado de manera ribosómica en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 2, es un aminoácido distinto de histidina, arginina, lisina, isoleucina, fenilalanina, leucina, triptófano, alanina, cisteína, asparaginas, valina, glicina, serina, glutamina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, o aminoácidos no proteogénicos que se producen de manera natural tales como α -alanina, ornitina, etc. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 1) en el que el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural tiene o tienen un grupo o grupos funcionales no reconocidos mediante una RS endógena. En algunas realizaciones, se incorpora uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en una o más posiciones del bG-CSF (SEQ ID NO: 2) en el que el uno o más ácidos o aminoácidos no codificados de manera natural tiene o tienen un grupo o grupos funcionales no reconocidos mediante una RS endógena. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF de la presente invención tiene un aminoácido incorporado en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 2, en el que el aminoácido tiene un grupo o grupos funcionales no reconocidos mediante una RS endógena. En algunas realizaciones, el polipéptido bG-CSF de la presente invención tiene una para-acetilfenilalanina incorporada en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 2. En algunas

realizaciones, el polipéptido bG-CSF de la presente invención tiene un para-aminofenilalanina incorporada en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1, o la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: antes de la posición 1 (es decir en el extremo N terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).

En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas

realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en una o más de esas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 62 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 133 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en la secuencia señal o líder N o C terminal con respecto a la SEQ ID NO: 1, 2 u otra secuencia de bG-CSF se une a un polímero soluble en agua.

Un examen de la estructura cristalina de bG-CSF o miembro(s) de la familia de bG-CSF y su interacción con el receptor de G-CSF puede indicar que determinados residuos de aminoácidos tienen cadenas laterales que son total o parcialmente accesibles para el disolvente. La cadena lateral de un aminoácido no codificado de manera natural en esas posiciones puede estar dirigida alejándose de la superficie de la proteína y hacia el disolvente.

Una amplia variedad de aminoácidos no codificados de manera natural puede sustituirse por, o incorporarse en, una posición dada en un polipéptido bG-CSF. En general, un aminoácido no codificado de manera natural particular se selecciona 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 para sustituciones conservativas (es decir, aminoácidos no codificados de

manera natural basados en anillo, tales como p-acetilfenilalanina u O-propargiltirosina sustituyen a 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 realizar una cicloadición [3+2] de Huisgen con un polímero soluble en agua que lleva un resto alquino o una formación de enlace amida con un polímero soluble en agua que lleva un éster arílico que, a su vez, incorpora un resto fosfina).

En una realización, el método incluye además incorporar en 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 limitarse a, hidroxialquilalmidón (HAS), hidroxietilalmidón (HES), un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un agente de fotoreticulación, un radionúclido, 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 soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, un resto que contiene metal, un resto radiactivo, un grupo funcional novedoso, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un resto fotoenjaulado, un resto excitable mediante radiación actínica, un resto fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, un resto 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 aminotioácido, un resto tóxico, un resto marcado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo de intercalación, 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 comprende 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 un resto alquinilo o azido y el segundo grupo reactivo es un resto azido o alquinilo. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto alquinilo (incluyendo, pero sin limitarse a, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto azido. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es el resto azido (incluyendo, pero sin limitarse a, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es el resto alquinilo.

En algunos casos, la(s) sustitución/sustituciones de aminoácido no codificado de manera natural se combinarán con otras adiciones, sustituciones o deleciones dentro del polipéptido bG-CSF para afectar a otros rasgos biológicos del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido bG-CSF o aumentar la afinidad del polipéptido bG-CSF para su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden potenciar la actividad biológica del polipéptido bG-CSF. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido bG-CSF. En algunas realizaciones, las adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido bG-CSF tras la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, se seleccionan sitios para la

sustitución con un aminoácido codificado de manera natural o no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado el aumento de la solubilidad del polipéptido tras la expresión en *E. coli* u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden otra adición, sustitución o delección que modula la afinidad para un receptor, proteínas de unión o ligando asociado, modula la transducción de señal tras la unión a un receptor, modula la semivida circulante, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una vía de administración particular. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF comprenden una adición, sustitución o delección que aumenta la afinidad de la variante de bG-CSF para su receptor. De manera similar, los polipéptidos bG-CSF pueden comprender secuencias de escisión química o por enzimas, secuencias de escisión por proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitarse a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitarse a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitarse a, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, activación o liberación de profármaco, reducción del tamaño de bG-CSF, u otros rasgos del polipéptido.

En algunas realizaciones, la sustitución de un aminoácido no codificado de manera natural genera un antagonista de bG-CSF. En algunas realizaciones, se sustituye o añade un aminoácido no codificado de manera natural en una región implicada en la unión a receptor. En algunas realizaciones, los antagonistas de bG-CSF comprenden al menos una sustitución que provoca que el bG-CSF actúe como antagonista. En algunas realizaciones, el antagonista de bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de manera natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión a receptor de la molécula de bG-CSF.

En algunas realizaciones, la sustitución de un aminoácido no codificado de manera natural genera un antagonista de bG-CSF. En algunas realizaciones, el antagonista de bG-CSF comprende un aminoácido no codificado de manera natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión a receptor de la molécula de bG-CSF.

En algunos casos, se sustituye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos por uno o más aminoácidos no codificados de manera natural. En algunos casos, el polipéptido bG-CSF incluye además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos que se producen de manera natural por uno o más aminoácidos no codificados de manera natural. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se sustituye uno o más residuos en bG-CSF por uno o más aminoácidos no codificados de manera natural. En algunos casos, el uno o más residuos no codificados de manera natural están unidos a uno o más PEG lineales o ramificados de menor peso molecular, potenciando así la afinidad de unión y la semivida en suero comparable con respecto a las especies unidas a un único PEG de mayor peso molecular.

En algunas realizaciones, se sustituyen hasta dos de los siguientes residuos de bG-CSF por uno o más aminoácidos no codificados de manera natural.

VII. Expresión en no eucariotas y eucariotas

Para obtener un alto nivel de expresión de un polinucleótido de bG-CSF clonado, normalmente se subclonan polinucleótidos que codifican para un polipéptido bG-CSF de la invención en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción, y si es para un ácido nucleico que codifica para una proteína, un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción. Los expertos en la técnica conocen promotores bacterianos adecuados y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al* y Ausubel *et al*.

Sistemas de expresión bacteriana para expresar polipéptidos bG-CSF de la invención están disponibles en, incluyendo, pero sin limitarse a, *E. coli*,

Bacillus sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, y *Salmonella* (Palva *et al*, Gen 22:229-235 (1983); Mosbach *et al*, Nature 302:543-545 (1983)). Hay kits para tales sistemas de expresión comercialmente disponibles. Los expertos en la técnica conocen sistemas de expresión eucariota para células de mamífero, levadura y células de insecto y también están comercialmente disponibles. En casos en los que se usan ARNt y aminoacil-ARNt sintetasas ortogonales (descritos anteriormente) para expresar los polipéptidos bG-CSF de la invención, se seleccionan células huésped para la expresión basándose en su capacidad para usar los componentes ortogonales. Células huésped a modo de ejemplo incluyen bacterias Gram-positivas (incluyendo, pero sin limitarse a *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. Pueden usarse células que comprenden pares de OARNt/O-RS según se describe en el presente documento.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad para sintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. En un aspecto, la composición incluye opcionalmente, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 miligramo, 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 puede lograrse con métodos de producción de proteínas *in vivo* (en el presente documento se proporcionan detalles sobre la producción y purificación de proteínas recombinantes). En otro aspecto, la proteína está opcionalmente presente en la composición en una concentración de, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 miligramo de proteína por litro, o al menos 10 miligramos de proteína por litro o más, en, incluyendo, pero sin limitarse a, un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (incluyendo, pero sin limitarse a, en un volumen de, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera desde aproximadamente 1 nl hasta aproximadamente 100 nl o más). La producción de grandes cantidades (incluyendo, pero sin limitarse a, mayor de lo que es normalmente posible con otros métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, traducción *in vitro*) de una proteína en una célula eucariota incluyendo al menos un aminoácido no natural es una característica de la invención.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad para biosintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. Por ejemplo, pueden producirse proteínas que comprenden un aminoácido no natural en una concentración de, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos 10 μ g/litro, al menos 50 μ g/litro, al menos 75 μ g/litro, al menos 100 μ g/litro, al menos 200 μ g/litro, al menos 250 μ g/litro, o al menos 500 μ g/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 proteína en un extracto celular, lisado celular, medio de cultivo, un tampón y/o similares.

Hay varios vectores adecuados para la expresión de bG-CSF comercialmente disponibles. Vectores de expresión útiles para huéspedes eucariota incluyen, pero no se limitan a, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Tales vectores incluyen pCDNA3.1(+)\Hyg

(Invitrogen, Carlsbad, Calif., EE.UU.) y pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., EE.UU.). Pueden usarse plásmidos bacterianos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pBR322, pET3a y pET12a, plásmidos de gama de huéspedes más amplia, tales como RP4, ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados de fago lambda, por ejemplo, NM989, y otros fagos de ADN, tales como M 13 y fagos de ADN monocatenario filamentoso. El plásmido 2□ y derivados del mismo, el vector POT1 (patente estadounidense n.º 4.931.373 que se incorpora como referencia), el vector pJSO37 descrito en (Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996) y pPICZ A, B o C (Invitrogen) pueden usarse con células huésped de levadura. Para células de insecto, los vectores incluyen pero no se limitan a, pVL941, pBG311 (Cate *et al.*, "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, págs. 685-698 (1986), pBluebac 4.5 y pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido bG-CSF también puede incluir o no una secuencia que codifica para un péptido señal. El péptido señal está presente cuando el polipéptido va a secretarse desde las células en las que se expresa. Tal péptido señal puede ser cualquier secuencia. El péptido señal puede ser procariota o eucariota. Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89-104) describe un péptido señal para su uso en células de mamífero (péptido señal de cadena ligera kappa de Ig murina). Otros péptidos señal incluyen pero no se limitan a, el péptido señal de factor α de *S. cerevisiae* (patente estadounidense n.º 4.870.008 que se incorpora como referencia al presente documento), el péptido señal de amilasa salival de ratón (O. Hagenbuchle *et al.*, Nature 289, 1981, págs. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificado (L. A. Vails *et al.*, Cell 48, 1987, págs. 887-897), el péptido señal BARI de levadura (documento WO 87/02670, que se incorpora como referencia al presente documento), y el péptido señal de proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (véase M. Egel-Mitani *et al.*, Yeast 6, 1990, págs. 127-137).

Ejemplos de células de mamífero adecuadas los conocen los expertos en la técnica. Tales células huésped puede 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), líneas celulares de riñón de hámster recién nacido (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 tisular. Estas líneas celulares y otras están disponibles a partir de depósitos públicos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Con el fin de proporcionar una glicosilación mejorada del polipéptido bG-CSF, puede modificarse una célula huésped de mamífero para que exprese sialil transferasa, por ejemplo 1,6-sialiltransferasa, por ejemplo según se describe en la patente estadounidense n.º 5.047.335, que se incorpora como referencia al presente documento.

Los métodos para la introducción de ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen pero no se limitan a, transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, vectores virales y los métodos de transfección descritos por Life Technologies Ltd, Paisley, R.U. usando Lipofectamin 2000 y Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, EE.UU. usando FuGENE 6. Estos métodos se conocen bien en la técnica y se describen por Ausbel *et al.* (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, EE.UU. El cultivo de células de mamífero puede realizarse según métodos establecidos, por ejemplo según se da a conocer 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

Pueden expresarse los polipéptidos bG-CSF en cualquier número de sistemas de expresión adecuados incluyendo, por ejemplo, células de levadura, insecto, células de mamífero y bacterias. Se facilita a continuación una descripción de sistemas de expresión a modo de ejemplo.

5

Levadura

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras que puede expresar un gen que codifica para un polipéptido bG-CSF. Tales levaduras incluyen, pero no se limitan a, levaduras *Ascosporogenous* (*Endomycetales*), levaduras *Basidiosporogenous* y levaduras pertenecientes al grupo *Fungi imperfecti* (*Blastomycetes*). Las levaduras *ascosporogenous* se dividen en dos familias, *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. Esta última se compone de cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoidae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoidae* y *Saccharomycoidae* (por ejemplo, géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras *Basidiosporogenous* incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, y *Filobasidiella*. Las levaduras pertenecientes 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 para su uso con la presente invención las especies dentro de los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenia*, *Torulopsis* y *Candida*, incluyendo, pero sin limitarse a, *P. pastoris*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* y *H. polymorpha*.

La selección de levaduras adecuadas para la expresión de polipéptidos bG-CSF está dentro del conocimiento de un experto en la

técnica. En la selección de huéspedes de levadura para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que han mostrado que tienen, por ejemplo, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, buena capacidad de secreción, buena producción de proteínas solubles y robustez global. Las levaduras están disponibles generalmente a partir de una variedad de fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, el Centro de Reserva Genética de Levaduras, Departamento de Biofísica y Física Médica, 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 levaduras que pueden usarse, o se han usado, como receptor para 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 idéntica por completo en morfología o en ADN genómico o total complementario al progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que son suficientemente similares a la célula parental que va a caracterizarse mediante la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido bG-CSF, están incluidos en la progenie pretendida mediante esta definición.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, incluyendo replicones extracromosómicos o vectores de integración, para su transformación en muchos huéspedes de levadura. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para *S. cerevisiae* (Sikorski *et al.*, GENETICS (1989) 122:19; Ito *et al.*, J. BACTERIOL. (1983) 153 : 163; Hinnen *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz *et al.*, MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze *et al.*, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25: 141); *H. polymorpha* (Gleeson *et al.*, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp *et al.*, MOL. GENETICS AND

GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das *et al.*, J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt *et al.*, J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg *et al.*, BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); *P. guillermondii* (Kunze *et al.*, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *P. pastoris* (patentes estadounidenses n.ºs 5.324.639; 4.929.555; y 4.837.148; Cregg *et al.*, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach *et al.*, NATURE (1982) 300:706); e *Y. lipolitica*; *A. nidulans* (Ballance *et al.*, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn *et al.*, GEN (1983) 26:205-221 ; y Yelton *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81: 1470-74); *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357), cada uno incorporado como referencia al presente documento.

Los expertos en la técnica conocen secuencias control para vectores de levadura e incluyen, pero no se limitan a, regiones promotoras de genes tales como alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP 0 284 044); enolasa; glucocinasa; glucosa-6-fosfato isomerasa; gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH); hexocinasa; fosfofructocinasa; 3-fosfoglicerato mutasa; y piruvato cinasa (PyK) (documento EP 0 329 203). El gen PHO5 de levadura, que codifica para fosfatasa ácida, también puede proporcionar secuencias promotoras útiles (Miyanochara *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). Otras secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura pueden incluir los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1980) 255: 12073); y otras enzimas glicolíticas, tales como piruvato descarboxilasa, triosa fosfato isomerasa, y fosfoglucosa isomerasa (Holland *et al.*, BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess *et al.*, J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). Los promotores inducibles de levadura que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento pueden incluir las regiones promotoras para 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 maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras en el documento EP 0 073 657.

5 También pueden usarse potenciadores de levadura con promotores de levadura. Además, los promotores sintéticos también pueden funcionar como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de activación en sentido 5' (UAS) de un promotor de levadura puede unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un
10 promotor híbrido sintético. Los ejemplos de tales promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH unida a la región de activación de la transcripción de GAP. Véanse las patentes estadounidenses n.^{os} 4.880.734 y 4.876.197, que se incorporan como referencia al presente documento. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que
15 consisten en las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PHO5, combinadas 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 que se producen de manera natural de origen distinto a levadura que tienen la
20 capacidad para unirse a 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 los genes de GAPDH o enolasa (Holland *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1981)
25 256:1385). Además, el origen de replicación del origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura. Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura. Véase Tschumper *et al.*, GEN (1980) 10:157; Kingsman *et al.*, GEN (1979) 7:141. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de
30 levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano. De manera

similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen Leu2.

Los expertos en la técnica conocen métodos de introducción de ADN exógeno en huéspedes de levadura, y normalmente incluyen, pero no se limitan a, o bien la transformación de esferoplastos o bien de células huésped de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la transformación de levadura según el método descrito en Hsiao *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 y Van Solingen *et al.*, J. BACT. (1977) 130:946. Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células tales como mediante inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplastos según se describe generalmente en SAMBROOK, *ET AL.*, MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Las células huésped de levadura pueden cultivarse entonces usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica conocen otros métodos para expresar proteínas heterólogas en células huésped de levadura. Véanse generalmente la publicación de patente estadounidense n.º 20020055169, las patentes estadounidenses n.ºs 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 estadounidenses reexaminadas n.ºs RE37.343 y RE35.749; las solicitudes de patente PCT publicadas WO 99/07862; WO 98/37208; y WO 98/26080; las solicitudes de patente europea 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. Véanse también Gellissen *et al.*, ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos *et al.*, YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7, cada uno incorporado como referencia al presente documento.

Las cepas huésped de levadura pueden hacerse crecer en fermentadores durante la fase de amplificación usando métodos de fermentación semicontinuos convencionales conocidos por los expertos en

la técnica. Los métodos de fermentación pueden adaptarse para tener en cuenta diferencias en una ruta de utilización de carbono o modo de control de la expresión del huésped de levadura particular. Por ejemplo, la fermentación de un huésped de levadura *Saccharomyces* puede requerir una única alimentación de glucosa, una fuente de nitrógeno compleja (por ejemplo, hidrolizados de caseína), y complementación con múltiples vitaminas. Por el contrario, la levadura metilotrófica *P. pastoris* puede requerir alimentaciones de glicerol, metanol y oligoelementos, pero sólo sales de amonio sencillas (nitrógeno) para una expresión y un crecimiento óptimos. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.324.639; Elliott *et al.*, J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; y Fieschko *et al.*, BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113, incorporados como referencia al presente documento.

Tales métodos de fermentación, sin embargo, pueden tener ciertas características comunes independientes de la cepa huésped de levadura empleada. Por ejemplo, un nutriente limitante del crecimiento, normalmente carbono, puede añadirse al fermentador durante la fase de amplificación para permitir un crecimiento máximo. Además, los métodos de fermentación emplean generalmente un medio de fermentación diseñado para contener cantidades adecuadas de carbono, nitrógeno, sales basales, fósforo y otros nutrientes minoritarios (vitaminas, oligoelementos y sales, etc.). Se describen ejemplos de medios de fermentación adecuados para su uso con *Pichia* en las patentes estadounidenses n.ºs 5.324.639 y 5.231.178, que se incorporan como referencia al presente documento.

Células de insecto infectadas por baculovirus

La expresión "huésped de insecto" o "célula huésped de insecto" se refiere a un insecto que puede usarse, o se ha usado, como receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula huésped de insecto original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser

necesariamente idéntica por completo en morfología o en ADN genómico o total complementario al progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que son suficientemente similares a la célula parental que va a caracterizarse mediante la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido bG-CSF, están incluidos en la progenie pretendida mediante esta definición.

La selección de células de insecto adecuadas para la expresión de polipéptidos bG-CSF la conocen los expertos en la técnica. Se describen bien varias especies de insecto en la técnica y están disponibles comercialmente incluyendo *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Al seleccionar huéspedes de insecto para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que han mostrado que tienen entre otros, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica y robustez global. Los insectos están disponibles generalmente a partir de una variedad de fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, el Centro de Reserva Genética de Insectos, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA), y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

Generalmente, los componentes de un sistema de expresión en insecto infectado por baculovirus incluyen un vector de transferencia, habitualmente un plásmido bacteriano, que contiene tanto un fragmento del genoma del baculovirus, como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen heterólogo que va a expresarse; 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 y medios de crecimiento apropiados. Los materiales, métodos y técnicas usados en la construcción de los vectores, la transfección de las células, la recogida de las placas, el crecimiento de células en cultivo, y similares se

conocen en la técnica y están disponibles manuales que describen estas técnicas.

Tras insertar el gen heterólogo en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral de tipo natural se transfectan en una célula huésped de insecto en la que se recombinan el vector y el genoma viral. Se expresa el virus recombinante empaquetado y se identifican y purifican las placas recombinantes. Están disponibles comercialmente materiales y métodos para sistemas de expresión en baculovirus/célula de insecto en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Estas técnicas las conocen generalmente los expertos en la técnica y se describen en detalle en SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987), incorporado al presente documento como referencia. Véase también, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16,9-16,11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); y O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

De hecho, la producción de diversas proteínas heterólogas usando sistemas de expresión en baculovirus/célula de insecto la conocen los expertos habituales en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 6.368.825; 6.342.216; 6.338.846; 6.261.805; 6.245.526; 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; documentos 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, que se incorporan como referencia al presente documento.

Se conocen en la técnica vectores que son útiles en sistemas de expresión en baculovirus/célula de insecto e incluyen, por ejemplo, vectores de transferencia y expresión en insectos derivados del virus de polihedrosis nuclear del baculovirus *Autographa californica* (VPNAc), que es un vector de expresión viral, independiente, auxiliar. Los vectores de expresión viral derivados de este sistema usan normalmente el promotor del gen de polihedrina viral fuerte para impulsar la expresión de genes heterólogos. Véase en general, O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

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

Un vector de transferencia usado comúnmente para introducir genes foráneos en VPNAc es pAc373. Se han diseñado también muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, pVL985, que altera el codón de iniciación de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases en el sentido de 3' respecto a ATT. Véase Luckow y Summers, VIROLOGY 170:31

(1989). Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Tras la inserción del gen heterólogo, el vector de transferencia y el
 5 genoma de baculovirus de tipo natural se transfectan conjuntamente en un
 huésped de células de insecto. Se conocen en la técnica métodos para
 introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus. Véase
 SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION
 BULLETIN NO. 1555 (1967); Smith *et al.*, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156;
 10 Luckow y Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Por ejemplo, la inserción
 puede ser en un gen tal como el gen de la polihedrina, mediante
 recombinación de sobrecruzamiento doble homóloga; la inserción también
 puede ser en un sitio de enzima de restricción diseñado mediante ingeniería
 genética en el gen de baculovirus deseado. Véase Miller *et al.*, BIOESSAYS
 15 (1989) 11(4):91.

La transfección puede lograrse mediante electroporación. Véase
 TROTTER Y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995);
 Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Alternativamente, pueden
 usarse liposomas para transfectar las células de insecto con el vector de
 20 expresión recombinante y el baculovirus. Véase, por ejemplo, Liebman *et al.*,
 BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves *et al.*, BIOCHEMISTRY (1998)
 37:6050; Nomura *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570; Schmidt *et al.*,
 PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert *et al.*,
 NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS ET AL., CELL BIOLOGY: A
 25 LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai *et al.*, PROTEIN
 EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin *et al.*, NATURE
 GENETICS (1997) 17:491; Kost *et al.*, GENE (1997) 190:139; Jakobsson *et al.*,
 J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1996)
 271(37):22376; Reverey *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10;
 30 Stanley *et al.*, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk *et al.*, J. VIROL. (1994)
 68(2):766; y Peng *et al.*, BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Los liposomas

disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, Cellfectin® y Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Además, puede usarse 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 contienen habitualmente un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN que puede unirse a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción en el sentido de 3' de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) para dar ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que está situada habitualmente de manera proximal al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor de baculovirus puede tener también un segundo dominio denominado potenciador que, si está presente, es habitualmente distal respecto al gen estructural. Además, la expresión puede ser o bien regulada o bien constitutiva.

Los genes estructurales, transcritos de manera abundante en momentos tardíos en el ciclo de infección, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica para la proteína polihedrina viral (FRIESEN ET AL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression en THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); documentos EP 0 127 839 y 0 155 476) y el gen que codifica para la proteína p10 (Vlak et al., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765).

El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta en un baculovirus recombinante infeccioso y posteriormente pueden purificarse las placas que crecen mediante técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica. Véase Miller et al, 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* (n.º de la ATCC CCL-125), *Bombyx mori* (n.º de la ATCC CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (n.º de la ATCC 1963), *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Véanse Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell *et al*, J. VIROL. (1985) 55:153; Smith *et al.*, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. Véase de manera general, Fraser *et al.*, IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Más específicamente, las líneas celulares usadas para sistemas de vector de expresión de baculovirus incluyen comúnmente, pero no se limitan a, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (n.º de la ATCC CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., n.º de cat. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-358 (*Trichopulsia ni*) y High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichopulsia ni*).

Están disponibles comercialmente células y medios de cultivo para la expresión tanto directa como por fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/expresión, y los expertos habituales en la técnica conocen generalmente la tecnología de cultivo celular.

Los expertos habituales en la técnica conocen *E. Coli*, especies de *Pseudomonas* y otras técnicas de expresión bacteriana en procariotas. Está disponible una amplia variedad de vectores para su uso en huéspedes bacterianos. Los vectores pueden ser de una única copia o vectores de muchas o pocas múltiples copias. Los vectores pueden servir para la clonación y/o expresión. En vista de la amplia bibliografía referente a vectores, la disponibilidad comercial de muchos vectores e incluso manuales que describen vectores y sus mapas de restricción y características, no se requiere en el presente documento una discusión extensa. Tal como se sabe bien, los vectores normalmente implican marcadores que permiten la selección, marcadores que pueden proporcionar resistencia a agentes citotóxicos, prototrofia o inmunidad. Frecuentemente, está presente una pluralidad de marcadores, que proporcionan diferentes características.

Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN que pueda unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción en el sentido de 3' de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) para dar ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que está situada habitualmente de manera proximal al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio denominado operador, que puede solaparse con un sitio de unión a ARN polimerasa en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite una transcripción regulada negativa (inducible), de modo que una proteína represora de genes puede unirse al operador e inhibir de ese modo la transcripción de un gen específico. Puede producirse expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, puede lograrse una regulación positiva mediante una secuencia de unión a proteínas activadoras de genes que, si está presente, es habitualmente proximal (5') respecto a la secuencia de unión a ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora de genes es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud *et al.*, ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Por tanto, la expresión regulada puede ser o bien positiva o bien negativa, o bien potenciando o bien reduciendo de ese modo la transcripción.

Las secuencias que codifican para enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang *et al.*, NATURE (1977) 198:1056], y maltosa. Los ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (trp) [Goeddel *et al.*] Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton *et al.*, NucL. ACIDS RES. (1981) 9:731; la patente estadounidense n.º 4.738.921; las

publicaciones EP n.ºs 036 776 y 121 775, que se incorporan como referencia al presente documento]. El sistema promotor de β -galactosidasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake *et al.*, NATURE (1981) 292: 128] y T5 [patente estadounidense n.º 4.689.406, que se incorporan como referencia al presente documento] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Los métodos preferidos de la presente invención utilizan promotores fuertes, tales como el promotor de T7 para inducir polipéptidos bG-CSF a altos niveles. Los expertos habituales en la técnica conocen ejemplos de tales vectores e incluyen la serie pET29 de Novagen, y los vectores pPOP descritos en el documento WO99/05297, que se incorpora como referencia al presente documento. Tales sistemas de expresión pueden producir altos niveles de polipéptidos bG-CSF en el huésped sin comprometer la viabilidad de la célula huésped ni los parámetros de crecimiento. pET19 (Novagen) es otro vector conocido en la técnica.

Además, promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, pueden unirse secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o de bacteriófago con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [patente estadounidense n.º 4.551.433, que se incorpora como referencia al presente documento]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor trp-lac híbrido compuesto tanto por el promotor trp como por secuencias de operón lac que está regulado por el represor lac [Amann *et al.*, GENE (1983) 25:167; de Boer *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores que se producen de manera natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. También puede acoplarse un promotor que se produce de manera natural de origen no bacteriano con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos

genes en procariotas. El sistema de promotor/ARN polimerasa de bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier *et al.*, J. MOL. BIOL. (1986) 189: 113; Tabor *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar compuesto por un promotor de bacteriófago y una región de operador de *E. coli* (publicación EP n.º 267 851).

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

La expresión "huésped bacteriano" o "célula huésped bacteriana" se refiere a una bacteria que puede usarse, o se ha usado, como receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula huésped bacteriana original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente idéntica por completo en morfología o en ADN total o genómico complementario al del progenitor original, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que es suficientemente similar al progenitor que va a caracterizarse mediante la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos

que codifica para un polipéptido bG-CSF, se incluye en la progenie pretendida mediante esta definición.

Los expertos habituales en la técnica conocen la selección de bacterias huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos bG-CSF. En la selección de huéspedes bacterianos para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que han mostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, baja actividad proteolítica y robustez global. Generalmente, están disponibles huéspedes bacterianos de una variedad de fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, el Centro de Reserva Genética Bacteriana, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA); y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA). La fermentación industrial/farmacéutica usa generalmente bacterias derivadas de cepas K (por ejemplo W3110) o de bacterias derivadas de cepas B (por ejemplo BL21). Estas cepas son particularmente útiles porque sus parámetros de crecimiento son extremadamente bien conocidos y robustos. Además, estas cepas no son patógenas, lo que es comercialmente importante por motivos de seguridad y medioambientales. Otros ejemplos de huéspedes de *E. coli* adecuados incluyen, pero no se limitan a, cepas de BL21, DHIOB o derivados en las mismas. En otra realización de los métodos de la presente invención, el huésped de *E. coli* es una cepa deficiente en proteasas incluyendo, pero sin limitarse a, OMP- y LON-. La cepa de célula huésped puede ser una especie de *Pseudomonas*, incluyendo pero sin limitarse a, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Se sabe que *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, designada como cepa MBIOL, es útil para la producción recombinante y está disponible para procesos de producción de proteínas terapéuticas. Los ejemplos de un sistema de expresión de *Pseudomonas* incluyen los sistemas disponibles de The Dow Chemical Company como cepa huésped (Midland, MI disponible en la World Wide Web en dow.com).

Una vez que se ha establecido una cepa de célula huésped recombinante (es decir, el constructo de expresión se ha introducido en la célula huésped y se aíslan células huésped con el constructo de expresión apropiado), se cultiva la cepa de célula huésped recombinante en condiciones apropiadas para la producción de polipéptidos bG-CSF. Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, el método de cultivo de la cepa de célula huésped recombinante dependerá de la naturaleza del constructo de expresión utilizado y la identidad de la célula huésped. Normalmente, se cultivan cepas huésped recombinantes usando métodos que conocen los expertos habituales en la técnica. Normalmente, se cultivan células huésped recombinantes en medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, y, opcionalmente, que contiene vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y otros complementos de cultivo proteicos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Los medios líquidos para el cultivo de células huésped pueden contener opcionalmente antibióticos o antifúngicos para impedir el crecimiento de microorganismos no deseados y/o compuestos que incluyen, pero no se limitan a, antibióticos para seleccionar células huésped que contienen el vector de expresión.

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

Los polipéptidos bG-CSF de la presente invención se purifican normalmente tras su expresión en sistemas recombinantes. El polipéptido bG-CSF puede purificarse a partir de células huésped o medio de cultivo mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. La patente estadounidense n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932, que se incorporan como referencia al presente documento en su totalidad,

describen la clonación de b-GCSF y análogos del mismo en células huésped y métodos de aislamiento y purificación. Los polipéptidos bG-CSF producidos en células huésped bacterianas pueden ser escasamente solubles o insolubles (en forma de cuerpos de inclusión). En una realización de la presente invención, pueden hacerse fácilmente sustituciones de aminoácidos en el polipéptido bG-CSF que se seleccionan con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína producida de manera recombinante utilizando los métodos dados a conocer en el presente documento así como los conocidos en la técnica. En el caso de una proteína insoluble, la proteína puede recogerse de lisados de células huésped mediante centrifugación y a esto le puede seguir además la homogeneización de las células. En el caso de una proteína escasamente soluble, pueden añadirse compuestos que incluyen, pero no se limitan a, polietiliminina (PEI) para inducir la precipitación de la proteína parcialmente soluble. La proteína precipitada puede recogerse entonces de manera conveniente mediante centrifugación. Pueden romperse u homogeneizarse las células huésped recombinantes para liberar los cuerpos de inclusión del interior de las células usando una variedad de métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. La ruptura u homogeneización de las células huésped puede realizarse usando técnicas bien conocidas incluyendo, pero sin limitarse a, ruptura enzimática de células, sonicación, homogeneización Dounce o ruptura con liberación a alta presión. En una realización del método de la presente invención, se usa 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 de polipéptido bG-CSF, puede ser ventajoso minimizar el tiempo de homogeneización en repeticiones con el fin de maximizar el rendimiento de cuerpos de inclusión sin pérdida debida a factores tales como solubilización, cizallamiento mecánico o proteólisis.

Entonces, el polipéptido bG-CSF insoluble o precipitado puede solubilizarse usando cualquiera de varios agentes de solubilización adecuados conocidos en la técnica. El polipéptido bG-CSF puede

solubilizarse con urea o clorhidrato de guanidina. El volumen del polipéptido bG-CSF solubilizado debe minimizarse de modo que puedan producirse lotes grandes usando tamaños de lote convenientemente manejables. Este factor puede ser significativo en un entorno comercial a gran escala en el que el huésped recombinante puede hacerse crecer en lotes que tienen un volumen de miles de litros. Además, cuando se fabrica el polipéptido bG-CSF en un entorno comercial a gran escala, en particular para usos farmacéuticos en seres humanos, debe evitarse, si es posible, la evitación de compuestos químicos agresivos que puedan dañar la maquinaria y el recipiente, o el propio producto proteico. Se ha mostrado en el método de la presente invención que puede usarse un agente desnaturizante más suave, urea, para solubilizar los cuerpos de inclusión de polipéptido bG-CSF en lugar del agente desnaturizante más agresivo clorhidrato de guanidina. El uso de urea reduce significativamente el riesgo de daño al equipo de acero inoxidable utilizado en el proceso de fabricación y purificación del polipéptido bG-CSF mientras que solubiliza eficazmente los cuerpos de inclusión del polipéptido bG-CSF.

En el caso de una proteína bG-CSF soluble, puede secretarse bG-CSF en el espacio periplásmico o en el medio de cultivo. Además, puede estar presente bG-CSF soluble en el citoplasma de las células huésped. Puede desearse concentrar bG-CSF soluble antes de llevar a cabo las etapas de purificación. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la técnica para concentrar bG-CSF soluble a partir de, por ejemplo, medio de cultivo o lisados celulares. Además, pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la técnica para romper las células huésped y liberar bG-CSF soluble del citoplasma o espacio periplásmico de las células huésped.

Cuando se produce el polipéptido bG-CSF como una proteína de fusión, puede eliminarse la secuencia de fusión. La eliminación de una secuencia de fusión puede lograrse mediante escisión enzimática o química. La eliminación enzimática de secuencias de fusión puede lograrse usando

métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. La elección de la enzima para la eliminación de la secuencia de fusión estará determinada por la identidad de la fusión, y las condiciones de reacción estarán especificadas por la elección de la enzima tal como resultará evidente para un experto habitual en la técnica. La escisión química puede lograrse usando reactivos conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, bromuro de cianógeno, proteasa TEV y otros reactivos. El polipéptido bG-CSF escindido puede purificarse de la secuencia de fusión escindida mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Tales métodos se determinarán mediante la identidad y las propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido bG-CSF, tal como resultará evidente para un experto habitual en la técnica. Los métodos para la purificación pueden incluir, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico o diálisis o cualquier combinación de las mismas.

El polipéptido bG-CSF también puede purificarse para eliminar ADN de la disolución de proteína. El ADN puede eliminarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como precipitación o cromatografía de intercambio iónico, aunque puede eliminarse mediante precipitación con un agente de precipitación de ácido nucleico tal como, pero sin limitarse a, sulfato de protamina. El polipéptido bG-CSF puede separarse del ADN precipitado usando métodos bien conocidos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación o filtración. La eliminación de las moléculas de ácido nucleico del huésped es un factor importante en un entorno en el que el polipéptido bG-CSF va a usarse para tratar animales o seres humanos y los métodos de la presente invención reducen el ADN de la célula huésped hasta niveles farmacéuticamente aceptables.

Pueden usarse también métodos para la fermentación a pequeña escala o a gran escala en la expresión de proteínas, incluyendo pero sin limitarse a, fermentadores, matraces oscilantes, biorreactores de lecho

fluidizado, biorreactores de fibra hueca, sistemas de cultivo de frascos rotativos y sistemas de biorreactor de tanque agitado. Cada uno de estos métodos puede realizarse en un proceso en modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

5 Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden recuperarse generalmente usando métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, el medio de cultivo o lisado celular puede centrifugarse o filtrarse para eliminar desechos celulares. El sobrenadante puede concentrarse o diluirse hasta un volumen deseado o someterse a diafiltración en un tampón adecuado para
10 acondicionar la preparación para la purificación adicional. La purificación adicional del polipéptido bG-CSF de la presente invención incluye separar formas desamidadas y cortadas de la variante de polipéptido bG-CSF de la forma intacta.

Puede emplearse cualquiera de los siguientes procedimientos a modo de ejemplo para la purificación de polipéptidos bG-CSF de la invención:
15 cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo pero sin limitarse a, DEAE SEPHAROSE); cromatografía sobre sílice; cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo pero sin limitarse a, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba;
20 cromatografía de exclusión molecular; cromatografía de quelatos metálicos; ultrafiltración/diafiltración; precipitación con etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo pero sin limitarse a isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitarse a precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.
25

Las proteínas de la presente invención, incluyendo pero sin limitarse a, proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, péptidos que comprenden aminoácidos no naturales, anticuerpos frente a proteínas que
30 comprenden aminoácidos no naturales, parejas de unión para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, etc., pueden purificarse, o bien

parcial o bien sustancialmente hasta homogeneidad, según procedimientos convencionales conocidos y usados por los expertos habituales en la técnica. Por consiguiente, pueden recuperarse y purificarse polipéptidos de la invención mediante cualquiera de varios métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos o bases, cromatografía en columna, cromatografía en columna de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía con lectinas, electroforesis en gel y similares. Pueden usarse etapas de replegamiento de proteínas, según se desee, en la preparación de proteínas maduras correctamente plegadas. Puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de afinidad u otros métodos adecuados en etapas de purificación finales en las que se desea alta pureza. En una realización, se usan anticuerpos preparados contra aminoácidos no naturales (o proteínas o péptidos que comprenden aminoácidos no naturales) como reactivos de purificación, incluyendo pero sin limitarse a, para la purificación basada en afinidad de proteínas o péptidos que comprenden uno o más aminoácido(s) no natural(es). Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad, según se desee, los polipéptidos se usan opcionalmente para una amplia variedad de utilidades, incluyendo pero sin limitarse a, como componentes de ensayos, reactivos de investigación, diagnóstico, profilaxis, terapéuticos y/o como inmunógenos para la producción de anticuerpos. Pueden obtenerse anticuerpos generados contra polipéptidos de la presente invención administrando los polipéptidos o fragmentos que llevan epítomos, o células a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos de rutina. Un experto habitual en la técnica podría generar anticuerpos usando una variedad de técnicas conocidas. Además, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos

descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos. También pueden emplearse anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención para tratar enfermedades.

5 Pueden usarse también polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención como vacunas. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir una respuesta
10 inmunitaria de anticuerpos y/o células T, incluyendo, por ejemplo, células T citotóxicas o células T productoras de citocinas, para proteger a dicho animal frente a la enfermedad, esté ya establecida esa enfermedad en el individuo o no. También puede inducirse una respuesta inmunológica en un mamífero mediante un método que comprende administrar un polipéptido de
15 la presente invención por medio de un vector que dirige la expresión del polinucleótido y que codifica para el polipéptido *in vivo* con el fin de inducir una respuesta inmunológica de este tipo para producir anticuerpos para proteger a dicho animal frente a enfermedades de la invención. Un modo de administrar el vector es acelerándolo al interior de las células deseadas
20 como recubrimiento sobre partículas o de otra forma. Un vector de ácido nucleico de este tipo puede comprender ADN, ARN, un ácido nucleico modificado, o un híbrido de ADN/ARN. Para su uso como vacuna, se proporcionará normalmente un polipéptido o un vector de ácido nucleico como formulación de vacuna (composición). La formulación puede
25 comprender además un vehículo adecuado. Puesto que un polipéptido puede descomponerse en el estómago, puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no
30 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 puede incluir también sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación que conocen los expertos habituales en la técnica. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y puede determinarse fácilmente mediante experimentación de rutina.

Además de otras referencias indicadas en el presente documento, los expertos en la técnica conocen una variedad de métodos de plegamiento de proteínas/purificación, incluyendo, pero sin limitarse a, 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 *et al.* (1996) *Protein Methods*, 2ª 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, Inglaterra; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª 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 CD-ROM* Humana Press, NJ; y las referencias citadas en los mismos.

Una ventaja de la producción de una proteína o un polipéptido de interés con un aminoácido no natural en una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota es que normalmente las proteínas o los polipéptidos se plegarán en sus conformaciones nativas. Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención, los expertos en la técnica reconocerán que, tras la síntesis, expresión y/o purificación, las proteínas o los péptidos pueden tener una conformación diferente de las conformaciones deseadas de los polipéptidos relevantes. En un aspecto de la invención, la proteína o el polipéptido expresado se desnaturaliza opcionalmente y luego se

renaturaliza. Esto se logra utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, mediante la adición de una chaperonina a la proteína o el polipéptido de interés, mediante la solubilización de las proteínas en un agente caotrópico tal como guanidina HCl, la utilización de
5 proteína disulfuro isomerasa, etc.

En general, en ocasiones es deseable desnaturalizar y reducir los polipéptidos expresados y entonces provocar que los polipéptidos vuelvan a plegarse en la conformación preferida. Por ejemplo, puede añadirse guanidina, urea, DTT, DTE y/o una chaperonina a un producto de traducción
10 de interés. Los expertos en la técnica conocen métodos de reducción, desnaturalización y renaturalización de proteínas (véanse las referencias anteriores y Debinski, *et al.* (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; y Buchner, *et al.*, (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski, *et al.*, por ejemplo,
15 describen la desnaturalización y reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. Las proteínas pueden volverse a plegar en un tampón redox que contiene, incluyendo pero sin limitarse a, glutatión oxidado y L-arginina. Los reactivos de replegamiento pueden hacerse fluir o moverse de otra forma para ponerlos en contacto con uno o más
20 polipéptidos u otro producto de expresión, o viceversa.

En el caso de la producción procariota de polipéptido bG-CSF, el polipéptido bG-CSF así producido puede estar plegado de manera errónea y por tanto carece de o tiene una actividad biológica reducida. La bioactividad de la proteína puede restaurarse mediante "replegamiento". En general, el
25 polipéptido bG-CSF plegado de manera errónea vuelve a plegarse mediante solubilización (cuando el polipéptido bG-CSF es también insoluble), despliegue y reducción de la cadena de polipéptido usando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (por ejemplo urea y/o guanidina) y un agente reductor que puede reducir enlaces disulfuro (por ejemplo ditioneitol, DTT o
30 2-mercaptoetanol, 2-ME). A una concentración moderada de agente caotrópico, se añade entonces un agente oxidante (por ejemplo, oxígeno,

cistina o cistamina), que permite que vuelvan a formarse los enlaces disulfuro. El polipéptido bG-CSF puede volverse a plegar usando métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.511.502, 4.511.503 y 4.512.922, que se incorporan como referencia al presente documento. El polipéptido bG-CSF también puede plegarse conjuntamente con otras proteínas para formar heterodímeros o heteromultímeros.

Tras el replegamiento, el bG-CSF puede purificarse adicionalmente. La purificación de bG-CSF puede lograrse usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica, incluyendo cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, cromatografía de afinidad, y similares o cualquier combinación de los mismos. La purificación adicional también puede incluir una etapa de secado o precipitación de la proteína purificada.

Tras la purificación, bG-CSF puede intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, diafiltración y diálisis. bG-CSF que se proporciona como una única proteína purificada puede verse sometido a agregación y precipitación.

El bG-CSF purificado puede ser puro en al menos el 90% (tal como se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, RP-HPLC, o electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida, SDS-PAGE) o puro en al menos el 95%, o puro en al menos el 98%, o puro en al menos el 99% o más. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza del bG-CSF, el bG-CSF es suficientemente puro para su uso como producto farmacéutico o para procesamiento adicional, tal como conjugación con un polímero soluble en agua tal como PEG.

Pueden usarse ciertas moléculas de bG-CSF como agentes terapéuticos en ausencia de otros principios activos o proteínas (distintos de

excipientes, vehículos y estabilizantes, albúmina sérica y similares), o pueden complejarse con otra proteína o un polímero.

Métodos de purificación generales

5 Puede realizarse una cualquiera de una variedad de etapas de aislamiento en el lisado celular, extracto, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células huésped, citoplasma de las células huésped, u otro material, que comprende polipéptido bG-CSF o en cualquier mezcla de polipéptido bG-CSF que resulte de cualquier etapa de
10 aislamiento incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC"), HPLC de fase inversa ("RP-HPLC), adsorción en lecho expandido, o cualquier combinación y/o repetición de las mismas y en
15 cualquier orden apropiado.

 El equipo y otros materiales necesarios usados en la realización de las técnicas descritas en el presente documento están disponibles comercialmente. Están disponibles bombas, colectores de fracciones, monitores, registradores y sistemas completos de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y
20 Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ). También están disponibles de tales compañías materiales cromatográficos incluyendo, pero sin limitarse a, materiales de matriz de intercambio, medios y tampones.

 La equilibración, y otras etapas en los procesos de cromatografía en columna descritos en el presente documento tales como lavado y elución, pueden lograrse más rápidamente usando equipo especializado tal como una bomba. Las bombas disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, la bomba HILO AD® P-50, la bomba peristáltica P-I, la bomba P-901 y la bomba P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

30 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 están disponibles mezcladoras para formar gradientes de concentración lineales y de pH. Las mezcladoras disponibles comerciales incluyen la mezcladora Gradient GM-I y mezcladoras In-Line (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El proceso cromatográfico puede monitorizarse usando cualquier monitor disponible comercialmente. Tales monitores pueden usarse para reunir información como UV, pH y conductividad. Los ejemplos de detectores incluyen el monitor UV-I, UVICORD® S II, el monitor UV-M II, el monitor UV-900, el monitor UPC-900, el monitor pH/C-900 y el monitor de conductividad (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). De hecho, están disponibles comercialmente sistemas completos incluyendo los diversos sistemas AKTA® de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

En una realización de la presente invención, por ejemplo, el polipéptido bG-CSF puede reducirse y desnaturalizarse desnaturalizando en primer lugar el polipéptido bG-CSF purificado resultante en urea, seguido por dilución con tampón TRIS que contiene un agente reductor (tal como DTT) a un pH adecuado. En otra realización, el polipéptido bG-CSF se desnaturaliza en urea en un intervalo de concentración de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 9 M, seguido por dilución con tampón TRIS a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. La mezcla de replegamiento de esta realización puede incubarse entonces. En una realización, la mezcla de replegamiento se incuba a temperatura ambiente durante de cuatro a veinticuatro horas. La mezcla de polipéptido bG-CSF reducido y desnaturalizado puede entonces aislarse o purificarse adicionalmente.

Tal 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 del mismo puede concentrarse usando técnicas conocidas en la técnica. Además, el tampón de elución que

comprende la primera mezcla de polipéptido bG-CSF o cualquier mezcla posterior del mismo puede intercambiarse por un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento usando técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica.

5

Cromatografía de intercambio iónico

En una realización, y como etapa adicional, opcional, puede realizarse una cromatografía 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 comercialmente incluyen las columnas HITRAP®, HIPREP® y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tales columnas utilizan intercambiadores aniónicos fuertes tales como Q SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance y Q SEPHAROSE® XL; intercambiadores catiónicos fuertes tales como SP SEPHAROSE® High Performance, SP SEPHAROSE® Fast Flow y SP SEPHAROSE® XL; intercambiadores aniónicos débiles tales como DEAE SEPHAROSE® Fast Flow; e intercambiadores catiónicos débiles tales como CM SEPHAROSE® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La cromatografía en columna de intercambio aniónico o catiónico puede realizarse con el polipéptido bG-CSF en cualquier fase del proceso de purificación para aislar polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado. La etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse usando cualquier matriz de intercambio catiónico adecuada. Las matrices de intercambio catiónico útiles incluyen, pero no se limitan a, materiales de matriz de intercambio catiónico fibrosos, porosos, no porosos, microgranulares, en perlas o reticulados. Tales materiales de matriz de intercambio catiónico incluyen, pero no se limitan a, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice, poliéter o materiales compuestos de cualquiera de los anteriores.

30

La matriz de intercambio catiónico puede ser cualquier intercambiador catiónico adecuado incluyendo intercambiadores catiónicos fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes pueden permanecer ionizados a lo largo de un amplio intervalo de pH y, por tanto, pueden ser capaces de unirse a bG-CSF a lo largo de un amplio intervalo de pH. Sin embargo, los intercambiadores catiónicos débiles pueden perder la ionización como una función del pH. Por ejemplo, un intercambiador catiónico débil puede perder la carga cuando el pH disminuye por debajo de aproximadamente pH 4 o pH 5. Los intercambiadores catiónicos fuertes adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos funcionales cargados tales como sulfopropilo (SP), metilsulfonato (S) o sulfoetilo (SE). La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, que tiene preferiblemente un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,0. Alternativamente, el intercambiador catiónico fuerte 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 catiónico fuerte que tiene un pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 3,0. Alternativamente, la matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, que tiene preferiblemente 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 catiónico fuerte que tiene preferiblemente un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,5. Alternativamente, el intercambiador catiónico fuerte puede tener un intervalo de pH de unión a bG-CSF de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 12,0.

Antes de cargar el bG-CSF, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse, por ejemplo, usando varios volúmenes de columna de un ácido débil, diluido, por ejemplo, cuatro volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3. Tras la equilibración, puede añadirse el bG-CSF y la columna puede lavarse de una a varias veces, antes de la elución de bG-CSF

sustancialmente purificado, usando también una disolución de ácido débil tal como una disolución de ácido fosfórico o ácido acético débil. Por ejemplo, pueden usarse aproximadamente 2-4 volúmenes de columna de ácido acético 20 mM, pH 3, para lavar la columna. Pueden usarse también lavados adicionales usando, por ejemplo, 2-4 volúmenes de columna de acetato de sodio 0,05 M, pH 5,5, o acetato de sodio 0,05 M mezclado con cloruro de sodio 0,1 M, pH 5,5. Alternativamente, usando métodos conocidos en la técnica, la matriz de intercambio catiónico puede equilibrarse usando varios volúmenes de columna de una base débil, diluida.

Alternativamente, puede eluirse bG-CSF sustancialmente purificado poniendo en contacto la matriz de intercambiador catiónico con un tampón que tiene una fuerza iónica o un pH suficientemente bajo como para desplazar el bG-CSF de la matriz. El pH del tampón de elución puede oscilar desde aproximadamente pH 2,5 hasta aproximadamente pH 6,0. Más específicamente, el pH del tampón de elución puede oscilar desde aproximadamente pH 2,5 hasta 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 del tampón de elución puede variar ampliamente y generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 volúmenes de columna.

Tras la adsorción del polipéptido bG-CSF a la matriz de intercambiador catiónico, puede eluirse el polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado poniendo en contacto la matriz con un tampón que tiene una fuerza iónica o un pH suficientemente alto como 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 limitarse a, tampones citrato, fosfato, formiato, acetato, HEPES y MES que oscilan en concentración desde al menos aproximadamente 5 mM hasta al menos aproximadamente 100 mM.

Puede realizarse cromatografía de fase inversa, RP-HPLC, para purificar proteínas siguiendo protocolos adecuados que conocen los expertos habituales en la técnica. Véanse, por ejemplo, Pearson *et al.*, ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier *et al.*, J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani *et al.*, J. CHROM. (1986) 359:391-402. Puede realizarse RP-HPLC con el polipéptido bG-CSF para aislar polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado. En este sentido, pueden usarse resinas derivatizadas con sílice con funcionalidades alquilo con una amplia variedad de longitudes, incluyendo, pero sin limitarse a, resinas de al menos aproximadamente C₃ a al menos aproximadamente C₃₀, de al menos aproximadamente C₃ a al menos aproximadamente C₂₀, o de al menos aproximadamente C₃ a al menos aproximadamente C₁₈. Alternativamente, puede usarse una resina polimérica. Por ejemplo, puede usarse la resina TosoHaas Amberchrome CGIOOOsd, que es una resina de polímero de estireno. Pueden usarse también resinas ciano o poliméricas con una amplia variedad de longitudes de cadena de alquilo. Además, la columna de RP-HPLC puede lavarse con un disolvente tal como etanol. La columna Source RP es otro ejemplo de una columna de RP-HPLC.

Puede usarse un tampón de elución adecuado que contiene un agente de apareamiento iónico adecuado 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 apareamiento iónico usados más comúnmente incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido fórmico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido heptafluorobutírico, trietilamina, acetato de tetrametilamonio, tetrabutilamonio y trietilamonio. La elución puede realizarse usando uno o más gradientes o condiciones isocráticas, prefiriéndose las condiciones de gradiente para reducir el tiempo de separación y para disminuir la anchura de los picos. Otro método 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 no se limitan a, disoluciones de acetato de amonio y acetonitrilo.

Técnicas de purificación mediante cromatografía de interacción hidrófoba

5 Puede realizarse cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) con 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) que se incorpora como referencia al presente documento. Las matrices de HIC adecuadas
10 pueden incluir, pero no se limitan a, matrices sustituidas con alquilo o arilo, tales como matrices sustituidas con butilo, hexilo, octilo o fenilo incluyendo matrices de agarosa, agarosa reticulada, Sepharose, celulosa, sílice, dextrano, poliestireno, poli(metacrilato), y resinas en modo mezclado, incluyendo pero sin limitarse a, una resina de polietilenamina o una matriz
15 de poli(metacrilato) sustituida con butilo o fenilo. Las fuentes disponibles comercialmente para la cromatografía en columna de interacción hidrófoba incluyen, pero no se limitan a, columnas HITRAP®, HIPREP® e HILO AD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

 En resumen, antes de la carga, la columna de HIC puede equilibrarse
20 usando tampones convencionales conocidos por los expertos habituales en la técnica, tales como una disolución de ácido acético/cloruro de sodio o HEPES que contiene sulfato de amonio. Puede usarse sulfato de amonio como tampón para cargar la columna de HIC. Tras cargar el polipéptido bG-CSF, la columna puede lavarse entonces usando condiciones y tampones
25 convencionales para eliminar materiales no deseados pero conservando el polipéptido bG-CSF en la columna de HIC. El polipéptido bG-CSF puede eluirse con de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 volúmenes de columna de un tampón convencional, tal como un tampón HEPES que contiene EDTA y una concentración de sulfato de amonio inferior que el
30 tampón de equilibración, o un tampón de ácido acético/cloruro de sodio, entre otros. Puede usarse también un gradiente salino 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. Puede utilizarse diafiltración para eliminar la sal usada para eluir el polipéptido bG-CSF.

Otras técnicas de purificación

Puede realizarse aún otra etapa de aislamiento usando, por ejemplo, filtración en gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (n.º de cat. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) que se incorpora como referencia al presente documento, cromatografía en hidroxiapatita (las matrices adecuadas incluyen, pero no se limitan a, HA-Ultrogel, High Resolution (Calbiochem), hidroxiapatita cerámica CHT (BioRad), hidroxiapatita Bio - Gel HTP (BioRad)), HPLC, adsorción en lecho expandido, ultrafiltración, diafiltración, liofilización y similares, en la primera mezcla de polipéptido bG-CSF o cualquier mezcla posterior del mismo, para eliminar cualquier sal en exceso y para reemplazar el tampón por un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento o incluso la formulación del producto terminado final.

El rendimiento de polipéptido bG-CSF, incluyendo polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado, puede monitorizarse en cada etapa descrita en el presente documento usando técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica. Tales técnicas pueden usarse también para evaluar el rendimiento de polipéptido bG-CSF sustancialmente purificado tras la última etapa de aislamiento. Por ejemplo, el rendimiento de polipéptido bG-CSF puede monitorizarse usando cualquiera de varias columnas de cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa, que tienen una variedad de longitudes de cadena de alquilo tales como ciano-RP-HPLC, C₁₈RP-HPLC; así como HPLC de intercambio catiónico y HPLC de filtración en gel.

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

La pureza puede determinarse usando técnicas convencionales, tales como SDS-PAGE, o midiendo el polipéptido bG-CSF usando ensayos de inmunotransferencia de tipo Western y ELISA. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos policlonales contra proteínas aisladas de la fermentación de levaduras de control negativo y la recuperación de intercambio catiónico. Los anticuerpos también pueden usarse para estudiar con sonda la presencia de proteínas contaminantes de la célula huésped.

El material de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, cuyas superficies portan cadenas de alquilo C4. La separación del polipéptido bG-CSF de las impurezas proteicas se basa en diferencias en la fuerza de interacciones hidrófobas. La elución se realiza con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Se realiza HPLC preparativa usando una columna de acero inoxidable (rellena de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluato de hidroxipatita Ultrogel se acidifica añadiendo 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. Se recogen fracciones y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato. Se agrupan las fracciones de polipéptido bG-CSF que están dentro de los límites de IPC.

5 El material de DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE) que se unen de forma covalente a la superficie de perlas de Sepharose. 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 retenerse. Tras haberse eliminado por lavado estas sustancias, se eliminan impurezas traza lavando
10 la columna con tampón acetato a pH bajo. Entonces, se lava la columna con tampón fosfato neutro y se eluye el polipéptido bG-CSF con un tampón con fuerza iónica aumentada. La columna se empaqueta con DEAE Sepharose fast flow. Se ajusta el volumen de columna para garantizar una carga de polipéptido bG-CSF en el intervalo de 3-10 mg de polipéptido bG-CSF/ml de gel.
15 La columna se lava con agua y tampón de equilibración (fosfato de potasio/sodio). Se cargan las fracciones agrupadas del eluato de HPLC y se lava la columna con tampón de equilibración. Entonces se lava la columna con tampón de lavado (tampón acetato de sodio) seguido por lavado con tampón de equilibración. Posteriormente, se eluye el polipéptido bG-CSF de
20 la columna con tampón de elución (cloruro de sodio, fosfato de potasio/sodio) y se recoge en una única fracción según el perfil de elución principal. El eluato de la columna de DEAE Sepharose se ajusta a la conductividad especificada. El principio activo resultante se esteriliza por filtración en botellas de teflón y se almacena a -70°C.

25 Los métodos adicionales que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, etapas para eliminar endotoxinas. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) que se ubican en la membrana externa de células huésped Gram-negativas, tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*. Un experto habitual en la técnica conoce métodos para reducir los niveles de
30 endotoxinas e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de purificación usando soportes de sílice, polvo de vidrio o cromatografía en hidroxiapatita, de fase

inversa, de afinidad, de exclusión molecular, de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una combinación de estos métodos y similares. Pueden requerirse modificaciones o métodos adicionales para eliminar contaminantes tales como migración conjunta de proteínas del polipéptido de interés. Un experto habitual en la técnica conoce métodos para medir los niveles de endotoxinas e incluyen, pero no se limitan a, ensayos con lisado de amebocito de *Limulus* (LAL). El ensayo Endosafe™-PTS es un sistema colorimétrico, de un único tubo que utiliza cartuchos precargados con reactivo LAL, sustrato cromogénico y endotoxina convencional de control junto con un espectrofotómetro manual. Los métodos alternativos incluyen, pero no se limitan a, un método de LAL cinético que es turbidimétrico y usa un formato de 96 pocillos.

Puede usarse 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 manera natural, incluyendo pero sin limitarse a, el ensayo Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE con tinción con plata, SDS-PAGE con tinción de Coomassie, espectrometría de masas (incluyendo pero sin limitarse a, MALDI-TOF) y otros métodos para caracterizar proteínas conocidos por un experto habitual en la técnica.

Los métodos adicionales incluyen, pero no se limitan a: SDS-PAGE acoplada con métodos de tinción de proteínas, inmunotransferencia, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-EM), cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, isoelectroenfoque, intercambio aniónico analítico, cromatoenfoque y dicroísmo circular.

VIII. Expresión en sistemas alternativos

Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células huésped no recombinantes, células huésped mutagenizadas o en sistemas libres de células. Estos sistemas también son adecuados para su uso en la preparación de los polipéptidos

bG-CSF de la presente invención. La derivatización de aminoácidos con cadenas laterales reactivas tales como Lys, Cys y Tyr dio como resultado la conversión de lisina en N²-acetil-lisina. La síntesis química también proporciona un método sencillo para incorporar aminoácidos no naturales.

5 Con el reciente desarrollo de la ligación enzimática y la ligación química nativa de fragmentos de péptidos, es posible preparar proteínas más grandes. Véase, por ejemplo, P. E. Dawson y S. B. H. Kent, Annu. Rev. Biochem. 69:923 (2000). La ligación química de péptidos y la ligación química nativa se describen en la patente estadounidense n.º 6.184.344, la

10 publicación de patente estadounidense n.º 2004/0138412, la publicación de patente estadounidense n.º 2003/0208043, el documento WO 02/098902 y el documento WO 03/042235, que se incorporan como referencia al presente documento. Se ha usado un método biosintético *in vitro* general en el que se añade un ARNt supresor acilado químicamente con el aminoácido

15 no natural deseado a un extracto *in vitro* que puede soportar la biosíntesis de proteínas, para incorporar de manera específica del sitio más de 100 aminoácidos no naturales en una variedad de proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véanse, por ejemplo, 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

20 (1989); y J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dila, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, J. Am. Chem. Soc. 111:8013-8014 (1989). Se ha introducido una gran gama de grupos funcionales en proteínas para estudios de

25 estabilidad de proteínas, plegamiento de proteínas, mecanismo enzimático y transducción de señales.

Se desarrolló un método *in vivo*, denominado incorporación por presión selectiva, para aprovechar la promiscuidad de las sintetisas de tipo

30 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 hace crecer

una cepa auxótrofa, en la que la ruta metabólica relevante que suministra a la célula un aminoácido natural particular está inactivada, en medio mínimo que contiene concentraciones limitadas del aminoácido natural, mientras que la transcripción del gen diana está inhibida. Al comienzo de una fase de crecimiento estacionario, el aminoácido natural se agota y se reemplaza por el análogo de aminoácido no natural. La inducción de la expresión de la proteína recombinante da como resultado 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 UV que se identifican fácilmente, véase, por ejemplo, C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); se ha usado trifluorometionina para reemplazar la metionina en lisozima de bacteriófago T4 para estudiar su interacción con ligandos de quitooligosacárido mediante ^{19}F -RMN, véase, por ejemplo, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); y se ha incorporado trifluoroleucina en lugar de leucina, dando como resultado un aumento de la estabilidad térmica y química de una proteína con cremallera de leucina. Véase, por ejemplo, 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, se incorporan selenometionina y telurometionina en diversas proteínas recombinantes para facilitar la resolución de fases en cristalografía de rayos X. Véanse, por ejemplo, W. A. Hendrickson, J. R. Hoiton y D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebiada y M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann y R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); y N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder y R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). También se han incorporado eficazmente en análogos de metionina funcionalidades alqueno o alquino, lo que permite la modificación adicional de proteínas por medios químicos. Véanse, 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); patente estadounidense n.º 6.586.207; publicación de patente estadounidense 2002/0042097, que se incorporan como referencia al presente documento.

El éxito de este método depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por aminoacil-ARNt sintetasas, que, en general, requieren alta selectividad para garantizar la fidelidad de la traducción de proteínas. Un modo de expandir el alcance de este método es relajar la especificidad de sustrato de las aminoacil-ARNt sintetasas, lo que se ha logrado en un número limitado de casos. Por ejemplo, la sustitución de Ala²⁹⁴ por Gly en fenilalanil-ARNt sintetasa (PheRS) de *Escherichia coli* aumenta el tamaño del bolsillo de unión a sustratos, y da como resultado 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. Véanse, 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 manera similar, se mostró que una mutación puntual Phe130Ser cerca del sitio de unión a aminoácidos de la tirosil-ARNt sintetasa de *Escherichia coli* permitía que se incorporase azatirosina más eficazmente que 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 en proteínas *in vivo* es modificar sintetasas que tienen mecanismos de corrección de lectura. Estas sintetasas no pueden discriminar y por tanto activan aminoácidos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales relacionados. Este error se corrige en un sitio separado, que desacila el aminoácido cargado erróneamente del ARNt para mantener la fidelidad de la traducción de proteínas. Si la actividad correctora de lectura de la sintetasa

se desactiva, análogos estructurales que están activados de manera errónea 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 aminoacilar de manera errónea tRNA^{Val} con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no relacionados se hidrolizan posteriormente por el dominio de edición. Tras la mutagénesis al azar del cromosoma de *Escherichia coli*, se seleccionó una cepa de *Escherichia coli* mutante que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Esta ValRS de edición defectuosa carga incorrectamente tRNA^{Val} con Cys. Debido a que Abu se parece estéricamente a Cys (el grupo -SH de Cys se sustituye por -CH₃ en Abu), la ValRS mutante también incorpora Abu en proteínas cuando esta cepa de *Escherichia coli* mutante se hace crecer en presencia de Abu. El análisis de espectrometría de masas muestra que aproximadamente el 24% de las valinas se sustituyen por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.

Métodos semisintéticos y de síntesis en fase sólida han permitido también la síntesis de varias proteínas que contienen aminoácidos novedosos. Por ejemplo, véanse las siguientes publicaciones y las 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 replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am Chem*, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc Chem Res*, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc*, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV

protease, *Science*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, LM. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem.* II(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein 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 modificación química para introducir una variedad de cadenas laterales no naturales, incluyendo cofactores, marcadores de espín y oligonucleótidos en proteínas *in vitro*. Véanse, 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 enzyme active sites, *Science*, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of Thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L. et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 88:3153-3154 (1966); 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).

Alternativamente, se han usado métodos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt modificados químicamente para incorporar varias sondas biofísicas en 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., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 83(22): 8604- 8608 (1986).

Previamente, se ha mostrado que pueden incorporarse aminoácidos no naturales de manera específica del sitio en proteínas *in vitro* mediante la

5 adición de ARNt supresores aminocilados químicamente a reacciones de
 síntesis de proteínas programadas con un gen que contiene una mutación
 sin sentido ámbar deseada. Usando estos enfoques, pueden sustituirse
 varios de los veinte aminoácidos comunes por homólogos estructurales
 cercanos, por ejemplo, fluorofenilalanina por fenilalanina, usando cepas
 auxótrofas para un aminoácido particular. Véanse, 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, *et al.*, *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D.,
 10 Glabe, C. G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-
 specific Incorporation of a non-natural amino acids into a polypeptide, *J. Am*
Chem Soc, 111 :8013-8014 (1989); N. Budisa *et al.*, *FASEB J.* 13:41-51
 (1999); Ellman, J. A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C. J., Schultz,
 P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-
 15 specifically into proteins. *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); y
 Mendel, D., Cornish, V. W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with
 an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct*, 24, 435-62
 (1995).

20 Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de
 terminación UAG y se aminoaciló químicamente con un aminoácido no
 natural. Se usó mutagénesis dirigida al sitio convencional para introducir el
 codón de terminación TAG, en el sitio de interés en el gen de la proteína.
 Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3'
 Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed
 25 mutagenesis, *Nucleic Acids 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*, el aminoácido no natural se incorporó en
 respuesta al codón UAG que dio una proteína que contenía ese aminoácido
 en la posición especificada. Experimentos usando [³H]-Phe y experimentos
 30 con α -hidroxiácidos demostraron que sólo se incorpora el aminoácido
 deseado en la posición especificada por el codón UAG y que este

aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio en la proteína. Véanse, por ejemplo, Noren, *et al.*, citado anteriormente; Kobayashi *et al.*, (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 método o técnica, incluyendo pero sin limitarse a, aminoacilación química o enzimática. La aminoacilación puede lograrse mediante aminoacil-ARNt sintetasas o mediante otras moléculas enzimáticas, incluyendo pero sin limitarse a ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y colaboradores (Cech, 1987, *Science*, 236: 1532-1539; McCorkle *et al.*, 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) demostraron la presencia de ARN que se producían de manera natural que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque se ha mostrado que estos catalizadores de ARN naturales actúan sólo sobre sustratos de ácido ribonucleico para la escisión y el corte y empalme, el reciente desarrollo de la evolución artificial de ribozimas ha expandido el repertorio de catálisis a diversas reacciones químicas. Los estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces aminoacil-ARN en sus propios extremos (2')3'-terminales (Illangakere *et al.*, 1995 *Science* 267:643-647), y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido de una molécula de ARN a otra (Lohse *et al.*, 1996, *Nature* 381 :442-444).

La publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0228593, que se incorpora como referencia al presente documento, describe métodos para construir ribozimas y su uso en la aminoacilación de ARNt con aminoácidos codificados de manera natural y no codificados de manera natural. Formas inmovilizadas en sustrato de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar ARNt, incluyendo pero sin limitarse a ribozimas, pueden permitir una purificación por afinidad eficaz de los productos aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, Sepharose y perlas magnéticas. La producción y el uso de una forma inmovilizada en sustrato

de ribozima para la aminoacilación se describe en Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 y la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0228593, que se incorpora como referencia al presente documento.

Los métodos de aminoacilación química incluyen, pero no se limitan a, 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. *et al.* *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti, *et al.* *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. *et al.* *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. *et al.* *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), que se incorporan como referencia al presente documento, para evitar el uso de sintetisas en la aminoacilación. Tales métodos u otros métodos de aminoacilación química pueden usarse para aminoacilar moléculas de ARNt.

Los métodos para generar ARN catalítico pueden implicar generar conjuntos separados de secuencias de ribozimas aleatorizadas, realizar la evolución dirigida en los conjuntos, examinar los conjuntos para detectar la actividad de aminoacilación deseada y seleccionar las secuencias de las ribozimas que presentan la actividad de aminoacilación deseada.

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 notificado que regiones ricas en U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácido, y un motivo GGU puede formar pares de bases con los extremos 3' terminales 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' terminal del ARNt.

Las ribozimas pueden generarse mediante selección *in vitro* usando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con ARNt^{Asn}ccc₃₅ seguido por modificación sistemática por ingeniería genética de una secuencia consenso que se encuentra en los clones activos. Una ribozima a modo de ejemplo obtenida mediante este método se denomina "ribozima Fx3" y se describe en la solicitud de publicación estadounidense n.º 2003/0229593, cuyo contenido se incorpora como referencia al presente documento, y actúa como un catalizador versátil para la síntesis de ciertos aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales relacionados.

La inmovilización sobre un sustrato puede usarse para permitir una purificación por afinidad eficaz de los ARNt aminoacilados. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agarosa, Sepharose y perlas magnéticas. Las ribozimas pueden inmovilizarse sobre resinas aprovechándose de la estructura química del ARN, tal como que el 3'-cis-diol en la ribosa del ARN puede oxidarse con peryodato para producir el correspondiente dialdehído para facilitar la inmovilización del ARN sobre la resina. Pueden usarse diversos tipos de resinas incluyendo resinas de hidrazida baratas en las que la aminación reductora hace que la interacción entre la resina y la ribozima sea una unión irreversible. La síntesis de aminoacil-ARNt puede facilitarse significativamente mediante esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis *et al.* Methods 2005; 36:239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.

El aislamiento de los ARNt aminoacilados puede lograrse de una variedad de modos. Un método adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón tal como una disolución 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 pueden añadirse a reacciones de traducción con el fin de incorporar el aminoácido con el que se aminoaciló el ARNt en una posición de elección en un polipéptido preparado mediante la reacción de traducción. Los ejemplos de sistemas de traducción en los que los ARNt aminoacilados de la presente invención pueden usarse incluyen, pero no se limitan a 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 tales componentes de reacción incluyen pero no se limitan a proteínas ribosómicas, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de elongación e iniciación de la traducción y factores adicionales asociados con la traducción. Adicionalmente, los sistemas de traducción pueden ser traducciones por lotes o traducción compartimentalizada. Los sistemas de traducción por lotes combinan los componentes de reacción en un único compartimento mientras que los sistemas de traducción compartimentalizada separan los componentes de la reacción de traducción de los productos de reacción que pueden inhibir la eficacia de la traducción. Tales sistemas de traducción están disponibles comercialmente.

Además, puede usarse un sistema de transcripción/traducción acoplado. Los sistemas de transcripción/traducción acoplados permiten tanto la transcripción de un ARN de entrada para dar un ARNm correspondiente, que a su vez se traduce mediante los componentes de reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplada disponible comercialmente es el sistema Rapid Translation (RTS, Roche Inc.). El sistema incluye una mezcla que contiene lisado de *E. coli* para proporcionar componentes de la traducción tales como ribosomas y factores de traducción. Adicionalmente, se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN de entrada para dar un molde de ARNm para su uso en la traducción. El RTS puede usar la compartimentalización de los componentes de reacción por medio de una membrana interpuesta entre los

compartimentos de reacción, incluyendo un compartimento de suministro/desechos y un compartimento de transcripción/traducción.

La aminoacilación del ARNt puede realizarse mediante otros agentes, incluyendo pero sin limitarse a, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.

Stephan en Scientist 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe métodos adicionales para incorporar aminoácidos no codificados de manera natural en proteínas. Lu *et al.* en Mol Cell. octubre de 2001; 8(4):759-69 describen un método en el que una proteína se liga químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (ligación de proteína expresada).

Se han usado también técnicas de microinyección para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Véanse, por ejemplo, M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Science. 268:439 (1995); y D. A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000). A un ovocito de *Xenopus* se le inyectaron conjuntamente dos especies de ARN preparadas *in vitro*: un ARNm que codifica para la proteína diana con un codón de terminación UAG en la posición de aminoácido de interés y un ARNt supresor ámbar aminoacilado con el aminoácido no natural deseado. La maquinaria de traducción del ovocito inserta entonces el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este método ha permitido estudios de estructura-función *in vivo* de proteínas integrales de membrana, que generalmente no son adecuadas para sistemas de expresión *in vitro*. Los ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor de neurocinina 2 taquicínina para medir distancias mediante transferencia de energía por 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 residuos expuestos en 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 enjaulados para monitorizar cambios conformacionales en un canal iónico en tiempo real, véase, 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 de canales iónicos para estudiar con sonda sus mecanismos de activación. Véanse, 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). La capacidad para incorporar aminoácidos no naturales directamente en proteínas *in vivo* ofrece una amplia variedad de ventajas incluyendo pero sin limitarse a, altos rendimientos de proteínas mutantes, facilidad técnica, la posibilidad de estudiar las proteínas mutantes en células o posiblemente en organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos de diagnóstico. La capacidad para incluir aminoácidos no naturales con diversos tamaños, acideces, nucleofilicidades, hidrofobicidades y otras propiedades en proteínas puede expandir en gran medida la capacidad para manipular de manera racional y sistemática las estructuras de las proteínas, tanto para estudiar con sonda la función de la proteína como para crear nuevas proteínas u organismos con propiedades novedosas.

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

También puede ser posible obtener la expresión de un polinucleótido de bG-CSF de la presente invención usando un sistema de traducción libre de células (*in vitro*). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o libres de células, y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celulares incluyen, pero no se limitan a, preparaciones de células

completas tales como células permeabilizadas o cultivos celulares en los que puede transcribirse una secuencia de ácido nucleico deseada para dar ARNm y traducirse el ARNm. Están disponibles comercialmente sistemas de traducción libres de células y se conocen bien muchos tipos y sistemas diferentes. Los ejemplos de sistemas libres de células incluyen, pero no se limitan a, 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. Pueden preferirse lisados o extractos eucariotas cuando la proteína resultante está glicosilada, fosforilada o modificada de otra forma debido a que muchas de tales modificaciones sólo son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles comercialmente (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, 111.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). También están disponibles extractos membranosos, tales como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsómicas, que son útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que pueden incluir o bien ARNm como molde (traducción *in vitro*) o bien ADN como molde (transcripción y traducción *in vitro* combinadas), la síntesis *in vitro* la dirigen los ribosomas. Se ha aplicado un esfuerzo considerable al desarrollo de sistemas de expresión de proteínas libres de células. Véanse, 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 estadounidense n.º 6.337.191; la publicación de patente estadounidense n.º 2002/0081660; el documento WO 00/55353; el documento WO 90/05785, que se incorporan como referencia al presente documento. Otro enfoque que puede aplicarse a la expresión de polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de manera natural

incluye la técnica de fusión ARNm-péptido. Véanse, por ejemplo, R. Roberts y J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94: 12297-12302 (1997); A. Frankel, *et al*, Chemistry & Biology 10:1043-1050 (2003). En este enfoque, se traduce un molde de ARNm unido a puromicina para dar un péptido en el ribosoma. Si se han modificado una o más moléculas de ARNt, pueden incorporarse también aminoácidos no naturales en el péptido. Tras haberse leído el último codón de ARNm, la puromicina captura el extremo C-terminal del péptido. Si se encuentra que el conjugado de ARNm-péptido resultante tiene propiedades interesantes en un ensayo *in vitro*, su identidad puede revelarse fácilmente a partir de la secuencia de ARNm. De este modo, pueden examinarse bibliotecas de polipéptidos bG-CSF que comprenden uno o más aminoácidos no codificados de manera natural para identificar polipéptidos que tienen propiedades deseadas. Más recientemente, se han notificado traducciones en ribosomas *in vitro* con componentes purificados que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos no codificados de manera natural. Véase, por ejemplo, A. Forster *et al*, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

También pueden usarse sistemas de traducción reconstituidos. También se han usado satisfactoriamente mezclas de factores de traducción purificados para traducir 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), factor de elongación T (EF-Tu), o factores de terminación. Los sistemas libres de células pueden ser también sistemas de transcripción/traducción acoplados en los que se introduce ADN en el sistema, se transcribe en ARNm y se traduce el ARNm tal como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al*. editores, Wiley Interscience, 1993), que se incorpora específicamente al presente documento como referencia. El ARN transcrito en un sistema de transcripción eucariota puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARNhn) o ARNm maduro con el extremo 5' ocupado (7-metilguanosina) y con cola de poli A en el extremo 3', lo que puede ser una

ventaja en ciertos sistemas de traducción. Por ejemplo, los ARN con extremos ocupados se traducen con alta eficacia en el sistema de lisado de reticulocitos.

5 IX. Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos bG-CSF

Pueden efectuarse diversas modificaciones en los polipéptidos con aminoácidos no naturales descritos en el presente documento usando las composiciones, los métodos, las técnicas y estrategias descritos en el presente documento. Estas modificaciones incluyen la incorporación de una

10 funcionalidad adicional en el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluyendo pero sin limitarse a, hidroxialquilalmidón (HAS), hidroxietilalmidón (HES); un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un agente de fotorreticulación; un radionúclido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un

15 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 soluble en agua;

20 una ciclodextrina; un ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene metal; un resto radiactivo; un grupo funcional novedoso; un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas; un resto fotoenjaulado; un resto excitable mediante radiación actínica; un resto fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; un

25 resto que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; un resto tóxico; un resto marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un

30 grupo quimioluminiscente; un grupo electrodenso; un grupo magnético; un grupo de intercalación; 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 ejemplo ilustrativo, no limitativo de las composiciones, los métodos, las técnicas y las estrategias descritos en el presente documento, la siguiente descripción se centrará en añadir polímeros macromoleculares al polipéptido con aminoácidos no naturales con el entendimiento de que las composiciones, los métodos, las técnicas y las estrategias descritos en la misma también pueden aplicarse (con modificaciones apropiadas, si es necesario y que un experto en la técnica podría hacer con la descripción en el presente documento) para añadir otras funcionalidades, incluyendo pero sin limitarse a las enumeradas anteriormente.

Puede unirse una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas a 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 pueden unirse al polipéptido bG-CSF por medio de un aminoácido codificado de manera natural, por medio de un aminoácido no codificado de manera 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 limitarse a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, 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 es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

La presente invención proporciona preparaciones sustancialmente homogéneas de conjugados de polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo" tal como se usa en el presente documento significa que se observa que las moléculas de conjugado de polímero:proteína son más de la mitad de la proteína total. El conjugado de polímero:proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones de polipéptido bG-CSF pegilado "sustancialmente homogéneas" proporcionadas en el presente documento son las que son suficientemente homogéneas como para presentar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad en su aplicación clínica y en su predictibilidad de la farmacocinética lote a lote.

Puede elegirse también preparar una mezcla de moléculas de conjugado de polímero:proteína, y la ventaja proporcionada en el presente documento es que puede seleccionarse la proporción de conjugado de monopolímero:proteína a incluir en la mezcla. Por tanto, si se desea, puede prepararse una mezcla de diversas proteínas con diversos números de restos de polímero unidos (es decir, di-, tri-, tetra-, etc.) y combinar dichos conjugados con el conjugado de monopolímero:proteína preparado usando los métodos de la presente invención, y tener una mezcla con una proporción determinada de conjugados de monopolímero:proteína.

El polímero seleccionado puede ser soluble en agua de modo que la proteína a la que se une no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Para el

uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de polímeros incluyen pero no se limitan a polialquiléteres y análogos con extremos ocupados con alcóxido de los mismos (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietilen/propilenglicol y análogos con extremos ocupados con metóxido o etóxido de los mismos, especialmente polioxietilenglicol, este último se conoce también como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; polivinilalquiléteres; polioxazolinas, polialquiloxazolinas y polihidroalquiloxazolinas; poliacrilamidas, polialquilacrilamidas y polihidroalquilacrilamidas (por ejemplo, polihidropropilmetacrilamida y derivados de la misma); poli(acrilatos de hidroalquilo); ácidos polisiálicos y análogos de los mismos; secuencias peptídicas hidrófilas; polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo, carboximetildextrano, sulfatos de dextrano, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroalquilcelulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosano, succinil-quitosano, carboximetilquitina, carboximetilquitosano; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; sulfato de condroitina; albúmina; pululano y carboximetilpululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo, poli(ácidos glutámicos), polilisinas, poli(ácidos aspárticos), poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de estireno-anhídrido maleico, copolímero de diviniletil éter-anhídrido maleico; poli(alcoholes vinílicos); copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; hidroalquilalmidón(HAS), incluyendo pero sin limitarse a, hidroxietilalmidón (HES); y derivados de los anteriores.

La proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a moléculas de proteína variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la razón óptima (en cuanto a la eficacia de la reacción en la que hay un mínimo exceso de polímero o proteína sin reaccionar) puede determinarse mediante el peso molecular del

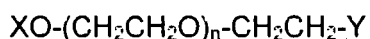
polietilenglicol seleccionado y el número de grupos reactivos disponibles. En lo que se refiere al peso molecular, normalmente cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. De manera similar, debe tenerse en cuenta la ramificación del polímero cuando se optimizan estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o cuantas más ramificaciones haya) mayor será la razón polímero:proteína.

Tal 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 varios factores, incluyendo el estado físico global del paciente y la causa subyacente del estado que va a tratarse. La cantidad de polipéptido bG-CSF usada para la terapia proporciona una tasa de cambio aceptable y mantiene una respuesta deseada a un nivel beneficioso. Un experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones usando materiales y procedimientos disponibles para el público.

El polímero soluble en agua puede ser cualquier forma estructural incluyendo pero sin limitarse a lineal, en horquilla o ramificada. Normalmente, el polímero soluble en agua es un poli(alquilenglicol), tal como poli(etilenglicol) (PEG), aunque pueden emplearse también otros polímeros solubles en agua. A modo de ejemplo, se usa PEG para describir ciertas realizaciones de esta invención.

PEG es un polímero soluble en agua bien conocido que está disponible comercialmente o puede prepararse mediante polimerización por apertura de anillo de etilenglicol según métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica (Sandler y Kara, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa en sentido amplio para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol,

independientemente del tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y puede representarse como unido al polipéptido bG-CSF mediante la fórmula:



en la que n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo pero sin limitarse a, un grupo alquilo C_{1-4} , un grupo protector o un grupo funcional terminal.

En algunos casos, un PEG usado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxilo, es decir, X es H o CH_3 ("metoxi-PEG"). Alternativamente, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando de ese modo un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se usan comúnmente para reaccionar con los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo pero sin limitarse a, grupos maleimida, carbonatos activados (incluyendo pero sin limitarse a, éster p -nitrofenílico), ésteres activados (incluyendo pero sin limitarse a, éster de N -hidroxisuccinimida, p -nitrofenílico) y aldehídos) así como grupos funcionales que son inertes frente a los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos no codificados de manera natural (incluyendo pero sin limitarse a, grupos azida, grupos alquino). Se observa que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior mediante Y , se unirá o bien directa o bien indirectamente a un polipéptido bG-CSF por medio de un aminoácido que se produce de manera natural o no codificado de manera natural. Por ejemplo, Y puede ser una unión amida, carbamato o urea con un grupo amina (incluyendo pero sin limitarse a, la amina épsilon de la lisina o el extremo N -terminal) del polipéptido. Alternativamente, Y puede ser una unión maleimida con un grupo tiol (incluyendo pero sin limitarse a, el grupo tiol de la cisteína). Alternativamente, Y puede ser una unión con un residuo que no es comúnmente accesible por medio de los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un grupo azida en el PEG con un grupo alquino en el polipéptido bG-CSF para formar un producto de cicloadición

[3+2] de Huisgen. Alternativamente, puede hacerse reaccionar un grupo alquino en el PEG con un grupo azida presente en un aminoácido no codificado de manera natural para formar un producto similar. En algunas realizaciones, puede hacerse reaccionar un nucleófilo fuerte (incluyendo pero sin limitarse a, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) con un grupo cetona o aldehído presente en un aminoácido no codificado de manera natural para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según sea aplicable, que en algunos casos puede reducirse adicionalmente mediante tratamiento con un agente reductor apropiado. Alternativamente, el nucleófilo fuerte puede incorporarse en el polipéptido bG-CSF por medio de un aminoácido no codificado de manera natural y usarse para reaccionar preferentemente con un grupo aldehído o cetona presente en el polímero soluble en agua.

Puede usarse cualquier masa molecular para un PEG según se desee de manera práctica, incluyendo pero sin limitarse a, de desde aproximadamente 100 Daltons (Da) hasta 100.000 Da o más según se desee (incluyendo pero sin limitarse a, algunas veces 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). El peso molecular del PEG puede ser un amplio intervalo, incluyendo pero sin limitarse a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, 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 PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG es de entre

aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el PEG es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. Pueden usarse también PEG de cadena ramificada, incluyendo pero sin limitarse a, moléculas de PEG en las que cada cadena tiene un PM que oscila desde 1-100 kDa (incluyendo pero sin limitarse a, 1-50 kDa o 5-20 kDa). El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser, incluyendo pero sin limitarse a, de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, 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 y 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 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 describe una amplia gama de moléculas de PEG en, incluyendo pero sin limitarse a, el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., catálogo de Nektar Therapeutics, incorporados como referencia al presente documento.

Generalmente, al menos un extremo terminal de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no codificado de manera natural. Por ejemplo, pueden usarse derivados de PEG que llevan restos alquino y azida para la reacción con cadenas laterales de aminoácidos para

5 unir PEG a aminoácidos no codificados de manera natural tal como se describe en el presente documento. Si el aminoácido no codificado de manera natural comprende una azida, entonces el PEG contendrá normalmente o bien un resto alquino para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] o bien una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato) que contiene un grupo fosfina para efectuar la formación del enlace amida. Alternativamente, si el aminoácido no codificado de manera natural comprende un alquino, entonces el PEG contendrá normalmente un resto azida para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Si el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo, el PEG comprenderá normalmente un nucleófilo potente (incluyendo pero sin limitarse a, una funcionalidad hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida) con el fin de efectuar la formación de las correspondientes uniones hidrazona, oxima y semicarbazona, respectivamente. En otras alternativas, puede usarse la orientación inversa de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, un resto azida en el aminoácido no codificado de manera natural puede hacerse reaccionar con un derivado de PEG que contiene un alquino.

20 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 manera natural.

25 La invención proporciona en algunas realizaciones derivados poliméricos que contienen acetileno y azida que comprenden una estructura principal de polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da. La estructura principal de polímero del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, debe entenderse que una amplia variedad de polímeros solubles en agua incluyendo pero sin limitarse a poli(etilen)glicol y otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de esta invención y que

el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas las moléculas de este tipo. El término PEG incluye, pero no se limita a, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG de múltiples brazos, PEG derivatizado, PEG en horquilla, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes con respecto a la estructura principal de polímero), o PEG con enlaces degradables en el mismo.

El PEG es normalmente transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable al calor, inerte frente a muchos agentes químicos, no se hidroliza ni se deteriora, y es generalmente no tóxico. Se considera que el poli(etilenglicol) es biocompatible, lo que significa que el PEG puede coexistir con organismos o tejidos vivos sin causar daño. Más específicamente, el PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que el PEG no tiende a producir una respuesta inmunitaria en el cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, tal como un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmunitaria de modo que un organismo puede tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG no tienden a producir una respuesta inmunitaria sustancial ni a provocar 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 desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4000, normalmente desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 2000, es adecuado para su uso en la presente invención. El PEG que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da es en algunas realizaciones de la presente invención particularmente útil como estructura principal de polímero. El peso molecular del PEG puede ser un amplio intervalo, incluyendo pero sin limitarse a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del PEG puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, 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 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 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.

La estructura principal de polímero puede ser lineal o ramificada. Se conocen en general en la técnica estructuras principales de polímero ramificadas. Normalmente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo de ramificación central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de ramificación central. Comúnmente, se usa PEG en formas ramificadas que pueden prepararse mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de ramificación central puede derivarse también de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse en forma general como $R(-PEG-OH)_m$ en la que R se deriva de un resto de núcleo, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de brazos. También pueden usarse como estructura principal de polímero moléculas de PEG de múltiples brazos, tales como las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; la solicitud de patente estadounidense 2003/0143596; el documento WO 96/21469; y el documento

WO 93/21259, cada uno de los cuales se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad.

El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG en horquilla representado mediante $\text{PEG}(\sim\text{YCHZ}_2)_n$, en la que Y es un grupo de unión y Z es un grupo terminal activado unido a CH mediante una cadena de átomos de longitud definida.

Aún otra forma ramificada, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, a lo largo de la estructura principal de PEG en vez de en el extremo de las cadenas de PEG.

Además de estas formas de PEG, el polímero puede prepararse también con uniones débiles o degradables en la estructura principal. Por ejemplo, puede prepararse PEG con uniones éster en la estructura principal de polímero que se someten a hidrólisis. Tal como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular inferior: $-\text{PEG}-\text{CO}_2-\text{PEG}-+\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG}-\text{CO}_2\text{H}+\text{HO}-\text{PEG}-$

Los expertos habituales en la técnica entienden que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica incluyendo pero sin limitarse a las dadas a conocer en el presente documento.

Muchos otros polímeros son también adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, son particularmente útiles en la invención estructuras principales de polímero que son solubles en agua, con desde 2 hasta aproximadamente 300 extremos terminales. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de los mismos (incluyendo pero sin limitarse a 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 de polímero puede variar, está normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, a

menudo desde aproximadamente 6.000 Da hasta aproximadamente 80.000 Da. El peso molecular de cada cadena de la estructura principal de polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, 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 principal de polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal de polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal de polímero 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 de polímero es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura principal de polímero es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

Los expertos habituales en la técnica reconocerán que la lista anterior de estructuras principales sustancialmente solubles en agua no es de ningún modo exhaustiva y 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.

En algunas realizaciones de la presente invención los derivados poliméricos son "multifuncionales", lo que significa que la estructura principal de polímero tiene al menos dos extremos terminales, y posiblemente tantos como aproximadamente 300 extremos terminales, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados poliméricos

multifuncionales incluyen, pero no se limitan a, polímeros lineales que tienen dos extremos terminales, estando unido cada extremo terminal a un grupo funcional que puede ser igual o diferente.

En una realización, el derivado polimérico tiene la estructura:

5 X—A—POLI—B—N=N=N en la que:

N=N=N es un resto azida;

B es un resto de unión, que puede estar presente o ausente;

POLI es un polímero no antigénico soluble en agua;

10 A es un resto de unión, 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 un resto de unión para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo funcionalizado de forma múltiple que contiene hasta 18, y puede contener entre 1-10 átomos de carbono. Puede incluirse
15 un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede ramificarse en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y puede contener 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido
20 con uno o más átomos de carbono, átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen los grupos de unión descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0143596, cada una de las cuales se incorpora como referencia al presente documento. Los
25 expertos habituales en la técnica reconocerán que la lista anterior de restos de unión no es de ningún modo exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que se contempla que todos los restos de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente son adecuados para su uso en la presente invención.

30 Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster

activo, tal como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxilo, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y azida. Tal como entienden los expertos habituales en la técnica, el resto X seleccionado debe ser compatible con el grupo azida, de modo que no se produzca la reacción con el grupo azida. Los derivados poliméricos que contienen azida pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) es también un resto azida, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

El término "protegido" se refiere a la presencia de un resto o grupo protector que impide la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que está protegiéndose. 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 disulfuro de ortopiridilo. 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. También pueden usarse en la presente invención otros grupos protectores conocidos en la técnica.

Los ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la bibliografía incluyen, pero no se limitan a, carbonato de N-succinimidilo (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.281.698, 5.468.478), amina (véanse, por ejemplo, Buckmann *et al.* Makromol. Chem.

182:1379 (1981), Zalipsky *et al.* Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, por ejemplo, Andresz *et al.* Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson *et al.* en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, págs. 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la patente estadounidense n.º 5.672.662), succinato de succinimidilo (véanse, por ejemplo, Abuchowski *et al.* Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich *et al.* Makromol. Chem. 180:1381 (1979), éster de succinimidilo (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.650.234), glicidil éter (véanse, por ejemplo, Pitha *et al.* Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling *et al.*, Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véanse, por ejemplo, Beauchamp, *et al.*, Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli *et al.* J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véanse, por ejemplo, Veronese, *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véanse, por ejemplo, Harris *et al.* J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), patente estadounidense n.º 5.824.784, patente estadounidense n.º 5.252.714), maleimida (véanse, por ejemplo, Goodson *et al.* Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani *et al.* en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), disulfuro de ortopiridilo (véase, por ejemplo, Woghiren, *et al.* Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney *et al.*, Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.900.461). Todas las patentes y referencias anteriores se incorporan al presente documento como referencia.

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

30 $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N=N=N$ en la que:

X es un grupo funcional tal como se describió anteriormente; y n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

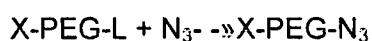
En otra realización, los derivados poliméricos de la invención comprenden una estructura principal de polímero que tiene la estructura:

5 X-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-O-(CH₂)_m-W-N=N=N en la que:

W es un resto ligador alifático o aromático que comprende entre 1-10 átomos de carbono; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

10 X es un grupo funcional tal como se describió anteriormente, m es entre 1 y 10.

Los derivados de PEG que contienen azida de la invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica y/o dados a conocer en el presente documento. En un método, mostrado a continuación, una estructura principal de polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura principal de polímero un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con un anión azida (que puede estar apareado con cualquiera de varios contraiones adecuados, incluyendo sodio, potasio, terc-butilamonio, etcétera). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se sustituye por el resto azida, proporcionando el polímero de PEG que contiene azida deseado.



25 Tal como se muestra, una estructura principal de polímero adecuada para su uso en la presente invención tiene la fórmula X-PEG-L, en la que 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 no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alquenilo, amina, aminooxilo, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido,

30

maleimida, ditiopiridina y vinilpiridina, y cetona. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato.

5 En otro método para la preparación de los derivados poliméricos que contienen azida de la presente invención, se pone en contacto un agente de unión que lleva una funcionalidad azida con una estructura de polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, en el que el agente de unión lleva una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero de PEG, para formar un producto de derivado polimérico que contiene azida en el que la azida está separada de la estructura principal de polímero por un grupo de unión.

15 Se muestra a continuación un esquema de reacción a modo de ejemplo:

$X\text{-PEG-M} + N\text{-ligador-N=N=N} \rightarrow \text{PG-X-PEG-ligador-N=N=N}$ en el que:
PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de ocupación de extremos tal como alcoxilo o un grupo funcional tal como se describió anteriormente; y
M es un grupo funcional que no es reactivo con la funcionalidad azida pero que reaccionará eficaz y selectivamente con el grupo funcional N.

20 Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, M que es un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M que es una cetona si N es un resto hidrazida o aminooxilo; M que es un grupo saliente si N es un nucleófilo.

25 La purificación del producto bruto puede lograrse mediante métodos conocidos incluyendo, pero sin limitarse a, precipitación del producto seguido por cromatografía, si es necesario.

30 Se muestra a continuación un ejemplo más específico en el caso de PEG-diamina, en la que una de las aminas se protege mediante un resto de grupo protector tal como terc-butil-Boc y la PEG-diamina monoprotegida

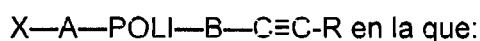
resultante se hace reaccionar con un resto de unión que lleva la funcionalidad azida:



En este caso, el grupo amina puede acoplarse 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 amida entre el derivado de monoamina-PEG y el resto ligador que lleva azida. Tras la formación satisfactoria del enlace amida, el derivado que contiene azida protegido con N-terc-butil-Boc resultante puede usarse directamente para modificar moléculas bioactivas o puede elaborarse adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo N-t-Boc puede hidrolizarse mediante tratamiento con ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante puede usarse como asidero sintético para instalar otra funcionalidad útil tal como grupos maleimida, disulfuros activados, ésteres activados, etcétera, para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

Son particularmente útiles los derivados heterobifuncionales cuando se desea unir diferentes moléculas a cada extremo terminal 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, una cetona, un éster activado, un carbonato activado, etcétera, a un extremo terminal del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo terminal del PEG.

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



R puede ser o bien H o bien un grupo alquilo, alqueno, alquiloxilo, o arilo o arilo sustituido;

B es un resto de unión, que puede estar presente o ausente;

POLI es un polímero no antigénico soluble en agua;

A es un resto de unión, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y

X es un segundo grupo funcional.

5 Los ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero no se limitan a, un "grupo alquilo funcionalizado" de forma múltiple que contiene hasta 18, y puede contener entre 1-10 átomos de carbono. Puede incluirse con la cadena de alquilo un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de unión para A y B incluyen, pero
10 no se limitan a, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y puede contener 5-6 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 unión adecuados incluyen los grupos de unión descritos en las patentes estadounidenses n.^{os}
15 5.932.462 y 5.643.575 y la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0143596, cada una de las cuales se incorpora como referencia al presente documento. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que la lista anterior de restos de unión no es de ningún modo exhaustiva y pretende ser meramente ilustrativa, y que se contempla que una amplia variedad de restos de unión que tienen las cualidades descritas
20 anteriormente son útiles en la presente invención.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tal como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal
25 como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxilo, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas,
30 mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Tal como se

entendería, el resto X seleccionado debe ser compatible con el grupo acetileno de modo que no se produzca reacción con el grupo acetileno. Los derivados poliméricos que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) es también un resto acetileno, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

En otra realización de la presente invención, los derivados poliméricos comprenden una estructura principal de polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ en la que:

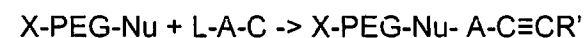
X es un grupo funcional tal como se describió anteriormente;

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

m es de entre 1 y 10.

Se muestran a continuación ejemplos específicos de los polímeros de PEG heterobifuncionales.

Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica y/o dados a conocer en el presente documento. En un método, una estructura principal de polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, teniendo la estructura principal de polímero un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo nucleófilo adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que lleva tanto una funcionalidad acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando el polímero de PEG que lleva el resto nucleófilo y la molécula que lleva el grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se sustituye por el resto nucleófilo, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado.



Tal como se muestra, una estructura principal de polímero preferida para su uso en la reacción tiene la fórmula X-PEG-Nu, en la que PEG es poli(etilenglicol), Nu es un resto nucleófilo y X es un grupo funcional que no reacciona con Nu, L o la funcionalidad acetileno.

5 Los ejemplos de Nu incluyen, pero no se limitan a, grupos amina, alcóxido, arilóxido, sulfhidrido, imino, carboxilato, hidrazida, aminóxido que reaccionarían principalmente por medio de un mecanismo de tipo SN2. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen aquellos grupos funcionales que reaccionarían principalmente por medio 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 experimenten desplazamiento nucleófilo así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se espera que experimenten adición mediante nucleófilos.

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

15 En otro método para la preparación de los derivados de polímero que contienen acetileno de la invención, un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 800 Da hasta aproximadamente 100.000 Da, que lleva o bien un grupo funcional protegido o bien un agente de ocupación de extremos en un extremo terminal y un grupo saliente adecuado en el otro extremo terminal, se pone en contacto con un anión acetileno.

20 Se muestra a continuación un esquema de reacción a modo de ejemplo:

$X-PEG-L + -C \equiv CR' \rightarrow X-PEG-C \equiv CR'$ en el que:

25 PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de ocupación de extremos tal como alcóxido o un grupo funcional tal como se describió anteriormente; y

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

En el ejemplo anterior, el grupo saliente L debe ser suficientemente reactivo como para experimentar desplazamiento de tipo SN2 cuando se pone en contacto con una concentración suficiente del anión acetileno. Los expertos habituales en la técnica conocen las condiciones de reacción requeridas para lograr el desplazamiento SN2 de grupos salientes mediante aniones acetileno.

La purificación del producto bruto puede lograrse habitualmente mediante métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, precipitación del producto seguido por cromatografía, si es necesario.

Pueden unirse polímeros solubles en agua a los polipéptidos bG-CSF de la invención. Los polímeros solubles en agua pueden unirse por medio de un aminoácido no codificado de manera natural incorporado en el polipéptido bG-CSF o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido no codificado de manera natural o codificado de manera natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido no codificado de manera natural o codificado de manera natural. Alternativamente, los polímeros solubles en agua se unen a un polipéptido bG-CSF incorporando un aminoácido no codificado de manera natural por medio de un aminoácido que se produce de manera natural (incluyendo pero sin limitarse a, cisteína, lisina o el grupo amina del residuo N-terminal). 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 aminoácido(s) no codificado(s) de manera natural se une(n) a polímero(s) soluble(s) en agua (incluyendo pero sin limitarse a, 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 aminoácido(s) codificado(s) de manera natural unido(s) a polímeros solubles en agua. En algunos casos, los polipéptidos bG-CSF de la invención comprenden uno o más aminoácido(s) codificados de manera no natural unidos a polímeros solubles

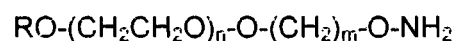
en agua y uno o más aminoácidos que se producen de manera natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua usados en la presente invención potencian la semivida en suero del polipéptido bG-CSF en relación con la forma no conjugada.

El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido bG-CSF (es decir, el grado de pegilación o glicosilación) de la presente invención puede ajustarse para proporcionar una característica farmacodinámica, farmacocinética o farmacológica alterada (incluyendo pero sin limitarse a, aumentada o disminuida) tal como semivida *in vivo*. En algunas realizaciones, la semivida de bG-CSF aumenta al menos aproximadamente el 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, 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 con respecto a un polipéptido no modificado.

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

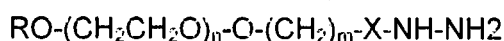
En una realización de la presente invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal que se une directamente a la estructura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

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



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

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



en la que R es un alquilo sencillo (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.

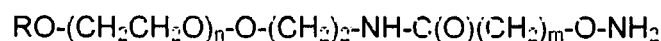
5 En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene semicarbazida tendrá la estructura:



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

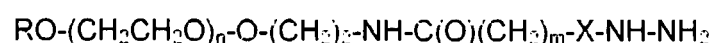
10 En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con un derivado de PEG que contiene un resto hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal que se une a la estructura principal de PEG por medio de un enlace amida.

15 En algunas realizaciones, los derivados de PEG hidroxilamina-terminal tienen la estructura:



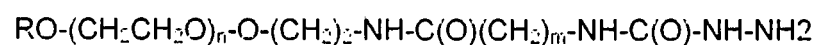
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

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



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

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



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

30

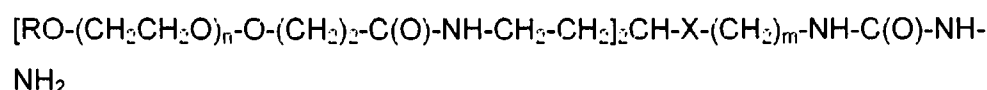
En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene un resto hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que oscila desde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

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



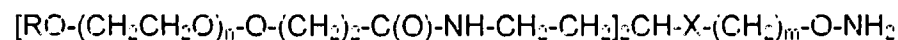
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

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



en la que R es un alquilo sencillo (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.

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



en la que R es un alquilo sencillo (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.

El grado y los sitios en los que el/los polímero(s) soluble(s) en agua se une(n) al polipéptido bG-CSF pueden modular la unión del polipéptido bG-CSF a un receptor. En algunas realizaciones, los enlaces se disponen 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, tal como se mide en un ensayo de unión en equilibrio, tal como el descrito en Spencer *et al*, J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988).

Los métodos y la química para la activación de polímeros así como para la conjugación de péptidos se describen en la bibliografía y se conocen en la técnica. Los métodos usados comúnmente para la activación de polímeros incluyen, pero no se limitan a, activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. {véanse, R. F. Tailor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al*, (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N. Y.; Dunn, R.L., *et al*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991).

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

También pueden encontrarse métodos para la activación de polímeros en el documento WO 94/17039, patente estadounidense n.º 5.324.844, documento WO 94/18247, documento WO 94/04193, patente estadounidense n.º 5.219.564, patente estadounidense n.º 5.122.614, documento WO 90/13540, patente estadounidense n.º 5.281.698 y

documento WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo pero sin limitarse a factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (patente estadounidense n.º 4.412.989),
5 ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, App. Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)). Todas las referencias y patentes citadas se incorporan como referencia al presente documento.

La pegilación (es decir, la adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos bG-CSF que contienen un aminoácido no codificado
10 de manera natural, tal como L-azido-L-fenilalanina, se lleva a cabo mediante cualquier método conveniente. Por ejemplo, el polipéptido bG-CSF se pegila con un derivado de mPEG terminado en alquino. En resumen, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH sólido, con agitación, a una disolución acuosa de polipéptido bG-CSF que contiene p-azido-L-Phe a temperatura
15 ambiente. Normalmente, la disolución acuosa se tampona con un tampón que tiene un pK_a cercano al pH al que va a llevarse a cabo la reacción (en general, aproximadamente pH 4-10). Los ejemplos de tampones adecuados para la pegilación a pH 7,5, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS y TES. El pH se monitoriza y
20 ajusta de manera continua si es necesario. Normalmente, se deja que la reacción continúe durante entre aproximadamente 1-48 horas.

Los productos de reacción se someten posteriormente a cromatografía de interacción hidrófoba para separar las variantes de polipéptido bG-CSF pegiladas de mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH libre y
25 cualquier complejo de alto peso molecular del polipéptido bG-CSF pegilado que pueda formarse cuando se activa PEG no bloqueado en ambos extremos de la molécula, reticulando de ese modo moléculas variantes de polipéptido bG-CSF. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrófoba son tales que mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH libre fluye a
30 través de la columna, mientras que cualquier complejo variante de polipéptido bG-CSF pegilado reticulado se eluye tras las formas deseadas,

que contienen una molécula 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 los expertos habituales en la técnica las determinan fácilmente.

5 El eluyente que contiene los conjugados deseados se concentra mediante ultrafiltración y se desala mediante diafiltración.

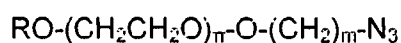
Si es necesario, el polipéptido bG-CSF pegilado obtenido a partir de la cromatografía hidrófoba puede purificarse adicionalmente mediante uno o más procedimientos que conocen los expertos habituales en la técnica
10 incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo pero sin limitarse a, DEAE SEPHAROSE); cromatografía sobre sílice; HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo pero sin limitarse a, SEPHADEX G-75);
15 cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de quelatos metálicos; ultrafiltración/diafiltración; precipitación con etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo pero sin limitarse a isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitarse a
20 precipitación con sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente puede estimarse por GPC mediante comparación con patrones de proteína globular (Preneta, AZ en PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-308). La pureza del conjugado bG-CSF-PEG puede evaluarse mediante
25 degradación proteolítica (incluyendo pero sin limitarse a, escisión con tripsina) seguido por análisis de espectrometría de masas. Pepinsky RB., *et al*, J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3); 1059-66 (2001).

Un polímero soluble en agua unido a un aminoácido de un polipéptido bG-CSF de la invención puede derivatizarse o sustituirse adicionalmente sin
30 limitación.

Derivados de PEG que contienen azida

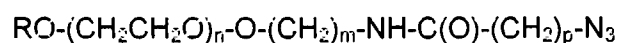
En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto azida que reaccionará con un resto alquino presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de manera natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio que oscila desde 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, desde 10-40 kDa.

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



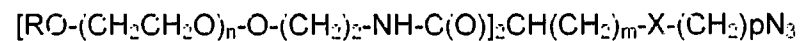
en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

En otra realización, el derivado de PEG azida-terminal tendrá la estructura:



en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 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 un resto azida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que oscila desde 10-40 kDa y puede ser de desde 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG azida-terminal tendrá la siguiente estructura:

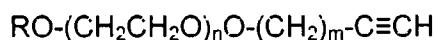


en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10, y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), que en cada caso que puede estar presente o ausente.

Derivados de PEG que contienen alquino

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

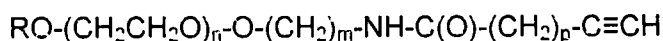
5 En algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:



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

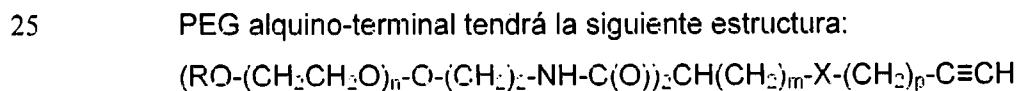
10 En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto alquino terminal o azida terminal que se une a la estructura principal de PEG por medio de un enlace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

15 En algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:



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

20 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 un resto alquino terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que oscila desde 10-40 kDa y puede ser de desde 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:



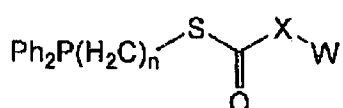
25 en la que R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10, y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

30

Derivados de PEG que contienen fosfina

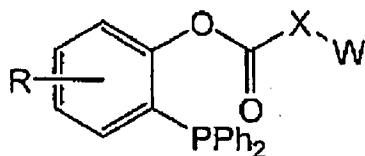
En otra realización de la invención, un polipéptido bG-CSF se modifica con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional (incluyendo pero sin limitarse a, éster, carbonato) que comprende además un grupo arilfosfina que reaccionará con un resto azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de manera natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio que oscila desde 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, desde 10-40 kDa.

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 está presente, Ph es fenilo, y W es un polímero soluble en agua.

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



en la que X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, grupos alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{halógeno}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ y $-\text{NO}_2$. R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluyendo pero sin limitarse a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxilo o tioalcoxilo sustituidos o no sustituidos, 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 tal como cada grupo R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se unen

al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir, pero sin limitarse a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo pero sin limitarse a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo pero sin limitarse a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ y similares).

10 Otros derivados de PEG y técnicas de pegilación general

Otras moléculas de PEG a modo de ejemplo que pueden unirse a polipéptidos bG-CSF, así como métodos de pegilación incluyen, pero no se limitan a, los descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense n.^{os} 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; las patentes estadounidenses n.^{os} 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; documento 97/32607, documento EP 229.108, documento EP 402.378, documento WO 92/16555, documento WO 94/04193, documento WO 94/14758, documento WO 94/17039, documento WO 94/18247, documento WO 94/28024, documento WO 95/00162, documento WO 95/11924, documento WO95/13090, documento WO 95/33490, documento WO

96/00080, documento WO 97/18832, documento WO 98/41562, documento WO 98/48837, documento WO 99/32134, documento WO 99/32139, documento WO 99/32140, documento WO 96/40791, documento WO 98/32466, documento WO 95/06058, documento EP 439 508, documento WO 97/03106, documento WO 96/21469, documento WO 95/13312, documento EP 921 131, documento WO 98/05363, documento EP 809 996, documento WO 96/41813, documento WO 96/07670, documento EP 605 963, documento EP 510 356, documento EP 400 472, documento EP 183 503 y documento EP 154 316, que se incorporan como referencia al presente documento. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en el presente documento puede usarse en cualquier forma, incluyendo pero sin limitarse a, cadena sencilla, cadena ramificada, cadena de múltiples brazos, monofuncional, bifuncional, multifuncional o cualquier combinación de los mismos.

Derivados de PEG y polímero adicionales incluyendo pero sin limitarse a, derivados hidroxilamina (aminooxilo)-PEG, se describen en las siguientes solicitudes de patente que se incorporan todas como referencia en su totalidad en el presente documento: publicación de patente estadounidense n.º 2006/0194256, publicación de patente estadounidense n.º 2006/0217532, publicación de patente estadounidense n.º 2006/0217289, patente provisional estadounidense n.º 60/755.338; patente provisional estadounidense n.º 60/755.711; patente provisional estadounidense n.º 60/755.018; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/49397; documento WO 2006/069246; patente provisional estadounidense n.º 60/743.041; patente provisional estadounidense n.º 60/743.040; solicitud de patente internacional n.º PCT/US06/47822; patente provisional estadounidense n.º 60/882.819; patente provisional estadounidense n.º 60/882.500; y patente provisional estadounidense n.º 60/870.594.

30

Proteínas de fusión Fc heterólogas

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

Tal 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. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene eliminando las dos regiones de unión a antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. Un modo de eliminar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con la proteasa papaína. Por 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 de bisagra y extenderse a través de los dominios CH2 y CH3 hasta el extremo C-terminal del anticuerpo. Pueden encontrarse regiones de 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, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento como referencia. 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 de bisagra, dominios CH2 y CH3, y un sitio de N-glicosilación se conocen bien en la técnica.

Hay cinco tipos de regiones Fc de inmunoglobulinas humanas con diferentes funciones efectoras y propiedades farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. IgG es la inmunoglobulina más abundante en suero. IgG

tiene también la semivida más larga en suero de cualquier inmunoglobulina (23 días). A diferencia de otras inmunoglobulinas, IgG se recircula eficazmente tras la unión a un receptor de Fc. Hay cuatro subclases de IgG, G1, G2, G3 y G4, cada una de las cuales tiene diferentes funciones efectoras. G1, G2 y G3 pueden unirse a C1q y fijar complemento mientras que G4 no puede hacerlo. Aun cuando G3 puede unirse a C1q más eficazmente que G1, G1 es más eficaz en la mediación de la lisis celular dirigida por el complemento. G2 fija complemento de manera muy ineficaz. El sitio de unión a C1q en IgG se ubica en la región carboxilo terminal del dominio CH2.

Todas las subclases de IgG pueden unirse a receptores de Fc (CD16, CD32, CD64) siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de unión al receptor de Fc de IgG se forma mediante residuos ubicados tanto en las regiones de bisagra como en las carboxilo terminales del dominio CH2.

IgA puede existir tanto en una forma monomérica como dimérica unida entre sí mediante una cadena J. IgA es la segunda Ig más abundante en suero, pero tiene una semivida de sólo 6 días. IgA tiene tres funciones efectoras. Se une a un receptor específico de IgA en macrófagos y eosinófilos, que dirige la fagocitosis y degranulación, respectivamente. Puede fijar también complemento por medio de una ruta alternativa desconocida.

IgM se expresa como o bien un pentámero o bien un hexámero, uniéndose ambos entre sí mediante una cadena J. IgM tiene una semivida en suero de 5 días. Se une débilmente a C1q por medio de un sitio de unión ubicado en su dominio CH3. IgD tiene una semivida de 3 días en suero. No está claro qué funciones efectoras pueden atribuirse 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 dirigen la degranulación y dan como resultado 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 las funciones de unión a receptor de Fc y/o complemento se han alterado. Por tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener toda la parte Fc de una inmunoglobulina, fragmentos de la parte Fc de una inmunoglobulina o análogos de la misma fusionados a un compuesto de bG-CSF.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden consistir en proteínas de cadena sencilla o polipéptidos de múltiples cadenas. Pueden producirse dos o más proteínas de fusión Fc de manera que interaccionen a través de enlaces disulfuro que se forman de manera natural entre regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con respecto al compuesto de bG-CSF o pueden contener diferentes compuestos de bG-CSF fusionados en el extremo N-terminal de la parte Fc de la proteína de fusión.

Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc o de tipo Fc puede servir para prolongar la semivida plasmática *in vivo* del compuesto de bG-CSF fusionado en el extremo N-terminal. Además, el componente de 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 en circulación o terapéutica usando el método descrito en el presente documento o conocido en la 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 métodos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica.

Puesto que la región Fc de IgG producida mediante 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 CH2 y/o CH3. Además, se ha mostrado en la bibliografía que las tasas catabólicas de variantes de IgG que no se unen al receptor de Fc de alta afinidad o Clq son indistinguibles de la tasa de aclaramiento del anticuerpo de tipo natural original, lo que indica que el sitio catabólico es distinto de los sitios implicados en la unión a

receptor de Fc o C1q. [Wawrzynczak *et al.*, (1992) *Molecular Immunology* 29:221]. Estudios de mutagénesis dirigida al sitio usando una región Fc de IgG1 murina sugirieron que el sitio de la región Fc de IgG1 que controla la tasa catabólica se ubica en el punto de contacto del dominio CH2-CH3. Pueden modificarse regiones Fc 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 puede derivarse de una región Fc de IgG4 o IgG1, y puede contener tanto las regiones CH2 como CH3 incluyendo la región de bisagra.

Proteínas de fusión de albúmina heterólogas

Puede fusionarse bG-CSF descrito en el presente documento directamente o por medio de un ligador peptídico, polímero soluble en agua o ligador de profármaco a albúmina o un análogo, fragmento o derivado de la misma. Generalmente, las proteínas de albúmina que son parte de las proteínas de fusión de la presente invención pueden derivarse de albúmina clonada de cualquier especie, incluyendo un ser humano. La albúmina sérica humana (HSA) consiste en una única cadena polipeptídica no glicosilada de 585 aminoácidos con un peso molecular fórmula de 66.500. Se conoce la secuencia de aminoácidos de HSA humana [véanse Meloun, *et al.* (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, *et al.* (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, *et al.* (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; Minghetti, *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747, cada una de las cuales se incorpora como referencia al presente documento]. Se ha descrito una variedad de variantes polimórficas así como análogos y fragmentos de albúmina. [Véase Weitkamp, *et al.*, (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219]. Por ejemplo, en el documento EP 322.094, diversas formas más cortas de HSA. Algunos de estos fragmentos de HSA se dan a conocer, incluyendo HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) y HSA (1-419) y fragmentos entre 1-369 y 1-419. El documento EP 399.666 da a conocer fragmentos de albúmina que

incluyen HSA (1-177) y HSA (1-200) y fragmentos entre HSA (1-177) y HSA (1-200).

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 tal proteína de fusión es biológicamente activa y tiene una semivida plasmática más larga que el compuesto de bG-CSF solo. Por tanto, no es necesario que la parte de albúmina de la proteína de fusión tenga necesariamente una semivida plasmática igual a la de la albúmina humana nativa. Se conocen o pueden generarse fragmentos, análogos y derivados que tienen semividas más largas o que tienen semividas intermedias con respecto a la de la albúmina humana nativa y el compuesto de bG-CSF de interés.

Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención abarcan proteínas que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas en el compuesto de bG-CSF y/o la parte de Fc o 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 forma. Los aminoácidos con cadenas laterales de aminoácido alifáticas sustituidas o alifáticas tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales difiere en no más de aproximadamente cuatro. Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramificaciones en sus cadenas laterales difiere en no más de uno. Se considera que aminoácidos con grupos fenilo sustituidos o fenilo en sus cadenas laterales tienen aproximadamente el mismo tamaño y forma. Excepto a menos que se indique específicamente lo contrario en el presente documento, preferiblemente se hacen sustituciones conservativas con aminoácidos que se producen de manera natural.

Pueden obtenerse proteínas de inmunoglobulina y albúmina de tipo natural de una variedad de fuentes. Por ejemplo, estas proteínas pueden

obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido o células
 que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Pueden examinarse
 las bibliotecas con sondas diseñadas usando la secuencia de proteína o
 ADN publicada para la proteína particular de interés. Por ejemplo, se
 describen regiones constantes de cadena pesada o ligera de
 inmunoglobulinas en Adams, *et al.* (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719;
 Goughet, *et al.* (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, *et al.* (1980) *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 77:6027-6031; Rice *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 79:7862-7862; Falkner, *et al.* (1982) *Nature* 298:286-288; y Morrison, *et*
al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Algunas referencias que dan a
 conocer secuencias de ADN y proteína de albúmina incluyen Meloun, *et al.*
 (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, *et al.* (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn,
et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; y Minghetti, *et al.* (1986)
J. Biol. Chem. 261:6747.

Caracterización de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención

Existen numerosos métodos para caracterizar las proteínas de fusión
 de la presente invención. Algunos de estos métodos incluyen, pero no se
 limitan a: SDS-PAGE acoplada con métodos de tinción de proteínas o
 inmunotransferencia usando anticuerpos anti-IgG o anti-HSA. Otros métodos
 incluyen espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida
 por matriz (MALDI-EM), cromatografía de líquidos/espectrometría de masas,
 isoelectroenfoque, intercambio aniónico analítico, cromatoenfoque y
 dicroísmo circular, por ejemplo.

Potenciación de la afinidad para albúmina sérica

Pueden fusionarse también diversas moléculas a los polipéptidos bG-
 CSF de la invención para modular la semivida de polipéptidos bG-CSF en
 suero. En algunas realizaciones, se unen o fusionan moléculas a

polipéptidos bG-CSF de la invención para potenciar la afinidad por albúmina sérica endógena en un animal.

Por ejemplo, en algunos casos, se hace una fusión recombinante de un polipéptido bG-CSF y una secuencia de unión a albúmina. Las
5 secuencias de unión a albúmina a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos (véanse, por ejemplo, Makrides *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:534-542 (1996) y Sjolander *et al*, J. Immunol Methods 201: 115-123 (1997)), o péptidos de unión a albúmina tales como los descritos en, por ejemplo,
10 Dennis, *et al*, J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002).

En otras realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la presente invención se acilan con ácidos grasos. En algunos casos, los ácidos grasos promueven la unión a albúmina sérica. Véase, por ejemplo, Kurtzhals, *et al*,
Biochem. J. 312:725-731 (1995).

En otras realizaciones, los polipéptidos bG-CSF de la invención se fusionan directamente con albúmina sérica (incluyendo pero sin limitarse a, albúmina sérica humana). Los expertos en la técnica reconocerán que puede unirse también una amplia variedad de otras moléculas a bG-CSF en la presente invención para modular la unión a albúmina sérica u otros
20 componentes séricos.

X. Glicosilación de polipéptidos bG-CSF

La invención incluye polipéptidos bG-CSF que incorporan uno o más aminoácidos no codificados de manera natural que llevan residuos de
25 sacárido. Los residuos de sacárido pueden ser o bien naturales (incluyendo pero sin limitarse a, N-acetilglucosamina) o no naturales (incluyendo pero sin limitarse a, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos pueden unirse a los aminoácidos no codificados de manera natural o bien mediante un enlace glicosídico unido en N o en O (incluyendo pero sin limitarse a, N-acetilgalactosa-L-serina) o bien un enlace no natural (incluyendo pero sin
30 limitarse a, una oxima o el correspondiente glicósido unido en C o en S).

Los restos de sacárido (incluyendo pero sin limitarse a, glicosilo) pueden añadirse a polipéptidos bG-CSF o bien *in vivo* o bien *in vitro*. En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene carbonilo se modifica con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxilo para generar el polipéptido glicosilado correspondiente unido mediante un enlace oxima. Una vez unido al aminoácido no codificado de manera natural, el sacárido puede elaborarse adicionalmente mediante tratamiento con glicosiltransferasas y otras enzimas para generar un oligosacárido unido al bG-CSF. Véase, por ejemplo, H. Liu, *et al.* J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene carbonilo se modifica directamente con un glicano con estructura definida preparado como un derivado de aminooxilo. Un experto habitual en la técnica reconocerá que pueden usarse otras funcionalidades, incluyendo azida, alquino, hidrazida, hidrazina y semicarbazida, para unir el sacárido al aminoácido no codificado de manera natural.

En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene azida o alquinilo puede modificarse entonces mediante, incluyendo pero sin limitarse a, una reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen con, incluyendo pero sin limitarse a, derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Este método permite que las proteínas se modifiquen con una selectividad extremadamente alta.

XI. Dímeros y multímeros de bG-CSF

La presente invención también proporciona bG-CSF y combinaciones de análogos de bG-CSF tales como homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrámeros, etc.) en los que bG-CSF que contiene uno o más aminoácidos no codificados de

manera natural se une a otro bG-CSF o variante de bG-CSF del mismo o cualquier otro polipéptido que no sea bG-CSF o una variante de bG-CSF del mismo, o bien directamente a la estructura principal de polipéptido o bien por medio de un ligador. Debido a su peso molecular aumentado en
5 comparación con los monómeros, los conjugados de dímeros o multímeros de bG-CSF pueden presentar propiedades nuevas o deseables, incluyendo pero sin limitarse a semivida terapéutica modulada, farmacodinámica, farmacocinética, farmacológica diferente, o semivida plasmática modulada en relación con el bG-CSF monomérico. En algunas realizaciones, los
10 dímeros de bG-CSF de la invención modularán la transducción de señales del receptor de G-CSF. En otras realizaciones, los dímeros o multímeros de bG-CSF de la presente invención actuarán como antagonista, agonista o modulador del receptor.

En algunas realizaciones, una o más de las moléculas de bG-CSF
15 presentes en un dímero o multímero que contiene bG-CSF comprende(n) un aminoácido no codificado de manera natural unido a un polímero soluble en agua.

En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF se unen directamente, incluyendo pero sin limitarse a, por medio de un enlace amida
20 Asn-Lys o enlace disulfuro Cys-Cys. En algunas realizaciones, los polipéptidos bG-CSF y/o la molécula que no es bG-CSF unida comprenderán diferentes aminoácidos no codificados de manera natural para facilitar la dimerización, incluyendo pero sin limitarse a, un alquino en un aminoácido no codificado de manera natural de un primer polipéptido bG-
25 CSF y una azida en un segundo aminoácido no codificado de manera natural de una segunda molécula se conjugarán por medio de una cicloadición [3+2] de Huisgen. Alternativamente, bG-CSF y/o la molécula que no es bG-CSF unida que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que contiene cetona pueden conjugarse con un segundo
30 polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de manera natural

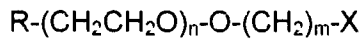
que contiene hidroxilamina y los polipéptidos se hacen reaccionar por medio de la formación de la correspondiente oxima.

Alternativamente, los dos polipéptidos bG-CSF, y/o la molécula que no es bG-CSF unida, se unen por medio de un ligador. Puede usarse cualquier ligador hetero u homobifuncional para unir las dos moléculas, y/o las moléculas que no son bG-CSF unidas, que pueden tener una secuencia primaria igual o diferente. En algunos casos, el ligador usado para mantener el bG-CSF, y/o las moléculas que no son bG-CSF unidas entre sí puede ser un reactivo de PEG bifuncional. El ligador puede tener un amplio intervalo de longitud molecular o peso molecular. Pueden usarse ligadores de peso molecular mayor o menor para proporcionar una conformación o relación espacial deseada entre bG-CSF y la entidad unida o entre bG-CSF y su receptor, o entre la entidad unida y su pareja de unión, si hay alguna. También pueden usarse ligadores que tienen una longitud molecular más larga o más corta para proporcionar una flexibilidad o espacio deseado entre bG-CSF y la entidad unida, o entre la entidad unida y su pareja de unión, si hay alguna.

En algunas realizaciones, la invención proporciona ligadores bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura de mancuerna que incluye: a) una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, una hidroxilamina o un resto que contiene carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura principal de polímero; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la estructura principal de polímero. El segundo grupo funcional puede ser igual 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 solubles en agua 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 solubles en agua que tienen la estructura:



en la que n es de desde aproximadamente 5 hasta 3.000, m es 2-10, X puede ser una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, un grupo aminooxilo, una hidroxilamina, un acetilo, o un resto que contiene carbonilo, y R es un grupo de ocupación de extremos, 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, éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de 1-benzotriazolilo, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxilo, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno y cetona.

XII Medición de la actividad del polipéptido bG-CSF y afinidad de bG-CSF por un receptor

Puede determinarse la actividad del polipéptido bG-CSF usando ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales o conocidos. Pueden analizarse polipéptidos bG-CSF para determinar su actividad biológica mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Hedari *et al.* Veterinary Immunology and Immunopathology (2001) 81:45-57 y ensayos que evalúan las actividades biológicas de hG-CSF.

Pueden analizarse polipéptidos bG-CSF para determinar su capacidad para regular por incremento CDI Ia, CDI Ib, CDI Ic, y/o CD 18 en neutrófilos. La medición de esta actividad puede medirse mediante FACS tal como se describe por Hedari *et al.* (citado anteriormente). Ensayos

adicionales conocidos por los expertos habituales en la técnica miden la activación de neutrófilos, incluyendo pero sin limitarse a, ensayos que miden L-selectina. Otros ensayos que pueden realizarse evalúan la proliferación y/o diferenciación de células mediante polipéptidos bG-CSF de la invención.

5 Pueden analizarse polipéptidos bG-CSF para determinar su capacidad para unirse a un receptor. Puede prepararse un receptor de G-CSF usando técnicas y métodos que conoce un experto habitual en la técnica. El receptor de hG-CSF puede prepararse tal como se describe en la
10 patente estadounidense n.º 5.574.136, que se incorpora como referencia al presente documento. Por ejemplo, pueden usarse células o líneas celulares que actúan respuesta a G-CSF o se unen a G-CSF (incluyendo pero sin limitarse a, células que contienen receptores de G-CSF activos tales como células productoras de receptores de G-CSF recombinantes) para monitorizar la unión a receptor de bG-CSF. Para un polipéptido bG-CSF no
15 pegilado o pegilado que comprende un aminoácido no natural, la afinidad de bG-CSF por su receptor o por otro receptor de G-CSF puede medirse usando un biosensor BIAcore™ (Pharmacia). Los ensayos de unión adecuados incluyen, pero no se limitan a, ensayos BIAcore (Pearce *et al*, Biochemistry 38:81-89 (1999)) y ensayos AlphaScreen™ (PerkinElmer).
20 AlphaScreen™ es un ensayo de proximidad luminiscente no radiactivo basado en perlas en el que las perlas donadoras se excitan mediante un láser a 680 nm para liberar oxígeno singlete. El oxígeno singlete difunde y reacciona con el derivado de tioxeno en la superficie de perlas aceptoras conduciendo a una emisión de fluorescencia a ~600 nm. La emisión de
25 fluorescencia se produce sólo cuando las perlas donadoras y aceptoras se llevan en proximidad estrecha mediante interacciones moleculares que se producen cuando cada una se une a un ligando y un receptor, respectivamente. Puede competirse con esta interacción ligando-receptor usando variantes de unión a receptor mientras que las variantes que no se
30 unen no competirán.

Puede determinarse la actividad del polipéptido bG-CSF usando ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales o conocidos. Por ejemplo, pueden usarse células o líneas celulares que proliferan en presencia de hG-CSF o se unen a hG-CSF (incluyendo pero sin limitarse a, células que contienen
5 receptores de G-CSF activos tales como células de médula ósea de ratón, WEHI-3B (D+), AML-193 (ATCC), o células productoras de receptores de G-CSF recombinantes) para monitorizar la unión a receptor de bG-CSF. Véase, por ejemplo, King *et al.*, Exp. Hematol. 20:223 (1992); patente estadounidense n.º 6.385.505, que se incorporan como referencia al
10 presente documento. Los modelos animales *in vivo* así como los ensayos clínicos en seres humanos para someter a prueba la actividad de hG-CSF incluyen los descritos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.166.183; 6.565.841; 6.162.426; 5.718.893, que se incorporan como referencia al presente documento. Tales modelos pueden usarse para
15 evaluar la actividad de bG-CSF.

Independientemente de qué métodos se usen para crear los presentes análogos de bG-CSF, los análogos se someten a ensayos para determinar la actividad biológica. Pueden realizarse ensayos con timidina tritiada para determinar el grado de división celular. Sin embargo, pueden
20 usarse otros ensayos biológicos para determinar la actividad deseada. Ensayos biológicos tales como someter a ensayo para determinar la capacidad para inducir diferenciación terminal en la línea celular leucémica WEHI-3B (D+) de ratón, también proporcionan indicación de la actividad de G-CSF. Véase Nicola, *et al.* Blood 54: 614-27 (1979). Pueden usarse otros
25 ensayos *in vitro* para determinar la actividad biológica. Véase Nicola, Ann. Rev. Biochem. 58: 45-77 (1989). En general, la prueba para determinar la actividad biológica debe proporcionar un análisis para determinar el resultado deseado, tal como un aumento o una disminución en la actividad biológica (en comparación con G-CSF no alterado), actividad biológica
30 diferente (en comparación con G-CSF no alterado), análisis de afinidad por pareja de unión o receptor, cambios estructurales o conformacionales del

propio bG-CSF o su receptor (en comparación con el bG-CSF modificado), o análisis de la semivida en suero.

Se notificó previamente que células WEHI-3BD⁺ y células leucémicas humanas de leucemias recién diagnosticadas se unirán a G-CSF murino marcado con ¹²⁵I y que puede competirse con esta unión mediante la adición de G-CSF no marcado o CSF- α humano. Se somete a prueba la capacidad de G-CSF natural y bG-CSF para competir por la unión de ¹²⁵I-G-CSF a células leucémicas murinas y humanas. Se somete a yodación G-CSF natural altamente purificado (>95% puro; 1 μ g) [Tejedor, *et al.*, Anal. Biochem., 127, 143 (1982)], y se separa de los reactivos mediante filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La actividad específica del ¹²⁵I-G-CSF natural es de aproximadamente 100 μ Ci/ μ g de proteína.

La compilación anterior de referencias para metodologías de ensayo no es exhaustiva, los expertos habituales en la técnica reconocerán otros ensayos útiles para someter a prueba para determinar el resultado final deseado. Los expertos habituales en la técnica conocen alteraciones a tales ensayos.

XIII Medición de la potencia, la semivida *in vivo* funcional y parámetros farmacocinéticos

Un aspecto importante de la invención es la semivida biológica prolongada que se obtiene mediante la construcción del polipéptido b-GCSF con o sin conjugación del polipéptido con un resto de polímero soluble en agua. La rápida disminución tras la administración de las concentraciones séricas del polipéptido bG-CSF ha hecho que sea importante para evaluar las respuestas biológicas al tratamiento con el polipéptido bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo. El polipéptido bG-CSF conjugado y no conjugado y las variantes del mismo de la presente invención pueden tener semividas séricas prolongadas tras la administración, por ejemplo, por vía subcutánea o la administración i.v., pudiéndose medirse, por ejemplo, mediante el método de ELISA o mediante

un ensayo de selección primaria. Pueden usarse 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 variantes del mismo se describe en la patente estadounidense n.º 5.824.778, que se incorpora como referencia al presente documento. La medición de la semivida biológica *in vivo* se lleva a cabo tal 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 manera natural puede determinarse según el protocolo descrito en las patentes estadounidenses n.º 6.646.110; 6.555.660; 6.166.183; 5.985.265; 5.824.778; 5.773.581, que se incorporan como referencia al presente documento. Estos protocolos pueden usarse también para bG-CSF.

Los parámetros farmacocinéticos para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural pueden evaluarse en ratas macho Sprague-Dawley normales (N=5 animales por grupo de tratamiento). Los animales recibirán o bien una única dosis de 25 ug/rata i.v. o bien 50 ug/rata s.c., y se extraerán aproximadamente 5-7 muestras de sangre según un transcurso de tiempo predefinido, que generalmente cubre aproximadamente 6 horas para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural no conjugado con un polímero soluble en agua y aproximadamente 4 días para un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural y conjugado con un polímero soluble en agua. Los datos farmacocinéticos para bG-CSF sin un aminoácido no codificado de manera natural pueden compararse directamente con los datos obtenidos para polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de manera natural.

Pueden realizarse estudios farmacocinéticos de polipéptidos bG-CSF en ratones, ratas o en un primate, por ejemplo, monos *Cynomolgus*. Normalmente, se administra una única inyección o bien por vía subcutánea o bien por vía intravenosa, y se monitorizan los niveles séricos de bG-CSF a

lo largo del tiempo. La patente estadounidense n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932, que se incorporan como referencia al presente documento, describen varios modelos animales que pueden usarse para evaluar los polipéptidos bG-CSF de la invención. Los estudios con animales que pueden realizarse implican ganado expuesto a *Pasteurella hemolytica*, ganado con exposición bacteriana de la glándula mamaria/exposición a mastitis (*Klebsiella pneumoniae*). Otros estudios que pueden realizarse evalúan el control, la incidencia y la duración de la enfermedad respiratoria bovina, o la prevención de la mastitis por coliformes. Un experto habitual en la técnica conoce métodos para evaluar la salud de los animales, la producción de leche, el recuento de neutrófilos y otros parámetros. Otros modelos que pueden usarse para evaluar los polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen pero sin limitarse a, modelos animales de infección o exposición a infección tales como un modelo de hámster de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*, un modelo de rata de pielonefritis por *Candida albicans*, modelos que incluyen potros neonatales y modelos que incluyen cerdos en crecimiento. Algunos de estos modelos se describen en la patente estadounidense n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932. Los expertos habituales en la técnica conocen modelos tales como estos.

Se describen ejemplos adicionales de ensayos para la medición de la actividad biológica *in vivo* de hG-CSF o variantes del mismo en las patentes estadounidenses n.ºs 5.681.720; 5.795.968; 5.824.778; 5.985.265; y en Bowen *et al*, Experimental Hematology 27:425-432 (1999), incorporándose cada una de las cuales como referencia al presente documento.

XIV. Administración de las composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos o proteínas de la invención (incluyendo pero sin limitarse a, bG-CSF, sintetasas, proteínas que comprenden uno o más aminoácidos no naturales, etc.) se emplean opcionalmente para usos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a, en combinación con un vehículo farmacéuticamente adecuado. Tales composiciones, por ejemplo,

comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un vehículo o excipiente de este tipo incluye, pero sin limitarse a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y/o combinaciones de los mismos. La formulación se prepara para adecuarse al modo de administración. En general, los expertos habituales en la técnica conocen métodos de administración de proteínas y pueden aplicarse a la administración de los polipéptidos de la invención. Las composiciones pueden estar en una forma soluble en agua, tal como presentes como sales farmacéuticamente aceptables, lo que quiere decir que incluyen sales de adición tanto de ácidos como de bases. La patente estadounidense n.º 6.497.869, que se incorpora como referencia al presente documento, trata de las formulaciones y la administración de polipéptidos G-CSF, incluyendo pero sin limitarse a, hG-CSF y bG-CSF. Se trataron sales que comprenden iones sulfato tales como sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio y mezclas de los mismos, así como agentes tamponantes 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 someten a prueba opcionalmente en uno o más modelos animales de enfermedad apropiados *in vitro* y/o *in vivo*, para confirmar la eficacia, el metabolismo tisular y para estimar las dosificaciones, según métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. En particular, las dosificaciones pueden determinarse inicialmente mediante mediciones de la actividad, la estabilidad u otras mediciones adecuadas de los aminoácidos no naturales en el presente documento en comparación con homólogos de aminoácidos naturales (incluyendo pero sin limitarse a, comparación de un polipéptido bG-CSF modificado para incluir uno o más aminoácidos no naturales con un polipéptido bG-CSF de aminoácidos naturales y comparación de un polipéptido bG-CSF modificado para incluir

uno o más aminoácidos no naturales con un tratamiento con bG-CSF disponible en la actualidad), es decir, en un ensayo relevante.

5 La administración se realiza mediante cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir una molécula en contacto último con las células tisulares o sanguíneas. 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 métodos adecuados de administración de tales polipéptidos en el contexto de la presente invención a un paciente y, aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, a menudo una vía particular puede proporcionar una acción o reacción más inmediata y más eficaz que otra vía.

10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que está administrándose, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención.

20 Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía convencional adecuada para proteínas o péptidos, incluyendo, pero sin limitarse a por vía parenteral, por ejemplo inyecciones incluyendo, pero sin limitarse a, por vía subcutánea o por vía intravenosa o cualquier otra forma de inyecciones o infusiones. Las composiciones de polipéptido pueden administrarse mediante varias vías incluyendo, pero sin limitarse a medios orales, intravenosos, intraperitoneales, intramusculares, 25 transdérmicos, subcutáneos, tópicos, sublinguales, intravasculares, intramamarios o rectales. Las composiciones que comprenden polipéptidos de aminoácidos no naturales, modificados o no modificados, también pueden administrarse por medio de liposomas. Tales vías de administración y formulaciones apropiadas generalmente las conocen los expertos en la técnica. El polipéptido bG-CSF puede usarse solo o en combinación con 30 otros componentes adecuados tales como un vehículo farmacéutico. El

polipéptido bG-CSF puede usarse en combinación con otros agentes o compuestos terapéuticos.

5 El polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no natural, solo o en combinación con otros componentes adecuados, también puede prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse por medio de inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

10 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, mediante vías intraarticulares (en las articulaciones), intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneales y subcutáneas, incluyen disoluciones para 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 previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas
15 que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones de bG-CSF pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales.

20 La administración parenteral y la administración intravenosa son los métodos de administración preferidos. En particular, las vías de administración ya en uso para los agentes terapéuticos homólogos de aminoácidos naturales (incluyendo pero sin limitarse a, los usados normalmente para EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, interleucinas, anticuerpos, FGFs₃ y/o cualquier otra proteína administrada
25 farmacéuticamente), junto con las formulaciones en uso actual, proporcionan las vías de administración y formulación preferidas para los polipéptidos de la invención.

30 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. La dosis viene determinada por la eficacia del vector o de la formulación particular, y por la actividad, estabilidad o semivida en suero del polipéptido con aminoácidos no naturales empleado y por el estado del animal, así como por el peso corporal o el área superficial del animal que va a tratarse. El tamaño de la dosis también viene determinado por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un vector, formulación particular, o similares en un animal particular.

En la determinación de la cantidad eficaz del vector o la formulación que va administrarse en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad, el veterinario evalúa los niveles plasmáticos circulantes, las toxicidades de la formulación, la evolución de la enfermedad y/o si es relevante, la producción de anticuerpos anti-polipéptido con aminoácidos no naturales.

La dosis administrada normalmente está en el intervalo equivalente a las dosificaciones de proteínas terapéuticas usadas actualmente, ajustadas para la actividad alterada o la semivida en suero de la composición relevante. Los vectores o formulaciones farmacéuticas de esta invención pueden complementar condiciones de tratamiento mediante cualquier terapia convencional conocida, incluyendo administración de anticuerpos, administración de vacunas, administración de agentes citotóxicos, polipéptidos con aminoácidos naturales, ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, modificadores de la respuesta biológica y similares.

Para la administración, las formulaciones de la presente invención se administran a una tasa determinada por la DL-50 o DE-50 de la formulación relevante, y/o la observación de cualquier efecto secundario de los polipéptidos con aminoácidos no naturales a diversas concentraciones, incluyendo pero sin limitarse a, cuando se aplica a la salud global y masa del animal. La administración puede llevarse a cabo por medio de dosis únicas o divididas.

Si un animal que se somete a infusión de una formulación desarrolla fiebre, escalofríos o dolores musculares, puede recibir la dosis apropiada de

aspirina, ibuprofeno, paracetamol u otro fármaco de control del dolor/fiebre apropiado para animales. Los animales que experimentan reacciones a la infusión tales como fiebre, dolores musculares y escalofríos se medican previamente 30 minutos antes de las infusiones futuras, o bien con aspirina, paracetamol, o bien incluyendo pero sin limitarse a, difenhidramina u otro fármaco apropiado para animales. Puede usarse meperidina para los dolores musculares y los escalofríos más graves que no responden rápidamente a antipiréticos y antihistamínicos. La infusión de células se ralentiza o se interrumpe dependiendo de la gravedad de la reacción.

Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden administrarse 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 del polipéptido bG-CSF según las realizaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, inhalación (incluyendo pero sin limitarse a, por medio de un aerosol), bucal (incluyendo pero sin limitarse a, sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo pero sin limitarse a, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial o intravenosa), tópica (es decir, tanto superficies cutáneas como mucosas, incluyendo superficies de las vías respiratorias), pulmonar, intraocular, intranasal y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad del estado que está tratándose. La administración puede ser o bien local o bien sistémica. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o múltiples dosis, tales como ampollas y viales. Los polipéptidos bG-CSF de la invención pueden prepararse en una mezcla en una forma inyectable de dosificación unitaria (incluyendo pero sin limitarse a, disolución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos bG-CSF de la invención también pueden administrarse mediante infusión continua (usando,

incluyendo pero sin limitarse a, minibombas tales como bombas osmóticas), formulaciones de depósito de liberación lenta o en bolo individuales.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen disoluciones acuosas y no acuosas, disoluciones estériles isotónicas, 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, estabilizadores y conservantes. Las disoluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles del tipo descrito anteriormente.

10 La liofilización es una técnica comúnmente empleada para presentar proteínas que sirve para eliminar el agua de la preparación de proteínas de interés. La liofilización, o secado por congelación, es un proceso mediante el cual el material que va a secarse se congela primero y luego se elimina el disolvente helado o congelado mediante sublimación en un entorno a vacío. Puede incluirse un excipiente en las formulaciones liofilizadas previamente para aumentar la estabilidad durante el proceso de secado por congelación y/o para mejorar estabilidad del producto liofilizado en almacenamiento. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9):26-30 (1990) y Arakawa *et al.* *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

20 Los expertos habituales en la técnica también conocen el secado por pulverización de productos farmacéuticos. Por ejemplo, véase Broadhead, J. *et al.*, "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 éstos incluyen: enzimas, sueros, plasma, microorganismos y levaduras. El secado por pulverización es una técnica útil porque puede convertir una preparación farmacéutica líquida en un polvo fino, sin polvo o aglomerado en un proceso de una etapa. La técnica básica comprende las siguientes cuatro etapas: a) atomizar la disolución de alimentación en una pulverización; b) poner en contacto con aire la

25

30

pulverización; c) secar la pulverización; y d) separar el producto seco del aire de secado. Las patentes estadounidenses n.ºs 6.235.710 y 6.001.800, que se incorporan como referencia al presente documento, describen la preparación de eritropoyetina recombinante mediante secado por pulverización.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que está administrándose, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (incluyendo vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales) de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. 1985)).

Los vehículos adecuados incluyen pero sin limitarse a, tampones que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina, imidazol, acetato, bicarbonato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo pero sin limitarse a, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular incluyendo pero sin limitarse a aquellos con menos de aproximadamente 10 residuos; proteínas, incluyendo pero sin limitarse a, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos incluyendo pero sin limitarse a, polivinilpirrolidona; aminoácidos incluyendo pero sin limitarse a, glicina, glutamina, asparagina, arginina, histidina o derivados de histidina, metionina, glutamato o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo pero sin limitarse a, trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes incluyendo pero sin limitarse a, EDTA y edentato disódico; iones metálicos divalentes incluyendo pero sin limitarse a, zinc, cobalto o cobre; alcoholes de azúcar incluyendo pero sin limitarse a, manitol o sorbitol; contraiones que forman sales incluyendo pero sin limitarse a, sodio y cloruro de sodio; cargas tales como celulosa microcristalina,

lactosa, almidón de maíz y otros almidones; agentes de unión; edulcorantes y otros agentes saborizantes; agentes colorantes; y/o tensioactivos no iónicos incluyendo pero sin limitarse a Tween™ (incluyendo pero sin limitarse a, Tween 80 (polisorbato 80) y Tween 20 (polisorbato 20), Pluronic™ y otros ácidos plurónicos, incluyendo pero sin limitarse a, ácido plurónico F68 (poloxámero 188), o PEG. Los tensioactivos adecuados incluyen por ejemplo pero sin limitarse a poliéteres basados en poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), es decir, (PEO-PPO-PEO), o poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), es decir, (PPO-PEO-PPO), o una combinación de los mismos. PEO-PPO-PEO y PPO-PEO-PPO están comercialmente disponibles con las marcas comerciales Pluronic™, R-Pluronic™, Tetronics™ y R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) y se describen adicionalmente en la patente estadounidense n.º 4.820.352 incorporada en el presente documento en su totalidad como referencia. Otros polímeros de bloque de etileno/polipropileno pueden ser tensioactivos adecuados. Puede usarse un tensioactivo o una combinación de tensioactivos para estabilizar bG-CSF pegilado frente a una o más tensiones incluyendo pero sin limitarse una tensión que resulta de agitación. Algunos de los anteriores pueden denominarse "agentes de carga". Algunos pueden denominarse también "modificadores de la tonicidad". También pueden aplicarse conservantes antimicrobianos para la eficacia antimicrobiana y estabilidad del producto; los conservantes adecuados incluyen pero sin limitarse a, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, metacresol, metil/propilparabeno, cresol y fenol, o una combinación de los mismos. La patente estadounidense n.º 7.144.574, que se incorpora como referencia al presente documento, describe materiales adicionales que pueden ser adecuados en las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la invención y otras preparaciones de administración.

Los polipéptidos bG-CSF de la invención, incluyendo los unidos a polímeros solubles en agua tales como PEG, también pueden administrarse

mediante o como parte de sistemas de liberación sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen, incluyendo pero sin limitarse a, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, incluyendo pero sin limitarse a, películas o microcápsulas. Las

5 matrices de liberación sostenida incluyen desde materiales biocompatibles tales como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al*, J. Biomed. Mater. Res., 15: 267-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982), acetato de etilenvinilo (Langer *et al*, citado anteriormente) o poli(ácido D-(-)-3-hidroxi-
 10 butírico) (documento EP 133.988), polilactidas (poli(ácido láctico)) (patente estadounidense n.º 3.773.919; documento EP 58.481), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), poli(lactida-co-glicolida) (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al*, Biopolymers, 22, 547-556 (1983), poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de
 15 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
 20 compuesto se preparan mediante métodos conocidos *per se*: documento DE 3.218.121; Eppstein *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al*, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); documento EP 52.322; documento EP 36.676; patente estadounidense n.º 4.619.794; documento EP 143.949; patente estadounidense n.º 5.021.234;
 25 solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes estadounidenses n.ºs 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Todas las referencias y patentes citadas se incorporan como referencia al presente documento.

Los polipéptidos bG-CSF atrapados en liposomas pueden prepararse mediante métodos descritos en, por ejemplo, el documento DE 3.218.121;

30 Eppstein *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al*, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); documentos EP

52.322; EP 36.676; patente estadounidense n.º 4.619.794; documento EP 143.949; patente estadounidense n.º 5.021.234; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes estadounidenses n.ºs 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. La composición y el tamaño de los liposomas se conocen bien o un experto habitual en la técnica puede determinarlos fácilmente de manera empírica. Algunos ejemplos de liposomas se describen en, por ejemplo, Park JW, *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331 (1995); Lasic D y Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1993); Drummond DC, *et al*, Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, en Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002); Park JW, *et al*, Clin. Cancer Res. 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1591(1-3): 109-118 (2002); Mamot C, *et al*, Cancer Res. 63: 3154-3161 (2003). Todas las referencias y patentes citadas se incorporan como referencia al presente documento. Se han descrito varias formulaciones de hG-CSF y las conocen los expertos habituales en la técnica.

La dosis administrada a un animal en el contexto de la presente invención debe ser suficiente para producir una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. Generalmente, 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, de peso corporal del animal, aunque esto depende del criterio terapéutico. La frecuencia de la dosificación también depende del criterio terapéutico y puede ser más frecuente o menos frecuente que los productos de polipéptido bG-CSF disponibles comercialmente aprobados para su uso en animales. Generalmente, un polipéptido bG-CSF pegilado de la invención puede administrarse mediante cualquiera de las vías de administración descritas anteriormente.

XV. Usos terapéuticos de los polipéptidos bG-CSF de la invención

Los polipéptidos b-GCSF de la invención son útiles para tratar una amplia variedad de trastornos. La administración de productos de hG-CSF da como resultado la formación de glóbulos blancos en seres humanos. Por tanto, la administración de 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 pueden administrarse a animales que tienen una infección. Las infecciones que pueden tratarse con polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen pero sin limitarse a, mastitis y fiebre de embarque. 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, se administra un polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención a un animal entre dos semanas y un día antes del parto, y adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una semana tras el 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 adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una semana tras el 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 adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una semana tras el 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 adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una semana tras el parto.

5 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 embarque. 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 embarque. 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 embarque, y
10 adicionalmente se administra en el día de embarque o hasta una semana tras el embarque.

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
15 un polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención a un animal siete días antes del parto, y adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una semana tras el 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 adicionalmente se administra en 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 adicionalmente se administra en el día del parto o hasta una
20 semana tras el 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 adicionalmente se administra en 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 de o en el día del parto para prevenir la enfermedad en el ternero. En una realización de la presente
25 invención, se administra un polipéptido bG-CSF pegilado de la presente
30

invención a una vaca antes de o en el día del parto para prevenir la
 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 prevenir la enfermedad en el ternero. En una
 5 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
 prevenir la 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;
 10 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;
 15 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 está pegilado y se administra en una dosis de 0,01; 0,02;
 20 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 está
 25 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-
 30 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.

5 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 está 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 está 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 $\mu\text{g/kg}$. 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 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis de 10 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 20 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis de 20 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 30 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis de 30 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 40 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis de 40 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis de 50 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis de 50 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF de la presente invención se administra en una dosis mayor de 0,5 $\mu\text{g/kg}$. En una realización, el polipéptido bG-CSF pegilado de la presente invención se administra en una dosis mayor de 0,5 $\mu\text{g/kg}$.

Las composiciones farmacéuticas que contienen bG-CSF pueden formularse a una concentración eficaz para su administración mediante diversos medios a un animal que experimenta trastornos caracterizados por producción de glóbulos blancos baja o defectuosa, o bien solos o bien como

parte de un estado o enfermedad. Las cantidades promedio del bG-CSF pueden variar y en particular deben basarse en las recomendaciones y la prescripción de un veterinario cualificado. La cantidad exacta de bG-CSF es cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de estado que está tratándose, el estado del animal que está tratándose, así como los otros componentes en la composición. La invención también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro principio activo. El experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad que va a administrarse basándose en la terapia con bG-CSF. El bG-CSF de la presente invención puede usarse por tanto para estimular la producción de glóbulos blancos y para corregir los niveles disminuidos de glóbulos rojos. Lo más comúnmente, los niveles de glóbulos blancos están disminuidos debido a cáncer, infección o quimioterapia. También pueden tratarse estados que pueden conducir a neutropenia en animales por lo demás sanos, tal como un tratamiento anticipado con agentes anticancerígenos. En general, cualquier estado que puede tratarse con hG-CSF también podría tratarse 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 principio activo tal como un agente anticancerígeno quimioterápico. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad que va a administrarse basándose en la terapia con bG-CSF.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden fabricarse de una manera convencional.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Selección del sitio para la incorporación de aminoácidos no codificados de manera natural en bG-CSF

Este ejemplo describe algunos de los muchos conjuntos de criterios posibles para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos no codificados de manera natural en bG-CSF.

Se generó un modelo teórico de GCSF bovino usando la estructura cristalina de GCSF humano unido a receptores (PDB ID n.º 2D9Q). Las coordenadas para esta estructura de GCSF humano están disponibles del Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Bernstein *et al.* J Mol Biol. 1997, 112, pág. 535). Los posibles residuos para la sustitución incluyen, pero sin limitarse a, sitios de sustitución conservativa y residuos con la mayor accesibilidad del disolvente usando el programa Cx (Pintar *et al.* (2002) Bioinformatics, 18(7):980-4). Los sitios de sustitución conservativa identificados para la sustitución con para-acetilfenilalanina incluyen, pero sin limitarse a, residuos de tirosina, fenilalanina y arginina que contienen un núcleo hidrófobo con o sin carga. No se seleccionaron para su sustitución residuos que pueden ser estructuralmente relevantes, incluyendo pero sin limitarse a, glicinas, prolinas y residuos implicados en la ocupación de extremos helicoidales. Tampoco se seleccionaron para su sustitución residuos en las regiones de unión a receptor conocidas. La posición 123 (Asp) y 141 (Thr) de SEQ ID NO: 1 pueden ser críticas para la interacción con un receptor. La posición 7 (Arg) puede ser crítica para el plegamiento del polipéptido. La posición 133 (Thr) es el sitio de glicosilación unido en O en el G-CSF humano.

En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones en bG-CSF: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de las mismas de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2.
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2.
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en una o más de las siguientes posiciones de bG-CSF: 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan en la posición 62 de bG-CSF (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2).
- En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos no codificados de manera natural se incorporan 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, adiciones o deleciones de aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos no naturales en una secuencia líder o señal que es N o C terminal con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF.

En algunas realizaciones, los aminoácidos que no se producen de manera natural en una o más de estas posiciones se unen a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitarse a, las posiciones: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF).

En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133,

134, 141, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitarse a, las posiciones: 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en una o más de estas posiciones se une a un polímero soluble en agua, incluyendo pero sin limitarse a, 62, 133, y una combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 62 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido no codificado de manera natural en la posición 133 se une a un polímero soluble en agua (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido que no se produce de manera natural en la secuencia señal o líder N o C terminal con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, u otra secuencia de bG-CSF se une a un polímero soluble en agua.

Ejemplo 2

Clonación y expresión de un polipéptido bG-CSF que contiene un aminoácido no codificado de manera natural y que se produce en *E. coli*.

Este ejemplo detalla la clonación y expresión de un polipéptido bG-CSF que incluye un aminoácido no codificado de manera natural en *E. coli* y los métodos para evaluar la actividad biológica de polipéptidos bG-CSF modificados.

Los expertos habituales en la técnica conocen métodos para clonar bG-CSF. Las secuencias de polipéptido y polinucleótido para bG-CSF y la clonación de bG-CSF en células huésped, así como la purificación de bG-CSFm se detallan en la patente estadounidense n.º 5.849.883, que se

incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento, y Heidari *et al.* Veterinary Immunology and Immunopathology (2001) 81:45-57.

El ADNc que codifica para 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 para el bG-CSF maduro con una metionina en el extremo N terminal se muestra como SEQ ID NO: 4. El polipéptido codificado por esta secuencia se muestra como SEQ ID NO: 2.

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 manera natural. La O-RS aminoacila preferentemente el O-ARNt con un aminoácido no codificado de manera natural. A su vez, el sistema de traducción inserta el aminoácido no codificado de manera natural en bG-CSF, en respuesta un codón selector codificado. 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 esta solicitud) y el documento WO 2007/021297 titulado "Compositions of tRNA and Uses Thereof (FI 3; SEQ ID NO: 23 en esta solicitud), que se incorporan como referencia en su totalidad en el presente documento.

Tabla 2: Secuencias de O-RS y O-ARNt.

SEQ ID NO:5	<i>M. jannaschii</i> mRNA ^{Tyr} _{CUA}	ARNt
SEQ ID NO:6	HL1008; un ARNt supresor ámbor optimizado	ARNt
SEQ ID NO:7	HL3254; un ARNt supresor de desplazamiento de marco AGG.A optimizado	ARNt
SEQ ID NO:8	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)	RS
SEQ ID NO:9	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina p-BpaRS(1)	RS
SEQ ID NO:10	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina propargil-PheRS	RS
SEQ ID NO:11	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina propargil-PheRS	RS
SEQ ID NO:12	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina propargil-PheRS	RS
SEQ ID NO:13	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(1)	RS
SEQ ID NO:14	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(3)	RS
SEQ ID NO:15	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)	RS
SEQ ID NO:16	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)	RS
SEQ ID NO:17	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW1)	RS
SEQ ID NO:18	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW5)	RS
SEQ ID NO:19	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW6)	RS
SEQ ID NO:20	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-5)	RS
SEQ ID NO:21	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-6)	RS

345

La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen la secuencia de polinucleótido de bG-CSF modificado y el par aminoacil ARNt sintetasa/ARNt ortogonales (específico para el aminoácido no codificado de manera natural deseado) permite la incorporación específica de sitio del aminoácido no codificado de manera natural en el polipéptido bG-CSF. El plásmido usado para la expresión de bG-CSF se muestra como figura 1. El gen de interés mostrado como ejemplo es bG-CSF con un codón selector (ámbar) que reemplaza al codón que codifica para T 133. El polipéptido con para-acetilfenilalanina en la posición 133 se denomina bG-CSF T133pAF. Plpp - promotor constitutivo de *E. coli*; Pro cluster - copias en tándem de ARNt para prolina de *E. coli*; FI 3 cluster - copias en tándem de un ARNt para tirosina de *Methanococcus jannaschii* modificado del documento WO 2007/021297; E9 RS (D286R) - tirosil ARNt sintetasa de *Methanococcus jannaschii* del documento WO 2006/068802; T7 pro - promotor de T7; terminador de T7; ori - origen de replicación; secuencia de bla (ap) - gen de resistencia a ampicilina.

Codon Devices, Inc, clonó y posteriormente subclonó polinucleótidos que codifican para bG-CSF de tipo natural o uno de los 15 polipéptidos mutantes en el vector pVK6. Cada constructo generado tenía un codón selector, un codón ámbar, en una posición diferente. Los polipéptidos bG-CSF resultantes tenían el aminoácido no codificado de manera natural, para-acetilfenilalanina (pAF; pAcF), que sustituía al aminoácido codificado de manera natural en una de las siguientes posiciones: L3, R7, E33, H43, Q58, S62, Q67, L69, L99, D123, L124, T133, Q134, T141 y R166 (los números de posición se refieren a SEQ ID NO: 1). Puesto que cada uno de los polipéptidos b-GCSF mutantes generados tenían cada uno una metionina en el extremo N terminal (véase la SEQ ID NO: 2 para la secuencia de tipo natural del G-CSF bovino con la metionina en el extremo N terminal), los polipéptidos b-GCSF expresados tenían sustituciones de aminoácidos no naturales en el número de posición +1 (por ejemplo, un mutante tenía la

leucina en la posición 4 de SEQ ID NO: 2 sustituida por pAF). Tras la verificación de la secuencia, se transformaron los plásmidos en células W3110 B2, y se hicieron crecer las colonias en placas con ampicilina. La información de la línea celular de *E. coli* se muestra como figura 2. Estas colonias se usaron para inocular 5 mL de LB con una dilución 1 : 1000 de cultivos de ampicilina, que se hicieron crecer a 37°C hasta una D.O.600 =0,8. Entonces se añadió pAF (para-acetilfenilalanina) a los 15 cultivos diferentes hasta una concentración final de 4 mM. Tras aproximadamente 30 minutos, se indujeron los cultivos con L-arabinosa hasta una concentración final del 0,2%, y se incubaron los cultivos a 37°C durante otras 5 horas. En ese momento, se tomó una muestra de 500 µL de cada cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 4 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 150 µL de B-PER con 1 µL de ADNasa y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. A la mañana siguiente, se añadió 4X tampón de muestra LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA), se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 minutos, y se añadió 10X agente reductor de muestras (Invitrogen, Carlsbad, CA). Entonces se resolvieron las muestras mediante SDS-PAGE en geles en gradiente al 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en tampón MES y se visualizaron usando Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). La figura 3 muestra las muestras generadas a partir de cultivos de tipo natural y mutantes de bG-CSF tras el análisis en geles en gradiente al 4-12% y tinción con Coomassie.

25 Solubilización de la preparación de cuerpos de inclusión

Se resuspendió la pasta celular mezclando hasta un contenido en sólidos final del 10% en tampón I de cuerpos de inclusión (CI) a 4°C (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 al 1%; 4°C). Se lisaron las células haciendo pasar 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 lavó el

sedimento de cuerpos de inclusión (CI) resuspendiendo en un volumen adicional de tampón I de CI (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 al 1%; 4°C) y se hizo pasar el material resuspendido a través de un microfluidizador a total de dos veces. Entonces se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento de CI en un volumen de tampón II (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; 4°C). Tras la resuspensión, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, y se decantó el sobrenadante. Entonces se resuspendió el sedimento de CI en un volumen Vi de tampón II (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; 4°C). Luego se tomaron alícuotas de CI añadiéndolos en recipientes adecuados. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, y se decantó el sobrenadante. Entonces los cuerpos de inclusión se solubilizaron o se almacenaron -80°C hasta su uso adicional.

Solubilización de los cuerpos de inclusión

Se solubilizaron los cuerpos de inclusión hasta una concentración final de entre 10-15 mg/mL en tampón de solubilización (Tris 20 mM, pH 8,0; guanidina 8 M; β -ME 10 mM). Se incubaron los CI solubilizados a temperatura ambiente con mezclado constante durante 1 hora hasta que se solubilizaron completamente. Se ajustó la concentración de proteínas mediante dilución con tampón de solubilización adicional si la concentración de proteína era alta.

Replegamiento

Se realizó el replegamiento diluyendo las muestras hasta una concentración de proteínas final de 0,5 mg/mL en arginina 0,5 M pH 8,0; 4°C. Se dejó que las muestras se replegaran durante de 48 a 72 horas a 4°C.

Purificación

Se añadió a las muestras $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta una concentración final del 20% con mezclado suave. Se mezclaron suavemente las muestras a 4°C durante 30 minutos. Se sedimentó la proteína precipitada (que contenía bG-CSF) mediante centrifugación a 12.000g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento en 1/2 volumen de replegamiento NaAc 20 mM, pH 4,5. No todo el sedimento volvió a la disolución. Sólo volvió a la disolución el bG-CSF. Se sedimentó el material no solubilizado mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos. Se decantaron las muestras y se guardó el sobrenadante. Se filtró el material de bG-CSF a través de un filtro de 0,45 μm . Entonces se cargó el material en una columna CM FF (GE Healthcare) equilibrada en tampón A (NaAc 20 mM, pH 4,5). El material era <10m/S antes de la carga 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 500 mM). La figura 4 muestra análisis de SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones pico de la columna CM FF ejecutada 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%. Entonces se concentró la combinación hasta aproximadamente 4,0 mg/mL de proteína. Se añadió a la combinación un exceso molar de 12:1 o 8:1 de hidroxilamina-bG-CSF PEG. Se incubó la mezcla a 28°C durante 48-72 horas. Entonces se diluyó la mezcla 8-10 veces con agua (< 8 m/S) y luego se cargó en 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 500 mM). La figura 5 muestra el análisis de SDS-PAGE de fracciones pico a partir de la columna SP HP para bG-CSF-T133pAF pegilado. También puede usarse etilenglicol al 5%, por ejemplo, en el tampón de elución.

Se agruparon las fracciones de bG-CSF pegilado y se dializaron frente al 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 hasta entre 6-8 mg/mL de proteína y se esterilizó por filtración usando un filtro PES de 0,22 μ m. Se almacenó la proteína a 4°C o se sometió a congelación súbita y se almacenó a -80°C para almacenamiento prolongado. La figura 6 muestra el análisis de SDS-PAGE de b-GCSF antes de y tras la pegilación. Carril 1: bG-CSF-T133pAF; carril 2: bG-CSF-T133pAF-20KPEG; carril 3: marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2.

Mapeo de péptidos (tripsina/endoproteinasa Glu-Q de bG-CSF)

Se realizó el mapeo de péptidos para confirmar la incorporación de para-acetilfenilalanina (pAF) en un polipéptido bG-CSF. Se diluyeron bG-CSF T133pAF purificado antes de la pegilación y bG-CSF de tipo natural hasta una concentración final de guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 7,8 y se redujeron con DTT 10 mM a 37°C durante una hora. Se alquiló la muestra con IAA 20 mM durante 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y se extinguió la reacción con la adición de DTT 20 mM final. Se dializó el material en bicarbonato de amonio 100 mM pH 7,7 y se trató con tripsina 1:50 (proteína:enzima) durante cuatro horas a 37°C. A esta reacción le siguió la adición de Glu-C 1 : 20 durante la noche a 25°C. Se extinguió la digestión con la adición de TFA para obtener una concentración final del 0,1%. Se aplicó la muestra en una columna en fase inversa Grace Vydac C8 en tándem con un espectrómetro de masas con trampa iónica ThermoFinnigan LCQ Deca. El gradiente comenzó en el 98% de fase móvil A (TFA al 0,05% en agua) de manera isocrática durante ocho minutos y luego disminuyó hasta el 60% de fase móvil B (TFA al 0,05% en acetonitrilo) a lo largo de 90 minutos con detección a 214 nm y 250 nm. Se aplicó una velocidad de flujo de 0,2 mL/min y una temperatura de la columna de 40°C. Se fijó el voltaje capilar a 15 V con intervalo de barrido completo de 100-2000 m/z. El voltaje de colisión para EM/EM fue el 42% del normalizado.

La figura 7a muestra el digesto de tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm). La figura 7b muestra el digesto de tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm). Se muestra el aumento de hidrofobicidad de la treonina con respecto a la sustitución de 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, se desplazó el péptido que contiene T133pAF y tuvo un tiempo de retención de 46,89 minutos.

La figura 8a muestra el digesto de tripsina/Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm). La figura 8b muestra el digesto de tripsina/Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm). Con análisis a 250 nm, las señales de proteína/péptido son bajas, pero la señal debida a pAF es fuerte. El péptido que contiene T133 pAF se indica en la figura 8b con un tiempo de retención de 46,89 minutos.

Mapeo de péptidos (endoproteinasa Glu-C de bG-CSF)

Se diluyó bG-CSF T133pAF purificado antes de la pegilación hasta una concentración final de guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 7,8 y se redujo con DTT 10 mM a 37°C durante una hora. Se alquiló la muestra con IAA 20 mM durante 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y se extinguió la reacción con la adición de DTT 20 mM final. Se dializó el material en bicarbonato de amonio 100 mM pH 7,7 y se trató con Glu-C 1 : 20 (proteína: enzima) durante la noche a 25°C. Se extinguió la digestión con la adición de TFA para obtener una concentración final del 0,1%. Se aplicó la muestra en una columna en fase inversa Grace Vydac C8 en tándem con un espectrómetro de masas con trampa iónica ThermoFinnigan LCQ Deca. El gradiente comenzó en el 98% de fase móvil A (TFA al 0,05% en agua) de manera isocrática durante ocho minutos y luego disminuyó hasta el 60% de fase móvil B (TFA al 0,05% en acetonitrilo) a lo largo de 90 minutos con detección a 214 nm y 250 nm. Se aplicó una velocidad de flujo de 0,2 mL/min y una temperatura de la columna de 40°C. Se fijó el voltaje capilar a

15 V con intervalo de barrido completo de 100-2000 m/z. El voltaje de colisión para EM/EM fue el 42% del normalizado.

La figura 9a muestra el digesto de Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 214 nm). La figura 9b muestra el digesto de Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 214 nm). Para bG-CSF de tipo natural, el péptido que contiene T133 tuvo un tiempo de retención de 52,04 minutos; para T133pAF bG-CSF, el péptido que contiene T133pAF tuvo un tiempo de retención de 53,95 minutos.

La figura 10a muestra el digesto de Glu-C de bG-CSF de tipo natural (detección a 250 nm). La figura 10b muestra el digesto de Glu-C de bG-CSF T133pAF (detección a 250 nm). Con el análisis a 250 nm, las señales de la proteína/péptido son bajas, pero la señal debida a pAF es fuerte. 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 de polipéptidos bG-CSF

Se usaron RP-HPLC y SEC-HPLC para analizar la pureza y para determinar la identidad de las muestras tras la purificación. Se diluyó PEG-bG-CSF T133pAF de 20K hasta 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 en fase inversa (C8) de octilo de poro ancho J. T. Baker (4,6 x 100 mm, 5 µm). El gradiente comenzó con el 50% de fase móvil A (TFA al 0,1% en agua) y aumentó hasta el 70% de fase móvil B (TFA al 0,1% en acetonitrilo) a lo largo de 26 minutos. Se regeneró la columna con un 90% de fase móvil B durante 4 minutos y se reequilibró con un 50% de fase móvil A a lo largo de 5 minutos. Se aplicaron una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y una temperatura de la columna de 60°C con detección a 214 nm. Se realizó el análisis usando el software Agilent Chemstation. La tabla 3 muestra el pico principal (PEG-bG-CSF T133pAF de 20K) con un tiempo de retención de

8,50 minutos. Mediante el cálculo del % del área, se obtuvo que el 91,2% de la muestra era b-GCSF pegilado.

5

10

TABLA 3		
Tiempo (minutos)	Area	Area%
4.2	50.6	0.6
5.0	20.0	0.3
6.8	155.2	2.0
7.3	99.7	1.3
8.0	121.2	1.5
8.5	7245.0	91.2
9.3	87.9	1.1
9.7	31.9	0.4
10.1	135.5	1.7

15

También se analizó el bG-CSF que no estaba pegilado mediante RP-HPLC. La tabla 4 muestra el pico principal (bG-CSF T133pAF) con un tiempo de retención de 8,893 minutos. Mediante el cálculo del % del área, se obtuvo que el 64,3% de la muestra era bG-CSF T133pAF.

20

25

TABLA 4		
Tiempo (minutos)	Area	Area%
5.6	114.3	1.6
7.4	17.4	0.2
8.1	12.2	0.2
8.2	13.6	0.2
8.3	13.7	0.2
8.9	4622.1	64.3
9.3	930.8	13.0

30

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

También se analizó PEG-bG-CSF T133pAF de 20K mediante SEC-HPLC. Se inyectó la muestra pura (2 µL) en una columna de exclusión molecular Tosohaas TSK Super SW3000 (4,6 x 300 mm, 4 µm 250Å usando un gradiente isocrático de 25 minutos. La fase móvil contiene un 97% de fosfato de sodio 63 mM pH 7,0 y un 3% de 2-propanol. Se aplicó una velocidad de flujo de 0,3 mL/min y una temperatura de la columna de 25°C con detección a 214 nm. Se realizó el análisis usando el software Agilent Chemstation. La tabla 5 muestra el pico principal con un tiempo de retención de 9,157 minutos. Mediante el cálculo del % del área, se obtuvo que el 98,3% de la muestra era PEG-bG-CSF monomérico. Véase la figura 11 para el análisis de SEC-HPLC del polipéptido pegilado.

TABLA 5		
Tiempo (minutos)	Area	Area%
7.0	50.3	0.1
8.2	228.0	0.6
9.2	36454.5	98.3
10.1	361.4	1.0

También se analizó el bG-CSF que no estaba pegilado mediante SEC-HPLC. La tabla 6 muestra el pico principal con un tiempo de retención de 13,125 minutos. Mediante el cálculo del % del área, se obtuvo que el 99,0% de la muestra era bG-CSF T133pAF monomérico. Véase la figura 12 para el análisis de SEC-HPLC del polipéptido.

TABLA 6		
Tiempo (minutos)	Area	Area%
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

También se realizó el análisis de ESI-TOF de alta precisión (Agilent Technology) del polipéptido bG-CSF para confirmar la identidad del polipéptido bG-CSF. Se dializó el bG-CSF T133pAF purificado en ácido fórmico al 0,1%. Se aplicó la muestra en un cartucho C-18 durante un
 5 minuto con agua y luego se eluyó con acetonitrilo al 50% en agua. El tiempo de ejecución total fue de tres minutos con una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Se fijó el voltaje capilar ESI a 4 kV, y se fijó el voltaje del fragmentador MSTOF a 300 V. Se llevó a cabo la deconvolución de la envolvente del estado de carga escaneada para proporcionar un valor de
 10 MH⁺. El valor de MH⁺ PM esperado fue de 19145. El valor de MH⁺ PM observado fue de 19146.

Ensayo de proliferación con M-NFS60

Para evaluar la potencia de las moléculas de bG-CSF, se realizó un
 15 ensayo de proliferación con la línea celular M-NFS60. La línea celular se adquirió de la ATCC (n.º de catálogo CRL-1838). Se descongelaron las células y se mantuvieron en RPMI 1640 + FBS al 10% + penicilina / estreptomicina + 2-mercaptoetanol 50 uM + mIL-3 20 ng/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA; mIL3 de BD Pharmingen n.º de catálogo 554579). Se
 20 dividieron las células cada dos días y se sembraron a $0,02 \times 10^6$ células/mL.

El día antes del ensayo, se dividieron las células hasta $0,1 \times 10^6$ células/mL. Tras 16-24 horas, se sembraron las células en medio de ensayo en placas negras, de fondo plano, de 96 pocillos, a 10.000 células/pocillo y se añadieron por duplicado diluciones en serie de los compuestos de bG-
 25 CSF. El volumen total por pocillo fue de 100 µL, y el medio de ensayo fue RPMI 1640 + FBS al 10% + P/S. También se añadieron patrones por duplicado, tales como Neupogen® y bG-CSF de tipo natural, para cada placa. Entonces se incubaron las placas a 37°C, CO₂ al 5% durante 42 horas. Tras esta incubación de 42 horas, se añadieron 10 uL/pocillo de
 30 Alamar Blue (Biosource n.º de catálogo: DALI 100) y se incubaron las placas durante otras 6 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Entonces se centrifugaron

las placas a 4000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier burbuja de aire. Se leyeron las placas en el fluorómetro Tecan con parámetros de excitación a 535 nm y emisión a 590 nm. Se envolvieron las placas en papel metalizado para evitar la exposición a la luz del colorante Alamar Blue sensible a la luz.

Para el análisis de los datos, se realizó un promedio de diluciones en serie por duplicado para cada compuesto, y se calcularon los valores de CE50 en SigmaPlot. Se enumeraron los valores de CE50 sin procesar para todos los compuestos y se calcularon las diferencias en veces (se compararon compuestos de GCSF bovino pegilado con bG-CSF de tipo natural). Los experimentos se realizaron múltiples veces para establecer un CV dentro del ensayo <20% y un CV entre ensayos <30%. Figura 13/tabla 7 = Ensayo de proliferación con M-NFS60 – valores de CE50 sin procesar de G-CSF T133pAF bovino pegilado de 20K y de tipo natural. Figura 14/tabla 8 = Ensayo de proliferación con M-NFS60 – diferencias de CE50 en veces de G-CSF T133pAF bovino pegilado de 20K frente al tipo natural.

Se sometieron a ensayo otras moléculas de bG-CSF que comprenden una sustitución de aminoácido no codificado de manera natural. La tabla 9 muestra los valores de CE50 promedio obtenidos.

5

10

TABLA 7					
		Neupogen	Neulasta	WT bG-CSF	20K PEG-bT133 [Lote NK2]
RESUMEN	Avg EC50 [ng/ml]	0.025	0.077	0.053	0.270
	SD	0.005	0.004	0.005	0.042
	CV	18%	5%	9%	16%
	N	14	5	16	2

TABLA 8					
		Neupogen	Neulasta	WT bG-CSF	20K PEG-bT133 [Lote NK2]
RESUMEN	Fold Diff EC50 [X]	1.0	3.2	1	5.1
	SD	0.0	0.7	0	0.5
	CV	0%	23%	0%	9%
	N	14	5	12	2

TABLA 9			
	Avg EC50 Valores	SD	CV
Neupogen	0.025	0.005	18%
WT bG-CSF	0.053	0.005	9%
Neulasta	0.077	0.004	5%
20kPEG-bS62	0.150	0.008	5%
20kPEG-bT133 [NK1]	0.258	0.045	17%
20kPEG-bT133 [NK2]	0.270	0.042	16%
20kPEG-bR7	0.348	0.073	21%
20kPEG-bR166	0.363	0.033	9%
20kPEG-bL3	0.477	0.081	17%

Tinción con CD11b de neutrófilos bovinos

Se añadieron 50 ul de sangre bovina a una placa de 96 pocillos de poliestireno no tratada (Cal Poli Pomona). Se estimularon las células añadiendo 50 ul de Neupogen[®], Neulasta[®], o bG-CSF-T133pAcF-20K PEG diluido en PBS (de 200 ng/ml a 0,001 ng/ml final). Se mezcló suavemente la disolución y se incubó durante 30 minutos a 39°C en un incubador de CO₂. Se añadieron 20 ug/ml de anticuerpo primario a las células (CD11b de ratón anti-bovino: MM12A, VMRD). Se incubaron las células a 4°C durante 30 minutos. Se centrifugó la placa de ensayo a 800xg durante 2 minutos, y se desechó el sobrenadante. Se lisaron los eritrocitos durante 1 minuto añadiendo 150 ul de disolución de lisis frío (fosfato 0,15 M, pH 7,2), y se restauró la isotonicidad añadiendo 50 ul de disolución de restauración (fosfato 0,15 M, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Se centrifugó de nuevo 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 (1xPBS, HEPES 2,5 mM, azida de sodio al 0,1%, FBS al 2,0%) y se resuspendieron en 100 ul de tampón FACS. Se añadieron 20 ug/ml de anticuerpo secundario (IgG1 de cabra anti-ratón, ads-PE humano) y se incubó a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Se sedimentaron y se lavaron las células dos veces y se resuspendieron en 200 ul de tampón FACS. Se usó el instrumento FACS Array de BD para adquirir 50.000 eventos y contar las células positivas para CD11b.

La figura 15 muestra los resultados del experimento en el que se tiñeron neutrófilos bovinos con anticuerpo CD11b para evaluar su capacidad de respuesta a diversas moléculas. Se usó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para granulocitos para determinar el nivel de presentación de CD11b presentación en la superficie celular. El % de IMF es un valor normalizado en relación con un grupo control no estimulado. Se generaron curvas de respuesta a la dosis y valores de CE50 para

Neupogen, Neulasta y bG-CSF T133pAF-20K PEG basándose en un ajuste de 4 parámetros. El valor de CE50 para Neupogen® fue de 3,18 ng/ml. Para Neulasta®, el valor de CE50 fue de 2,84 ng/ml, y para bG-CSF T133pAF-20K PEG, el valor de CE50 fue de 6,23 ng/ml.

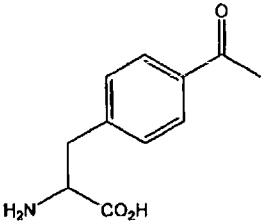
5

Ejemplo 3

Introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y reacción posterior con un PEG que contiene aminooxilo

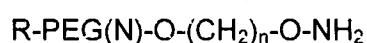
Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido bG-CSF que incorpora un aminoácido no codificado de manera natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxilo de aproximadamente 5.000 de PM. Se sustituye por separado cada uno de los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) por un aminoácido no codificado de manera natural que tiene la siguiente estructura:

30



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica de sitio de p-acetilfenilalanina en bG-CSF son SEQ ID NO: 3 ó 4 (bG-CSF), y SEQ ID NO: 23 ó 5 (mutfRNA, *M. jannaschii* mtRNA^{try}_{CUA}), y SEQ ID NO: 22, 24, 17, 18, 19 (TyrRS LWI, 5 ó 6) descritas en el ejemplo 2 anterior.

Una vez modificado, se hace reaccionar la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo con un derivado de PEG que contiene aminooxilo de la forma:



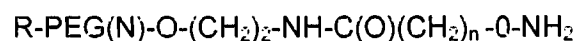
en la que R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 5.000 de PM.

Se hace reaccionar el b-GCSF que contiene p-acetilfenilalanina purificado 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 aminooxilo, y luego se agita durante 10 - 16 horas a temperatura ambiente (Jencks, W. J Am. Chem. Soc. 1959, 81, pág. 475). Entonces se diluye el PEG-b-GCSF en un tampón apropiado para la purificación y el análisis inmediatos.

Ejemplo 4

Conjugación con un PEG que consiste en un grupo hidroxilamina unido al PEG por medio de un enlace amida

Se acopla un reactivo de PEG que tiene la siguiente estructura a un aminoácido no codificado de manera natural que contiene cetona usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3:



en la que R = metilo, n=4 y N es aproximadamente 20.000 de PM. Las condiciones de reacción, purificación y análisis son tal como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 5

Introducción de dos aminoácidos no codificados de manera natural distintos en polipéptidos bG-CSF

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido bG-CSF que incorpora un aminoácido no codificado de manera natural que comprende una funcionalidad cetona en dos posiciones entre los siguientes residuos: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF). Se prepara el polipéptido bG-CSF tal como se describe en los ejemplos 1 y 2, excepto porque se introduce el codón selector en dos sitios distintos dentro del ácido nucleico.

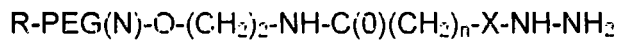
25

Ejemplo 6
Conjugación del polipéptido bG-CSF con un PEG que contiene hidrazida y posterior reducción *in situ*

Se prepara un polipéptido bG-CSF que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo según el procedimiento descrito en los ejemplos 2 y 3.

30

Una vez modificado, se conjuga un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura con el polipéptido bG-CSF:



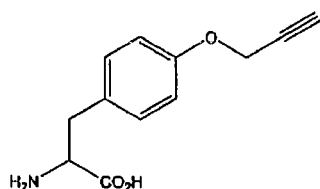
5 en la que R = metilo, n=2 y N = 10.000 de PM y X es un grupo carbonilo (C=O). Se disuelve el b-GCSF que contiene p-acetilfenilalanina purificado a entre 0,1-10 mg/mL en MES 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en acetato de sodio 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 1 a 100 veces de PEG que contiene hidrazida, y se reduce la hidrazona correspondiente *in situ* mediante la adición de NaCNBH₃ 1 M de reserva (Sigma Chemical, St. Louis, MO), se disuelve en H₂O, hasta una concentración final de 10-50 mM. Se llevan a cabo las reacciones en la oscuridad a 4°C a TA durante 18-24 horas. Se detienen las reacciones mediante la adición de Tris 1 M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris de 50 mM o se diluyen en un tampón apropiado para la purificación inmediata.

Ejemplo 7

20 Introducción de un aminoácido que contiene alquino en un polipéptido bG-CSF y derivatización con mPEG-azida

Se sustituye cada uno de los siguientes residuos, antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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, 25 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, 30 140, 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,

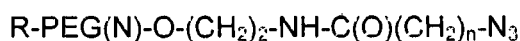
170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF), por el siguiente aminoácido no codificado de manera natural:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica de sitio de p-propargil-tirosina en bG-CSF son SEQ ID NO: 3 ó 4, SEQ ID NO: 5 (muttRNA, *M. jannaschii* mtRNA^{try_{CUA}}), 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.

Se añaden a la mezcla de reacción el bG-CSF que contiene propargil-tirosina purificado disuelto a entre 0,1-10 mg/mL en tampón PB (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15 M, pH = 8) y un exceso de 10 a 1000 veces de un PEG que contiene azida. Entonces se añade a la mezcla de reacción una cantidad catalítica de hilo de Cu y CuSO₄. Tras incubarse la mezcla (incluyendo pero sin limitarse a, aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente o 37°C, o durante la noche a 4°C), se añade H₂O y se filtra la mezcla a través de una membrana de diálisis. Puede analizarse la muestra para la adición, incluyendo pero sin limitarse a, mediante procedimientos similares descritos en el ejemplo 3.

En este ejemplo, el PEG tendrá la siguiente estructura:

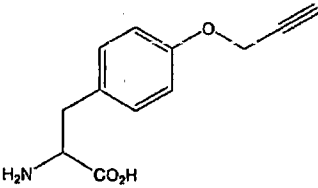


en la que R es metilo, n es 4 y N es 10.000 de PM.

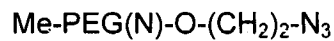
Ejemplo 8

Sustitución de un aminoácido hidrófobo grande en un polipéptido bG-CSF por propargil tirosina

Se sustituye un residuo de Phe, Trp o Tyr presente dentro de una las
5 siguientes regiones de bG-CSF: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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,
10 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,
15 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína), y cualquier combinación de las mismas (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) por el siguiente aminoácido no codificado de
20 manera natural tal 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:



5 y le seguirían procedimientos de acoplamiento como los del ejemplo 7. Esto generará un variante de polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que es aproximadamente isostérico con uno de los aminoácidos hidrófobos grandes que se producen de manera natural y que se modifica con un derivado de PEG en un sitio
10 distinto dentro del polipéptido.

Ejemplo 9

Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o
15 heteromultímero de polipéptido bG-CSF separado por uno o más ligadores 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:



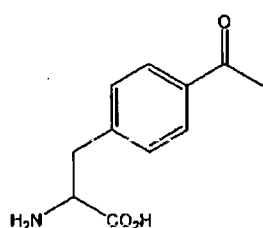
20 en la que n es 4 y el PEG tiene un PM promedio de aproximadamente 5.000, para generar el homodímero de polipéptido bG-CSF correspondiente en el que las dos moléculas de bG-CSF están separadas físicamente por PEG. De una manera análoga, puede acoplarse un polipéptido bG-CSF a uno o más de otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o
25 heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los ejemplos 7 y 3.

Ejemplo 10

Acoplamiento de un resto de sacárido a un polipéptido bG-CSF

30 Se sustituye un residuo de los siguientes por el aminoácido no codificado de manera natural a continuación: antes de la posición 1 (es

decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1, 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en otro polipéptido bG-CSF) tal como se describe en el ejemplo 3.



Una vez modificado, se hace reaccionar la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo con un análogo de aminoóxido unido en un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Se mezclan la variante de polipéptido bG-CSF (10 mg/mL) y el sacárido de aminoóxido (21 nM) en tampón acetato de sodio acuoso 100 mM (pH 5,5) y se incuba a 37°C durante de 7 a 26 horas. Se acopla enzimáticamente un segundo sacárido al primero incubando el polipéptido bG-CSF conjugado con el sacárido (5 mg/mL) con UDP-galactosa (16 mM) y un 1,4-

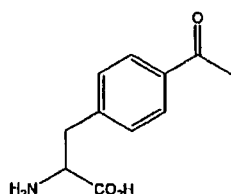
galactosiltransferasa (0,4 unidades/mL) en tampón HEPES 150 mM (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente (Schanbacher *et al.* J Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

5 Ejemplo 11

Generación de un antagonista de polipéptido bG-CSF pegilado.

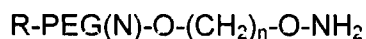
Se sustituye un residuo, incluyendo pero sin limitarse a, los implicados en la unión al receptor de bG-CSF por el siguiente aminoácido no codificado de manera natural tal como se describe en el ejemplo 3.

10



15

Una vez modificado, se hará reaccionar la variante de polipéptido bG-CSF que comprende el aminoácido que contiene carbonilo con un derivado de PEG que contiene aminooxilo de la forma:



20

en la que R es metilo, n es 4 y N es 20.000 de PM para generar un antagonista de polipéptido b-GCSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que está modificado con un derivado de PEG en un único sitio dentro del polipéptido. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como en el ejemplo 3.

25

Ejemplo 12

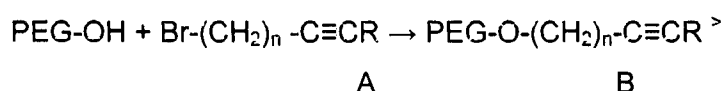
Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de polipéptido bG-CSF en el que las moléculas de bG-CSF se unen directamente

30

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 azida. De una manera análoga, un polipéptido bG-CSF puede acoplarse a uno o más de otros 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



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 desde uno hasta nueve y R' puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo, de C1 a C20, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada. 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 o heteroalcarilo sustituido o no sustituido (el alquilo es un alquilo saturado o insaturado de C1 a C20). Normalmente, PEG-OH es polietilenglicol (PEG) o monometoxi-polietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 800 a 40.000 Daltons (Da).

Ejemplo 14



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). Entonces se añadieron una disolución de bromuro de propargilo, disuelto como una disolución al 80% en peso en xileno (0,56 mL, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich), y una cantidad catalítica de KI a la disolución y se calentó la mezcla resultante hasta reflujo durante 2 horas. Entonces se añadió agua (1

mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se añadió al residuo CH_2Cl_2 (25 mL) y la fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se redujo el volumen hasta aproximadamente 2 mL. Esta disolución de CH_2Cl_2 se añadió a dietil éter (150 mL) gota a gota. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de dietil éter frío, y se secó para dar propargil-O-PEG.

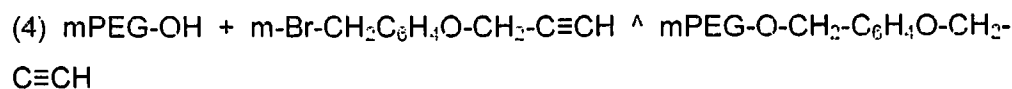
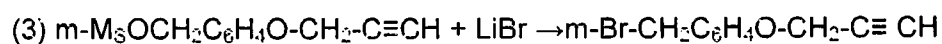
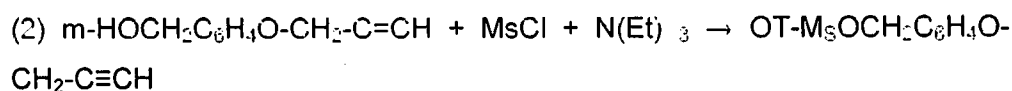
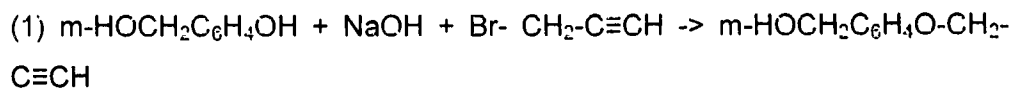
Ejemplo 15



Se trató el 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). Entonces se añadieron a la mezcla cincuenta equivalentes de 5-bromo-1-penteno (0,53 mL, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI. Se calentó la mezcla resultante hasta reflujo durante 16 horas. Entonces se añadió agua (1 mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se añadió al residuo CH_2Cl_2 (25 mL) y la fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se redujo el volumen hasta aproximadamente 2 mL. Esta disolución de CH_2Cl_2 se añadió a dietil éter (150 mL) gota a gota. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de dietil éter frío, y se secó para dar el alquino correspondiente. Puede usarse 5-cloro-1-penteno en una reacción similar.

Ejemplo 16

Producción de $\text{mPEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$



A una disolución de 3-hidroxibencilalcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 mL) y agua (2,5 mL) se le añadió en primer lugar hidróxido de sodio en polvo (1,5 g, 37,5 mmol) y luego una disolución de bromuro de propargilo, disuelto como una disolución al 80% en peso en xileno (3,36 mL, 30 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas. Se añadió a la mezcla ácido cítrico al 10% (2,5 mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para dar el alcohol 3-propargiloxibencílico.

Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una disolución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH₂Cl₂ a 0°C y se colocó la reacción en la nevera durante 16 horas. Un tratamiento final habitual dio 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 hasta reflujo durante 1 hora y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla agua (2,5 mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

Se disolvió mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) en THF (20 mL) y se enfrió la disolución en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) con agitación vigorosa a lo largo de un periodo de varios minutos seguido por adicción 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 hasta reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 mL) a la mezcla y se eliminó el disolvente a vacío. Se añadió al residuo CH₂Cl₂ (25 mL) y la fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen hasta aproximadamente 2 mL. La adición gota a gota a una disolución de éter (150 mL) dio como resultado un precipitado blanco, que se recogió para dar el derivado de PEG.

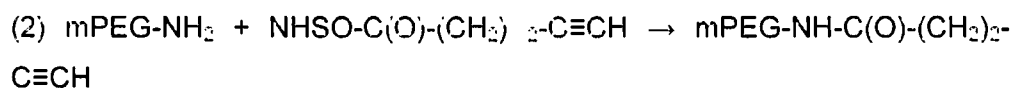
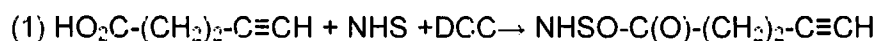
Ejemplo 17



Los polímeros de poli(etilenglicol) que contienen alquino terminal también pueden obtenerse acoplado un polímero de poli(etilenglicol) que contiene un grupo funcional terminal a una molécula reactiva que contiene la funcionalidad alquino. Tal como se mostró anteriormente, n es entre 1 y 10. R' puede ser H o un grupo alquilo pequeño desde C1 hasta C4.

Ejemplo 18

Producción de mPEG-NH-C(O)-(CH₂)₂-C≡CH



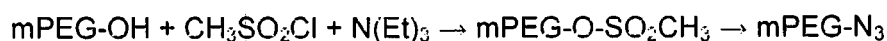
Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g, 3,0 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y se agitó la disolución durante la noche a temperatura ambiente. El éster de NHS 7 bruto resultante se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Se disolvió mPEG-NH₂ con un peso molecular de 5.000 Da (mPEG-NH₂, 1 g, Sunbio) en THF (50 mL) y se enfrió la mezcla hasta 4°C. Se añadió éster de NHS 7 (400 mg, 0,4 mmol) en porciones con agitación vigorosa. Se permitió que la mezcla se agitara durante 3 horas mientras se calentaba hasta temperatura ambiente. Entonces se añadió agua (2 mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se añadió al residuo CH₂Cl₂ (50 mL) y la fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen hasta aproximadamente 2 mL. Esta disolución de CH₂Cl₂ se añadió a éter (150 mL) gota a gota. Se recogió el precipitado resultante y secó a vacío.

Ejemplo 19

Preparación de metanosulfonato o mesilato de poli(etilenglicol)

Este ejemplo representa la preparación del éster de metanosulfonilo de poli(etilenglicol), que también puede denominarse metanosulfonato o mesilato de poli(etilenglicol). El tosilato y los haluros correspondientes pueden prepararse mediante procedimientos similares.

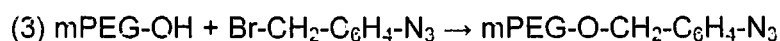
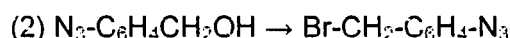
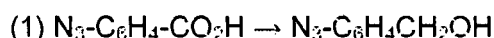


Se destiló azeotrópicamente el mPEG-OH (PM = 3.400, 25 g, 10 mmol) en 150 mL de tolueno durante 2 horas bajo nitrógeno y se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente. Se añadieron a la disolución 40 mL de CH_2Cl_2 seco y 2,1 mL de trietilamina seca (15 mmol). Se enfrió la disolución en un baño de hielo y se añadieron gota a gota 1,2 mL de cloruro de metanosulfonilo destilado (15 mmol). Se agitó la disolución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche, y se extinguió la reacción añadiendo 2 mL de etanol absoluto. Se evaporó la mezcla a vacío para eliminar los disolventes, principalmente los distintos de tolueno, se filtró, se concentró de nuevo a vacío y luego se precipitó en 100 mL de dietil éter. Se lavó el filtrado con varias partes de dietil éter frío y secó a vacío para dar el mesilato.

Se disolvió el mesilato (20 g, 8 mmol) en 75 mL de THF y se enfrió la disolución hasta 4°C . A la disolución enfriada se le añadió azida de sodio (1,56 g, 24 mmol). Se calentó la reacción hasta reflujo bajo nitrógeno durante 2 horas. Entonces se evaporaron los disolventes y se diluyó el residuo con CH_2Cl_2 (50 mL). Se lavó la fracción orgánica con disolución de NaCl y se secó sobre MgSO_4 anhidro. Se redujo el volumen hasta 20 mL y se precipitó el producto mediante adición a 150 mL de éter seco frío.

Ejemplo 20

Producción de $\text{mPEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N}_3$



Puede producirse alcohol 4-azidobencílico usando el método descrito en la patente estadounidense 5.998.595, que se incorpora como referencia al presente documento. Se añadieron cloruro de metanosulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una disolución de alcohol 4-azidobencílico (1,75 g, 11,0 mmol) en CH₂Cl₂ a 0°C y se colocó la reacción en la nevera durante 16 horas. Un tratamiento final habitual dio el mesilato como 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 hasta reflujo durante 1 hora y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla agua (2,5 mL) y se eliminó el disolvente a vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado. 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. Se calentó la mezcla resultante hasta reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 mL) a la mezcla y se eliminó el disolvente a vacío. Se añadió al residuo CH₂Cl₂ (25 mL) y la fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen hasta aproximadamente 2 mL. La adición gota a gota a una disolución de éter (150 mL) dio como resultado un precipitado, que se recogió para dar mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃.

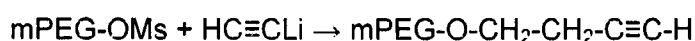
Ejemplo 21

$$\text{NH}_2\text{-PEG-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H} + \text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{-NHS} \rightarrow \text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)NH-PEG-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$$

Se disolvió NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H (PM 3.400 Da, 2,0 g) en una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL) y se enfrió la disolución hasta 0°C. Se añadió propionato de 3-azido-1-N-hidroxisuccinimido (5 equiv.) con agitación vigorosa. Tras 3 horas, se añadieron 20 mL de H₂O y se agitó la mezcla durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente.

Se ajustó el pH a 3 con H₂SO₄ 0,5 N y Se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente el 15% en peso. Se extrajo la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (100 mL x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Tras la precipitación con dietil éter frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó a vacío para dar el derivado de PEG omega-carboxi-azida.

Ejemplo 22



A una disolución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparada tal como se conoce en la técnica y enfriada hasta -78°C en THF, se le añade gota a gota una disolución de mPEG-OMs disuelto en THF con agitación vigorosa. Tras 3 horas, se permite que la reacción se caliente hasta temperatura ambiente y se extingue con la adición de 1 mL de butanol. Entonces se añadieron 20 mL de H₂O y se agitó la mezcla durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con H₂SO₄ 0,5 N y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente el 15% en peso. Se extrajo la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (100 mL x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Tras la precipitación con dietil éter frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó a vacío para dar 1-(but-3-iniloxi)-metoxipoli(etilenglicol) (mPEG).

Ejemplo 23

Incorporación de aminoácidos que contienen azida y acetileno

Pueden incorporarse aminoácidos que contienen azida y acetileno de manera selectiva de sitio en proteínas usando los métodos descritos en L. Wang, *et al.*, (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin *et al.*, Science 301:964-7 (2003)), J. W. Chin *et al.*, (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11):1135-1137; J. W. Chin, *et al.*, (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024; y L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1: 1-11. Una vez incorporados los aminoácidos, se lleva a cabo la

reacción de cicloadición con proteína 0,01 mM en tampón fosfato (PB), pH 8, en presencia de derivado de PEG 2 mM, CuSO_4 1 mM y ~1 mg de hilo de Cu durante 4 horas a 37°C.

5 Ejemplo 24

Síntesis de p-acetil-D,L-fenilalanina (pAF) y derivados de m-PEG-hidroxilamina.

La pAF racémica se sintetiza usando el procedimiento descrito anteriormente en Zhang, Z., Smith, B. A. C, Wang, L., Brock, A., Cho, C, & Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746.

Para sintetizar el derivado de m-PEG-hidroxilamina, se completan los siguientes procedimientos. A una disolución de ácido (N-t-Boc-aminoxil)acético (0,362 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 le añaden metoxi-polietilenglicol-amina (m-PEG-NH₂, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, de BioVectra) y diisopropiletilamina (0,1 mL, 0,5 mmol). Se agita la reacción a TA durante 48 horas, y luego se concentra hasta aproximadamente 100 mL. Se añade gota a gota la mezcla a éter frío (800 mL). Se precipita el producto protegido con t-Boc y se recoge mediante filtración y se lava mediante éter 3 x 100 mL. Se purifica adicionalmente redisolviendo en DCM (100 mL) y precipitando en éter (800 mL) dos veces. Se seca el producto a vacío dando 7,2 g (96%), confirmado mediante RMN y la prueba de nihidrina.

Se lleva a cabo el defloc del producto protegido (7,0 g) obtenido anteriormente en 50% de TFA/DCM (40 mL) a 0°C durante 1 hora y luego a TA durante 1,5 horas. Tras eliminar la mayor parte del TFA a vacío, se convierte la sal de TFA del derivado de hidroxilamina en la sal de HCl añadiendo al residuo HCl 4 N en dioxano (1 mL). Se disuelve el precipitado en DCM (50 mL) y vuelve a precipitarse en éter (800 mL). Se recoge el producto final (6,8 g, 97%) mediante filtración, se lava con éter 3 x 100 mL,

se seca a vacío, se almacena bajo nitrógeno. Se sintetizan otros derivados de PEG (5K, 20K) hidroxilamina usando el mismo procedimiento.

Ejemplo 25

5 Actividad *in vitro* e *in vivo* de bG-CSF pegilado

Se administra a ratones o ratas PEG-bG-CSF, bG-CSF no modificado y disolución tampón. Los resultados mostrarán la actividad superior y la semivida prolongada del bG-CSF pegilado de la presente invención en comparación con bG-CSF no modificado, lo que se indica por las cantidades significativamente aumentadas de neutrófilos y por un cambio en el recuento de glóbulos blancos máximo utilizando la misma dosis por ratón.

Análisis farmacocinético

Se administra un polipéptido bG-CSF de la invención mediante vías intravenosas o subcutáneas a ratones. Se extrae sangre de los animales antes de y en puntos de tiempo tras la dosificación. Se recoge el plasma de cada muestra y se analiza mediante radioinmunoanálisis. La semivida de eliminación puede calcularse y compararse entre polipéptidos bG-CSF que comprenden un aminoácido no codificado de manera 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 pueden administrarse a monos *Cynomolgus*. Se extrae sangre de los animales antes de y en puntos de tiempo tras la dosificación. Se recoge el plasma de cada muestra y se analiza mediante radioinmunoanálisis.

Los polipéptidos de la invención pueden administrarse a un modelo animal de enfermedad. Los estudios con animales que pueden realizarse implican ganado expuesto a *Pasteurella hemolytica*, ganado con exposición bacteriana de la glándula mamaria/exposición a mastitis (*Klebsiella pneumoniae*). Otros estudios que pueden realizarse evalúan el control, la incidencia y la duración de la enfermedad respiratoria bovina, o la prevención de la mastitis por coliformes. Un experto habitual en la técnica

conoce métodos para evaluar la salud de los animales, la producción de leche, el recuento de neutrófilos y otros parámetros. Otros modelos que pueden usarse para evaluar los polipéptidos bG-CSF de la invención incluyen pero sin limitarse a, modelos animales de infección o exposición a infección tales como un modelo de hámster de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*, un modelo de rata de pielonefritis por *Candida albicans*, modelos que incluyen potros neonatales y modelos que incluyen cerdos en crecimiento. Algunos de estos modelos se describen en la patente estadounidense n.º 5.849.883 y el documento WO 89/10932. Los expertos habituales en la técnica conocen modelos tales como estos.

Ensayo con ^3H -timidina. El ensayo con ^3H -timidina se realiza usando métodos convencionales. Se obtiene médula ósea de ratones Balb C hembra sacrificados o de otros animales. Las células de la médula ósea se suspenden brevemente, se centrifugan y se resuspenden 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 a cada pocillo muestras del análogo de G-CSF purificado (tal como se preparó anteriormente), y se incuban durante 68 horas. Se añade timidita tritiada a los pocillos y se deja incubar durante cinco horas adicionales. Tras el tiempo de incubación de cinco horas, las células se recogen, se filtran y se enjuagan meticulosamente. Se añaden filtros a un vial que contiene líquido de centelleo. Se cuentan las emisiones beta (contador de centelleo LKB Betaplate). Se analizan patrones y análogos por triplicado y se vuelven a someter a ensayo las muestras que están sustancialmente por encima o por debajo de la curva patrón con la dilución apropiada. Se notifican los resultados como el promedio de los datos de los análogos por triplicado con respecto a los resultados del patrón de bG-CSF no alterado.

Se somete a ensayo la inducción de proliferación de células de la médula ósea humana partiendo de la base del aumento de la incorporación de ^3H -timidina. Se somete a ensayo médula ósea humana de donantes

sanos en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia) y se suspenden las células de baja densidad en medio de Iscove (GIBCO) que contiene suero bovino fetal al 10% y glutamina penstrep. Posteriormente, se incuban 2×10^4 células de médula ósea humana o bien con medio de control o bien con el material de bG-CSF derivado de *E. coli* recombinante en placas de 96 pocillos de fondo plano a 37°C en CO₂ al 5% en aire durante 2 días. Se someten a ensayo las muestras por duplicado y la concentración variaba a lo largo de un intervalo de 10.000 veces. Entonces se pulsan los cultivos durante 4 horas con 0,5 µCi/pocillo de ³H-timidina (New England Nuclear, Boston, Mass.). Se mide la captación de ³H-timidina tal como se describe en Venuta, *et al.*, Blood, 61, 781 (1983).

Inducción de diferenciación de WEHI-3B D⁺. Se somete a ensayo la capacidad de los polipéptidos bG-CSF de la presente invención para inducir la diferenciación de la línea celular de leucemia mielomonocítica murina WEHI-3B D⁺ en medio de agar semisólido tal como se describe en Metcalf, Int. J. Cancer, 25, 225 (1980). Se incuban el producto de bG-CSF recombinante y controles de los medios con aproximadamente 60 células WEHI-3B D⁺/pocillo a 37°C en CO₂ al 5% en aire durante 7 días. Se incuban las muestras en placas de 24 pocillos de fondo plano y la concentración variaba a lo largo de un intervalo de 2000 veces. Se clasifican las colonias como no diferenciadas, parcialmente diferenciadas o completamente diferenciadas y se realiza microscópicamente el recuento de las células en colonias.

Ensayos con CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM. Se ha encontrado que aislados naturales de G-CSF y hG-CSF humanos hacen que las células de médula ósea humana proliferen y se diferencien. Estas actividades se miden en ensayos con CFU-GM [Broxmeyer, *et al.*, Exp. Hematol., 5, 87, (1971)], BFU-E y CFU-GEMM [Lu, *et al.*, Blood, 61, 250 (1983)] usando células de médula ósea de baja densidad, no adherentes de voluntarios humanos sanos. Pueden usarse células de otras fuentes. Se realiza una comparación

de las actividades biológicas de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM usando 500 unidades de polipéptidos o bien bG-CSF o bien G-CSF de la invención.

Se realizan ensayos con colonias con células de médula ósea de baja densidad no adherentes. Se someten células de médula ósea humana a un
5 gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (densidad, 1,077 g/cm³; Pharmacia). Entonces se resuspenden las células de baja densidad en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contiene suero bovino fetal y se colocan para determinar la adherencia en placas de cultivo tisular Falcon (n.º 3003, Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) durante 1 1/2 horas a 37°C.

10 El control del medio consiste en medio de Dulbecco modificado de Iscove más FCS al 10%, hemina 0,2 mM y 1 unidad de eritropoyetina recombinante. Para el ensayo de CFU-GM, se siembran en placa células diana a 1×10^5 en 1 ml de medio de cultivo de agar al 0,3% que incluye medio 5 A de McCoy complementado y suero bovino fetal al 10% inactivado
15 por calor. Los cultivos se puntúan según las colonias (mayores de 40 células por agregado) y se evalúa la morfología en el día 7 de cultivo. Se muestra el número de colonias como la media $\pm$ EEM, tal como se determina a partir de placas por cuadruplicado.

Para los ensayos con BFU-E y CFU-GEMM, se añaden las células
20 (1×10^5) a 1 ml de mezcla de medio de Dulbecco modificado de Iscove (Gibco), metilcelulosa al 0,8%, suero bovino fetal al 30%, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, hemina 0,2 mM y 1 unidad de eritropoyetina recombinante. Se incuban las placas en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% y O₂ al 5%. Se obtiene una baja tensión de oxígeno usando un dispositivo Oxireducer de
25 Reming Bio instruments (Syracuse, N.Y.). Se puntúan las colonias tras 14 días de incubación. Se determina el número de colonias como la media $\pm$ SEM, tal como se determina a partir de placas por duplicado.

Se espera que todas las colonias formadas en el ensayo con CFU-GM sean positivas para cloroacetato esterasa y negativas para esterasa no
30 específica (alfa-naftil-acetato esterasa), lo que concuerda con que las colonias sean de tipo granulocítico. Se espera que tanto G-CSF de tipo

natural como los polipéptidos bG-CSF de la invención tengan una actividad específica de una proteína pura de aproximadamente 1×10^8 U/mg, cuando se somete a ensayo mediante dilución en serie en un ensayo con CFU-GM. Es importante indicar que el bG-CSF de la invención puede ser extremadamente puro y estar libre de otros posibles factores de crecimiento de mamíferos en virtud de su producción en *E. coli*. Por tanto, bG-CSF puede ser capaz de soportar la formación mixta de colonias (CFU-GEMM) y BFU-E cuando se añade en presencia de eritropoyetina recombinante.

Medición de la semivida *in vivo* de bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo. Se usan ratas Sprague Dawley macho (de aproximadamente 7 semanas de edad). En el día de administración, se mide el peso de cada animal. Se inyectan 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. A 1 minuto, 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 24 horas tras la inyección, se extraen 500 µl de sangre de cada rata mientras se mantienen con anestesia de CO₂. Se almacenan las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 1,5 horas seguido por aislamiento de suero mediante centrifugación (4°C, 18000xg durante 5 minutos). Se almacenan las muestras de suero a -80°C hasta el día del análisis. Se cuantifica la cantidad de bG-CSF activo en las muestras de suero mediante el ensayo de actividad de bG-CSF *in vitro* tras descongelar las muestras en hielo.

Medición de la actividad biológica *in vivo* en ratas sanas de bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo. Se usa la medición de los efectos biológicos *in vivo* de bG-CSF en ratas Sprague Dawley SPF (libres de patógenos específicos) para evaluar la eficacia biológica de bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo. En el día de la llegada, las ratas se asignan aleatoriamente a grupos de 6. Se deja descansar a los animales durante un periodo de 7 días en el que se rechazan individuos en malas condiciones o con pesos extremos. El intervalo de peso de las ratas al comienzo del periodo de descanso es de 250-270 g.

En el día de administración, se mantienen las ratas en ayuno durante 16 horas seguido por la inyección subcutánea de 100 μg por kg de peso corporal de bG-CSF o una variante del mismo. Se inyecta cada muestra de bG-CSF en un grupo de 6 ratas aleatorizadas. Se extraen muestras de sangre de 300 μl 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 tras la dosificación. Se analizan las muestras de sangre para determinar los siguientes parámetros hematológicos: hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, hematocrito, volumen celular medio, concentración de hemoglobina celular media, hemoglobina celular media, recuento de glóbulos blancos, recuento diferencial de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos). Partiendo de la base de estas mediciones, se evalúa la eficacia biológica de bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo.

Medición de la actividad biológica *in vivo* en ratas con neutropenia inducida por quimioterapia de BG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo. Para este análisis se utilizan ratas Sprague Dawley SPF. En el día de la llegada, las ratas se asignan aleatoriamente a grupos de 6. Se deja descansar a los animales durante un periodo de 7 días en el que se rechazan individuos en malas condiciones o con pesos extremos. El intervalo de peso de las ratas al comienzo del periodo de descanso es de 250-270 g.

24 horas antes de la administración de las muestras de bG-CSF, se inyecta a las ratas por vía i.p. 50 mg por kg de peso corporal de ciclofosfamida (CPA) para inducir neutropenia que se asemeja a la neutropenia que resulta de la quimioterapia anticancerígena. 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. Se inyecta cada muestra de bG-CSF en un grupo de 6 ratas aleatorizadas. Se extraen muestras de sangre de 300 μl 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 tras la

dosificación. Se analizan las muestras de sangre para determinar los siguientes parámetros hematológicos: hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, hematocrito, volumen celular medio, concentración de hemoglobina celular media, hemoglobina celular media, recuento de glóbulos blancos, recuento diferencial de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos). Partiendo de la base de estas mediciones, se evalúa la eficacia biológica de bG-CSF conjugado y no conjugado y variantes del mismo.

Ejemplo 26

Estudio *in vivo* que evalúa el impacto de la variante bG-CSF-T133pAF 20K PEG sobre las respuestas hematológicas del ganado

Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una única sustitución de pAF en la posición T133 (bG-CSF T133pAF-20K PEG) en *E. coli*. Esta proteína tenía una metionina N terminal (SEQ ID NO: 2) y la treonina en la posición 134 de la SEQ ID NO: 2 se sustituyó por para-acetilfenilalanina. Se pegiló la proteína en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG de 20 KD y se purificó mediante cromatografía de líquidos de intercambio catiónico hasta una pureza >98%. 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 mM; pH 4,0.

Se adquirieron novillos cruzados ingleses comerciales o del resto de Europa que pesaban aproximadamente 150 kg y se transportaron a las instalaciones de investigación en las que se identificaron individualmente con etiquetas en las orejas y se aclimataron durante 7 días antes de su inclusión en el estudio. No se administraron antibióticos ni vacunas a los animales durante los periodos de adquisición o aclimatación. No se administraron medicamentos concomitantes a los animales durante el estudio. Se alojó a los animales en corrales con suelos ranurados de

hormigón y se expusieron a la temperatura ambiente. Se alimentó a los animales una vez al día a voluntad con una ración completa, en gránulos (Rumilab® 5508).

5 El estudio se realizó usando un diseño en bloques completos aleatorizados en el que los terneros se asignaban a bloques por corral. Se asignaron doce animales o bien a grupos tratados o a control negativo (tampón de formulación sin proteína) (6 animales/tratamiento). Se asignaron aleatoriamente los animales a los bloques y a los tratamientos dentro de los bloques.

10 En el día -1, un veterinario evaluó a los terneros para determinar signos clínicos de enfermedad. Las evaluaciones incluyeron la frecuencia de pulso, la frecuencia respiratoria y las temperaturas rectales, así como el estado global. Se determinaron los pesos corporales y las temperaturas rectales y se recogieron muestras de sangre anti-coagulada para las
15 evaluaciones hematológicas (muestra antes del tratamiento). Se seleccionaron los animales dentro del intervalo de peso especificado con perfiles hematológicos normales basándose en los intervalos de referencia de la bibliografía y sin signos clínicos de enfermedad para su inclusión en el estudio.

20 En el día 0, se trató a los terneros o bien con una única inyección subcutánea de bG-CSF T133pAF pegilado (40 µg/kg) o bien con tampón de formulación (1 ml/125 kg). Las inyecciones se administraron en la región preescapular del lado izquierdo del cuello.

25 Se recogieron muestras de sangre completa (~30 ml) en tubos estériles que contenían o bien EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para los recuentos absolutos de leucocitos o bien ACD (ácido – citrato - dextrosa) para la determinación de los recuentos absolutos de neutrófilos. Los recuentos absolutos de leucocitos se determinaron usando un analizador de sangre ACT10™ de Beckman Coulter. Los recuentos absolutos de
30 neutrófilos (RAN) se determinaron mediante la evaluación citométrica de flujo de los porcentajes de neutrófilos en muestras de sangre completa

teñidas con CD45 usando un bioanalizador FACSarray™ de Becton Dickinson. Los recuentos absolutos de neutrófilos se calcularon multiplicando el recuento absoluto de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos.

5 Además de las muestras antes del tratamiento recogidas en el día -1, se recogieron muestras a las 4, 8 y 12 horas en el día 0, 24, y 36 horas tras el tratamiento, y una vez al día en los días 3-14.

10 Los resultados de la administración de bG-CSF pegilado sobre el RAN se presentan en la figura 16. Los animales tratados con tampón de formulación solo mostraron valores de RAN relativamente constantes durante toda la duración del estudio. Por el contrario, los animales que recibieron bG-CSF pegilado mostraron un marcado aumento en el RAN en el plazo de 8 horas tras el tratamiento. Se observaron valores máximos de RAN (aproximadamente 10 veces por encima de los niveles antes del

15 tratamiento) a las 72 horas tras el tratamiento. Los recuentos absolutos de neutrófilos disminuyeron hasta aproximadamente de 4 a 5 veces por encima del nivel antes del tratamiento en el día 5 tras el tratamiento y permanecieron en este nivel hasta el día 10. Los valores disminuyeron adicionalmente hasta aproximadamente 3,5 veces por encima del nivel

20 antes del tratamiento desde el día 11 hasta el día 14.

 Estos resultados indican pegilación específica de sitio de bG-CSF en la posición T133, lo que permitió obtener una potente actividad hematopoyética que persistió durante al menos dos semanas en los terneros tratados con una única inyección de proteína.

25

Ejemplo 27

Variante pegilada de bG-CSF T-133

Resumen del estudio hematológico

30 Se realizó un estudio *in vivo* para evaluar el impacto de la variante bG-CSF-T133pAF 20K PEG sobre las respuestas hematológicas del ganado.

Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una única sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. Se pegiló la proteína en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG de 20 KD y se purificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular hasta una pureza >98%. 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 0,555 mM; pH 4,0.

Se adquirieron novillos cruzados ingleses comerciales o del resto de Europa que pesaban aproximadamente 150 kg y se transportaron a las instalaciones de investigación en las que se identificaron individualmente con etiquetas en las orejas y se aclimataron durante 7 días antes de su inclusión en el estudio. No se administraron antibióticos ni vacunas a los animales durante los periodos de adquisición o aclimatación. No se administraron medicamentos concomitantes a los animales durante el estudio. Se alojó a los animales en corrales con suelos ranurados de hormigón y se expusieron a la temperatura ambiente. Se alimentó a los animales una vez al día a voluntad con una ración completa, en gránulos (Rumilab® 5508).

El estudio se realizó usando un diseño en bloques completos aleatorizados en el que los terneros se asignaban a bloques por corral. Se asignaron doce animales o bien a grupos tratados o a control negativo (tampón de formulación sin proteína) (6 animales/tratamiento). Se asignaron aleatoriamente los animales a los bloques y a los tratamientos dentro de los bloques.

En el día -1, un veterinario evaluó a los terneros para determinar signos clínicos de enfermedad. Las evaluaciones incluyeron la frecuencia de pulso, la frecuencia respiratoria y las temperaturas rectales, así como el estado global. Se determinaron los pesos corporales y las temperaturas rectales y se recogieron muestras de sangre anti-coagulada para las evaluaciones hematológicas (muestra antes del tratamiento). Se seleccionaron los animales dentro del intervalo de peso especificado con

perfiles hematológicos normales basándose en los intervalos de referencia de la bibliografía y sin signos clínicos de enfermedad para su inclusión en el estudio.

5 En el día 0, se trató a los terneros o bien con una única inyección subcutánea de bG-CSF pegilado (40 μ g/kg) o bien con tampón de formulación (1 ml/125 kg). Las inyecciones se administraron en la región preescapular del lado izquierdo del cuello.

10 Se recogieron muestras de sangre completa venosa (~30 ml) en tubos estériles que contenían o bien EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para los recuentos absolutos de leucocitos o bien ACD (ácido - citrato - dextrosa) para la determinación de los recuentos absolutos de neutrófilos. Los recuentos absolutos de leucocitos se determinaron usando un analizador de sangre ACT10™ de Beckman Coulter. Los recuentos absolutos de neutrófilos (RAN) se determinaron mediante la evaluación
15 citométrica de flujo de los porcentajes de neutrófilos en muestras de sangre completa teñidas con CD45 usando un bioanalizador FACSarray™ de Becton Dickinson. Los recuentos absolutos de neutrófilos se calcularon multiplicando el recuento absoluto de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos.

20 Además de las muestras antes del tratamiento recogidas en el día -1, se recogieron muestras a las 4, 8 y 12 horas en el día 0, 24, y 36 horas tras el tratamiento, y una vez al día en los días 3-14.

Los resultados de la administración de bG-CSF pegilado sobre el RAN se presentan en la figura 16. Los animales tratados con tampón de
25 formulación solo mostraron valores de RAN relativamente constantes durante toda la duración del estudio. Por el contrario, los animales que recibieron bG-CSF pegilado mostraron un marcado aumento en el RAN en el plazo de 8 horas tras el tratamiento. Se observaron valores máximos de RAN (aproximadamente 10 veces por encima de los niveles antes del
30 tratamiento) a las 72 horas tras el tratamiento. Los recuentos absolutos de neutrófilos disminuyeron hasta aproximadamente de 4 a 5 veces por encima

del nivel antes del tratamiento en el día 5 tras el tratamiento y permanecieron en este nivel hasta el día 10. Los valores disminuyeron adicionalmente hasta aproximadamente 3,5 veces por encima del nivel antes del tratamiento desde el día 11 hasta el día 14 (ver figura 17).

5 Estos resultados indican pegilación específica de sitio de bG-CSF en la posición T133, lo que permitió obtener una potente actividad hematopoyética que persistió durante al menos dos semanas en los terneros tratados con una única inyección de proteína.

10 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos y que a los expertos habituales en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios en vista de los mismos y que van a incluirse dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y/u otros documentos citados
15 en esta solicitud se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines en el mismo grado que si se indicase individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente y/u otro documento individual se incorpora como referencia para todos los fines.

20 Ejemplo 28

Variante pegilada bG-CSF T-133

Resumen del estudio de eficacia en mastitis

25 Se evaluó la eficacia metafiláctica de la variante bG-CSF-T133pAF 20K PEG frente a infecciones intramamarias que se producen de manera natural asociadas con patógenos de mastitis clave usando un modelo de infección de mastitis inducida.

30 Se produjo bG-CSF recombinante que contenía una única sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. Se pegiló la proteína en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG de 20 KD y se purificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular. La formulación final contenía bG-CSF pegilado en tampón de

formulación compuesto por NaAc 10 mM; sorbitol al 5% y Tween 20 al 0,0033% a pH 4,0.

5 Se seleccionaron vacas periparturientas Holstein-Friesian multíparas que pesaban 600-800 kg de rebaños de producción comercial. No se administró ningún tratamiento antibacteriano a las vacas en el plazo de 30 días antes de su inclusión en el estudio. Se alimentaron los animales con una ración para vacas seca apropiada antes del parto y una ración para vacas de transición comenzando el día del parto y continuando durante la duración del estudio. Se dejó a los animales acceso a voluntad a agua fresca. Se siguieron procedimientos de producción láctea de rutina y se ordeñaron las vacas dos veces al día.

10 Se incluyeron vacas sanas en el estudio aproximadamente siete días antes de su fecha de parto anticipada basándose en los registros de reproducción y una evaluación de su preparación para parir por el vaquero. Se asignaron las vacas a grupos de tratamiento usando un diseño completamente aleatorizado. Cada grupo de tratamiento contenía aproximadamente cincuenta vacas.

15 Se trataron las vacas con o bien solución salina estéril (control negativo), inyecciones diarias (día -7 a día 6) de bG-CSF-T133pAF no pegilado o bien diversas dosis de variante bG-CSF-T133pAF 20K en el día de inclusión y el día de parto. Se administraron los tratamientos mediante inyección subcutánea en la región preescapular del cuello.

20 Un individuo ciego a los grupos de tratamiento observó los animales para determinar signos clínicos de mastitis en cada ordeño en los días 0-28. Las observaciones específicas incluían la asignación de una puntuación clínica basándose en el aspecto de la leche y el estado de la glándula mamaria. Si se observaba cualquier anomalía, se realizó una prueba de mastitis de California en el/los cuarto(s) afectado(s) y se registró la temperatura rectal del animal. Se hizo la autopsia de cualquier animal que muriese durante el transcurso del estudio para determinar la causa de la muerte si era posible.

Se registró la producción de leche en cada ordeño en los días 0-28, y se recogieron muestras de leche compuestas de cuartos sanos en los días 3, 5, 7 y 10 para análisis de composición de la leche incluyendo: recuentos de células somáticas, grasa láctea, proteína láctea, lactosa y sólidos. También se recogieron muestras de leche adicionales de cuartos que presentaban anomalías clínicas para la identificación de patógenos bacterianos.

Se recogieron los porcentajes de nacimientos vivos y las tasas de concepción al primer servicio tras la recria mediante inseminación artificial para todas las vacas incluidas en el estudio para evaluar el impacto de los tratamientos sobre la salud reproductora. Se registraron también observaciones diarias de la salud para todos los terneros durante sus primeros 30 días de vida y se documentó cualquier anomalía para evaluar el impacto de los tratamientos sobre la salud de los terneros.

Se evaluó la eficacia comparando las tasas de morbilidad entre los grupos de tratamiento tanto para las vacas como para los cuartos individuales. Los criterios de valoración secundarios incluían la evaluación del impacto de los tratamientos sobre la incidencia de mortalidades, producción de leche, composición de la leche y tasas de concepción al primer servicio.

El impacto de los diversos tratamientos sobre la incidencia de mastitis clínica y mortalidades se resume en la tabla 10.

TABLA 10		
Descripción del Tratamiento	Morbilidad	Mortalidad
Galina Estéril (SIDx2, Día -7 y Día 0)	26/50 (52%)	4
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, SIDx14, Día -7 - Día 6)	18/49 (33%)	6
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	6/53 (11%)	2
bG-CSF T133-pAF 20K FEG (20 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	7/52 (13%)	3

La administración de dosis diarias de bG-CSF T-133 pAF no pegilado redujo significativamente la incidencia de nuevas infecciones clínicas por mastitis con respecto a los controles de solución salina. La administración de cualquier dosis de bG-CSF T133-pAF 20K PEG redujo significativamente la incidencia de nuevas infecciones clínicas por mastitis en relación con o bien los controles de solución salina o bien las inyecciones diarias de bG-CSF T133-pAF no pegilado. La administración de cualquier dosis de bG-CSF T133-pAF 20K PEG proporcionó una pequeña reducción numérica en el número de mortalidades en relación con los controles de solución salina.

El impacto de los tratamientos sobre la producción de leche diaria por vacas sanas se resume en la figura 18. Los niveles de producción de leche fueron similares para vacas tratadas con o bien solución salina estéril, bG-CSF T133-pAF no pegilado y la dosis inferior de bG-CSF T133-pAF 20K PEG. Estos animales presentaban aumentos en la producción de leche a lo largo de la duración del estudio típicos de los observados normalmente durante el primer mes de lactancia. Los animales tratados con la dosis superior de bG-CSF T133-pAF 20K PEG presentaban una producción de leche diaria significativamente reducida en relación con los otros tratamientos durante toda la duración del estudio.

El impacto de los tratamientos sobre los recuentos de células somáticas se resume en la figura 19. Animales tratados con o bien bG-CSF T133-pAF no pegilado o bien bG-CSF T133 pAF 20K PEG presentaban recuentos de células somáticas que eran o bien similares a o bien inferiores a los observados en los controles de solución salina en los días 3, 5 y 7 tras el parto. En el día 10 tras el parto, los recuentos de células somáticas para animales tratados con bG-CSF T133-pAF no pegilado o bG-CSF T133 pAF 20K PEG eran significativamente inferiores que los de los controles de solución salina, lo que sugiere que estos tratamientos probablemente estaban reduciendo la incidencia de mastitis no clínica además de mastitis clínica.

Los resultados de los análisis microbiológicos indicaron que las vacas mórvidas presentaban una variedad 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 20K PEG era eficaz para reducir la enfermedad frente a especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El impacto de los tratamientos sobre los nacimientos vivos y las tasas de concepción al primer servicio se resumen en la tabla 11. No hubo ninguna diferencia significativa en los porcentajes de nacimientos vivos entre tratamientos, lo que sugiere que los tratamientos experimentales no tenían ningún impacto sobre la viabilidad de los terneros en el útero. Hubo una mejora numérica en las tasas de concepción al primer servicio entre animales tratados con o bien bG-CSF T133-pAF no pegilado o bien bG-CSF T133 pAF 20K PEG y los controles de solución salina. Estos resultados sugieren que los tratamientos experimentales no tenían ningún impacto negativo sobre la salud reproductora.

TABLA 11		
Descripción del Tratamiento	Nacimientos % Vivos	Tasa de Concepción al Primer Servicio
Salina Estéril (SIDx2 Día -7 y Día 0)	94%	25.6%
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, SIDx14, Día -7 - Día 6)	98%	41.2%
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	92%	34.2%
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	93%	34.2%

El impacto de la exposición en el útero a los tratamientos sobre la salud de terneros nacidos de animales incluidos 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 20K PEG redujeron significativamente el número de mortalidades en relación con los controles de solución salina. Estos resultados sugieren que los tratamientos experimentales tenían un impacto positivo sobre la gravedad de la enfermedad.

5

TABLA 12			
Descripción del Tratamiento	Incidencia de Enfermedad Entréica	Incidencia de Enfermedades Respiratorias	Mortalidades
Salina Estéril (SIDx2 Día - 7 y Día 0)	28	1	6
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, SIDx14, Día -7 - Día 6)	32	1	1
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	30	2	0
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 µg/kg, SIDx2, Día -7 & Día 0)	34	2	1

10

Ejemplo 29

15

Variante pegilada bG-CSF T-133

Enfermedad respiratoria

Resumen del estudio de eficacia

Se evalúa la eficacia metafiláctica de diversas dosis de variante bG-CSF-T133 pAF 20K PEG frente a enfermedad respiratoria bovina que se produce de manera natural en condiciones de corral de engorde comercial.

20

Se produce bG-CSF recombinante que contiene una única sustitución de pAF en la posición T133 en *E. coli*. Se pegila la proteína en el sitio de incorporación de pAF usando oxiamino-PEG de 20 KD y se purifica mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular. La formulación final contiene bG-CSF pegilado en tampón de formulación compuesto por NaAc 10 mM; sorbitol al 5% y Tween 20 al 0,0033% a pH 4,0.

25

Se adquirieron novillos cruzados ingleses comerciales o del resto de Europa que pesaban aproximadamente 500 libras y típicos de terneros de engorde comerciales en uno o más establos en el sureste de los Estados

30

Unidos. Tras la llegada al sitio de reunión, se identifican los animales individualmente y un veterinario los examina para detectar anomalías clínicas. Se registran también las temperaturas rectales y los animales que están libres de signos clínicos de enfermedad y tienen temperaturas rectales $\leq 104^{\circ}\text{F}$ se seleccionan para su inclusión en el estudio. Se obtienen muestras de sangre para recuentos de glóbulos blancos diferenciales y totales antes del tratamiento.

Se asignan aleatoriamente los terneros a grupos de tratamiento tal como se explica resumidamente en la tabla 13.

10

TABLA 13		
Tratamiento	Régimen de Dosis	# de Animales
1) Salina Estéril	SIDY1	40
2) bG-CSF-T133 20K PEG (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	SIDY1	40
3) bG-CSF-T133 20K PEG (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	SIDY1	40
4) bG-CSF-T133 20K PEG (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	SIDY1	40

15

20

Se administra solución salina estéril o bG-CSF-T133 pAF 20K PEG mediante inyección subcutánea en la región preescapular del cuello.

La siguiente mañana, se cargan los terneros en camiones y se envían a aproximadamente 1400 millas a un corral de engorde comercial en el norte de Colorado. Tras la llegada, se descargan los terneros en corrales de llegada y se les proporciona acceso a alimento y agua. En el plazo de cuatro horas tras la llegada, se trasladan los animales a una zona de procesamiento en la que se pesan y se asignan los primeros diez terneros a cada grupo de tratamiento y se les extrae sangre para obtener muestras para recuentos de glóbulos blancos diferenciales y totales. Estos recuentos

25

30

se usan para confirmar que los animales están respondiendo al tratamiento tal como se demuestra mediante un aumento en los números de neutrófilos absolutos. Se distribuyen aleatoriamente los terneros en corrales de estudio que contienen cinco animales de cada grupo de tratamiento para un total de 20 animales por corral.

Un veterinario ciego a las asignaciones de tratamiento observa los terneros diariamente durante 14 días tras su llegada para detectar signos clínicos de enfermedad. Cada animal recibe una puntuación de enfermedad que oscila desde 0 (sano) hasta 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 $\geq 104^{\circ}\text{F}$ 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 durante el transcurso del estudio y se hace una autopsia del animal para determinar la causa de la muerte.

El criterio de valoración primario para determinar la eficacia son las tasas de morbilidad relativas entre grupos de tratamiento. Los criterios de valoración secundarios de eficacia incluyen las tasas de mortalidad, los aumentos de peso diarios medios y las puntuaciones de enfermedad diarias medias para cada grupo de tratamiento.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos y que a los expertos habituales en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios en vista de los mismos y que van a incluirse dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y/u otros documentos citados en esta solicitud se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines en el mismo grado que si se indicase individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente y/u otro documento individual se incorpora como referencia para todos los fines.

TABLA 14: Secuencias citadas.

SEQ ID #	TIPO y NOMBRE DE SECUENCIA	SECUENCIA
1	Secuencia de Aminoácidos de G-CSF bovino	TPLGPARSFLPQSFLLKCLEQVRKIQAAGAE LQ ERLCAAHKLCHPPEELMLLRHSLGIPQAPLSSC SSQSLQLTSCLNQLHGGLFLYQGLLQALAGIS PELAFTLDTLQLDVTFATHIWLQMEDLGAAAP AVQFTQGA MPTFTSAFQPRAGGVLVASQLHR FLELAYRGLRYLAEP
2	Secuencia de Aminoácidos de G-CSF bovino con metionina en N terminal	MTPLGPARSFLPQSFLLKCLEQVRKIQAAGAE L QERLCAAHKLCHPPEELMLLRHSLGIPQAPLSS CSSQSLQLTSCLNQLHGGLFLYQGLLQALAGI SPELAFTLDTLQLDVTFATHIWLQMEDLGAA PAVQFTQGA MPTFTSAFQPRAGGVLVASQLH RFLELAYRGLRYLAEP
3	Secuencia de nucleótidos de G-CSF bovino	actccattaggctcctgcacgtagcctgcctccaaagtcttctgctgaatgcctggagcctgctcgcgcaaa attccagctgctggtgcgggaactgcaggagcgtctgtgtgcgcgcacataaactgtgcgcgcgcgggaag naactgctgctgctgcgcgcctcctgggaatccacacaggctcctctgtctcctggtgtgctctcaagctct gcaggctgacttcattgcctgaatcaactgcacaggagcctgttctctatcagggtctgtctgcagzgcg tggcggggtatctcccgaggctgcacacgacactggacacccctgcacctggatgtanaggactttgc tactaacatctggctgcagatggagctctgggagcggcccccagagtgcaacctacacaggcgcgc taigccgaccttcacgtcggcggttcagcgctgcgcgggtggcggtctgtgtgcgaagcactgcctc gttctctggagctggcggtacccgggtctacgtatctggtgcacccctaa
4	Secuencia de Nucleótidos de G-CSF bovino con metionina en N terminal	atgactccattaggctcctgcacgtagcctgcctccaaagtcttctgctgaatgcctggagcctcgcg aaaattccagctgctggtgcgggaactgcaggagcgtctgtgtgcgcgcacataaactgtgcgcgcgcgg nagaaatgctgctgctgcgcgcctcctgggaatccacacaggctcctctgtctcctggtgtgctctcaaa gtctgcagctgacttcattgcctgaatcaactgcacggagcctgttctctatcagggtctgtctgcagg cgctggcggggtatctcccgaggctgcacacgacactggacacccctgcacctggatgtanaggacttt tgcctactacatctggctgcagatggagctctgggagcggcccccagagtgcaacctacacaggcgcgc cgctatgcgcgcacacacgtcggcggttcagcgctgcgcgggtggcggtctgtgtgcgaagcactgc atggttctctgagctggcggtacccgggtctcctggtatctggtgcacccctaa

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido bG-CSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural.
- 5 2. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF una o más modificaciones postraduccionales.
3. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, estando el polipéptido unido a un ligador, polímero o molécula biológicamente activa.
- 10 4. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 3, estando el polipéptido unido a un polímero soluble en agua.
5. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, estando el polipéptido unido a un polímero bifuncional, ligador bifuncional o al menos un polipéptido bG-CSF adicional.
- 15 6. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 5, en el que el polímero o ligador bifuncional está unido a un segundo polipéptido.
7. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 6, siendo el segundo polipéptido un polipéptido bG-CSF.
8. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
- 20 9. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que dicho polímero soluble en agua se une a un aminoácido no codificado de manera natural presente en dicho polipéptido b-GCSF.
- 25 10. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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,
- 30

- 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- 5
- 10
11. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos: 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de los mismos de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2.
- 15
12. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos: 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- 20
13. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- 25
14. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la posición 62 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).
- 30
15. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la

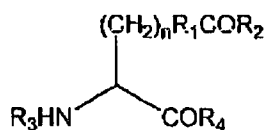
posición 133 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).

- 5 16. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 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, 10 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, 15 145, 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 terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- 20 17. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 16, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 11, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de los mismos de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2.
- 25 18. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 16, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 33, 43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
- 30

19. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 16, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
20. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 16, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la posición 62 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).
21. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la posición 133 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).
22. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos que modula la afinidad del polipéptido bG-CSF por un receptor de bG-CSF.
23. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos que aumenta la estabilidad o solubilidad del polipéptido bG-CSF.
24. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos que aumenta la expresión del polipéptido bG-CSF en una célula huésped recombinante o sintetizado *in vitro*.
25. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos que aumenta la resistencia a proteasas del polipéptido bG-CSF.
26. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de manera natural es reactivo frente a un ligador, polímero o molécula biológicamente activa que por lo demás no es

reactivo frente a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes en el polipéptido.

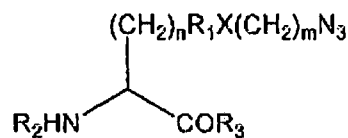
27. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.
28. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo.
29. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 28, en el que el aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal.

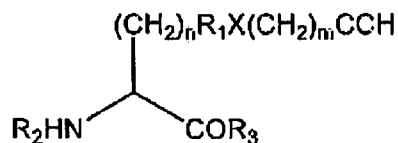
30. Polipéptido bG-CSFa según la reivindicación 27, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo aminooxilo.
31. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo hidrazida.
32. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo hidrazina.

33. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el residuo de aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo semicarbazida.
34. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el residuo de aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo azida.
35. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 34, en el que el aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:



en la que n es 0-10; R₁ 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; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo amino terminal, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal.

36. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo alquino.
37. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 36, en el que el aminoácido no codificado de manera natural tiene la estructura:



en la que n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo

amino terminal, y R_3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación de extremo carboxilo terminal.

- 5 38. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
39. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 38, en el que el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.
- 10 40. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, que se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con un polímero soluble en agua que comprende un grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida.
41. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 40, en el que el grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida se une al polímero soluble en agua a través de un enlace amida.
- 15 42. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, que se prepara haciendo reaccionar un polímero soluble en agua que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de manera natural que comprende un grupo aminooxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida o un grupo semicarbazida.
- 20 43. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, que se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene alquino con un polímero soluble en agua que comprende un resto azida.
- 25 44. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, que se prepara haciendo reaccionar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido que contiene azida con un polímero soluble en agua que comprende un resto alquino.
- 30 45. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 27, en el que el grupo azida o alquino se une a un polímero soluble en agua a través de un enlace amida.

46. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el polímero soluble en agua es un polímero ramificado o de múltiples brazos.
47. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 46, en el que cada ramificación del polímero soluble en agua tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
- 5 48. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un antagonista de bG-CSF.
49. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 48, en el que el polipéptido comprende una o más modificación postraducciona, ligador, polímero o molécula biológicamente activa.
- 10 50. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 49, en el que el polímero comprende un resto seleccionado de un grupo que consiste en un polímero soluble en agua y poli(etilenglicol).
51. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 48, en el que el polipéptido impide la activación del receptor de bG-CSF.
- 15 52. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un resto de sacárido.
53. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 3, en el que el ligador, polímero o molécula biológicamente activa se une al polipéptido por medio de un resto de sacárido.
- 20 54. Ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con SEQ ID NO: 3 ó 4 o una secuencia de polinucleótido que codifica para SEQ ID NO: 1 ó 2, en el que el polinucleótido comprende al menos un codón selector.
- 25 55. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 54, en el que el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón raro y un codón de cuatro bases.
56. Método de preparación del polipéptido bG-CSF según la reivindicación 3, comprendiendo el método poner en contacto un polipéptido bG-CSF aislado que comprende un aminoácido no codificado de manera natural
- 30

con un ligador, polímero o molécula biológicamente activa que comprende un resto que reacciona con el aminoácido no codificado de manera natural.

5 57. Método según la reivindicación 56, en el que el polímero comprende un resto seleccionado de un grupo que consiste en un polímero soluble en agua y poli(etilenglicol).

10 58. Método según la reivindicación 56, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

15 59. Método según la reivindicación 56, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un resto carbonilo y el ligador, polímero o molécula biológicamente activa comprende un resto aminooxilo, un resto hidrazina, un resto hidrazida o un resto semicarbazida.

60. Método según la reivindicación 59, en el que el resto aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida se une al ligador, polímero o molécula biológicamente activa a través de un enlace amida.

20 61. Método según la reivindicación 56, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un resto alquino y el ligador, polímero o molécula biológicamente activa comprende un resto azida.

25 62. Método según la reivindicación 56, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un resto azida y el ligador, polímero o molécula biológicamente activa comprende un resto alquino.

63. Método según la reivindicación 58, en el que el resto azida o alquino se une a un ligador, polímero o molécula biológicamente activa a través de un enlace amida.

30 64. Método según la reivindicación 57, en el que el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.

65. Método según la reivindicación 57, en el que el resto de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado o de múltiples brazos.
66. Composición que comprende el polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 67. Composición según la reivindicación 66, en el que el aminoácido no codificado de manera natural se une a un polímero soluble en agua.
68. Método de tratamiento de un animal que tiene un trastorno modulado por bG-CSF que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición según la reivindicación 66.
- 10 69. Célula que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 54.
70. Célula según la reivindicación 69, comprendiendo la célula una ARNt sintetasa ortogonal o un ARNt ortogonal.
71. Método de preparación de un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural, comprendiendo el
15 método cultivar células que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican para un polipéptido bG-CSF que comprende un codón selector, una ARN sintetasa ortogonal y un ARNt ortogonal en condiciones para permitir la expresión del polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado de manera natural; y
20 purificar el polipéptido bG-CSF.
72. Método de modulación de la semivida en suero o del tiempo en circulación de un polipéptido bG-CSF, comprendiendo el método sustituir uno cualquiera o más aminoácidos que se producen de manera natural por uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en el polipéptido bG-CSF.
- 25 73. Polipéptido bG-CSF codificado por un polinucleótido que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 ó 4 o que codifica para un polipéptido mostrado como SEQ ID NO: 1 ó 2, en el que dicho polinucleótido comprende un codón selector, y en el que dicho polipéptido comprende al menos un aminoácido no codificado de
30 manera natural.

74. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 73, en el que el aminoácido no codificado de manera natural se une a un ligador, polímero, polímero soluble en agua o molécula biológicamente activa.
- 5 75. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 74, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
76. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 73, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
10 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,
15 103, 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,
20 173, 174, 175 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína), y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).
77. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 76, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 11,
25 33, 43, 58, 62, 67, 69, 98, 99, 123, 124, 125, 133, 134, 136, 141, 159, 166, 169, 170, 173, y cualquier combinación de los mismos de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2.
78. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 76, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 33,
30

43, 58, 62, 67, 69, 99, 123, 124, 133, 134, 141, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).

5 79. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 76, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos 3, 7, 62, 133, 166, y cualquier combinación de los mismos (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2).

10 80. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 76, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la posición 62 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).

15 81. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 73, en el que el aminoácido no codificado de manera natural está sustituido en la posición 133 (SEQ ID NO: 1 o el aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 2).

20 82. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 73, en el que el aminoácido no codificado de manera natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

83. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 75, en el que el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.

25 84. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 75, en el que el resto de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado o de múltiples brazos.

85. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 84, en el que el resto de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa.

30 86. Composición que comprende el polipéptido bG-CSF según la reivindicación 73 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

87. Polipéptido bG-CSF que comprende sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos que aumenta la expresión del polipéptido bG-CSF en una célula huésped recombinante.
- 5 88. Polipéptido bG-CSF que comprende un polímero soluble en agua unido mediante un enlace covalente al polipéptido bG-CSF en un único aminoácido.
89. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 88, en el que el polímero soluble en agua comprende un resto de poli(etilenglicol).
- 10 90. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 88, en el que el aminoácido de forma covalente unido al polímero soluble en agua es un aminoácido no codificado de manera natural.
91. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 10, en el que dicho aminoácido no codificado de manera natural se une a una molécula de poli(etilenglicol).
- 15 92. Polipéptido bG-CSF que comprende al menos un ligador, polímero o molécula biológicamente activa, en el que dicho ligador, polímero o molécula biológicamente activa se une al polipéptido a través de un grupo funcional de un aminoácido no codificado de manera natural incorporado de manera ribosómica en el polipéptido.
- 20 93. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 92, en el que dicho polipéptido bG-CSF está monopegilado.
94. Polipéptido bG-CSF que comprende un ligador, polímero o molécula biológicamente activa que se une a uno o más aminoácidos no codificados de manera natural en el que dicho aminoácido no
- 25 codificado de manera natural se incorpora de manera ribosómica en el polipéptido en sitios preseleccionados.
95. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 94, comprendiendo el polipéptido bG-CSF uno de dicho ligador, polímero o molécula biológicamente activa.
- 30 96. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o delección de uno o más

aminoácidos que modula la hematopoyesis en un animal tras la administración del polipéptido.

- 5 97. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o deleción de uno o más aminoácidos que modula la semivida en suero o el tiempo en circulación del polipéptido bG-CSF.
- 10 98. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o deleción de uno o más aminoácidos que modula la proliferación de los neutrófilos en un animal tras la administración del polipéptido.
99. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1 ó 4, en el que el polipéptido comprende también una sustitución de aminoácido codificado de manera natural.
- 15 100. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o deleción de uno o más aminoácidos que modula la maduración de los neutrófilos en un animal tras la administración del polipéptido.
- 20 101. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 1, comprendiendo el polipéptido bG-CSF sustitución, adición o deleción de uno o más aminoácidos que modula la función de los neutrófilos en un animal tras la administración del polipéptido.
102. Método de tratamiento de un animal con una infección modulada por bG-CSF que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición según la reivindicación 66.
- 25 103. Polipéptido bG-CSF según la reivindicación 4, en el que el polímero soluble en agua se une a dicho polipéptido mediante un enlace oxima.
104. Método de prevención de una infección en un animal que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición según la reivindicación 66.
- 30

Fig 1

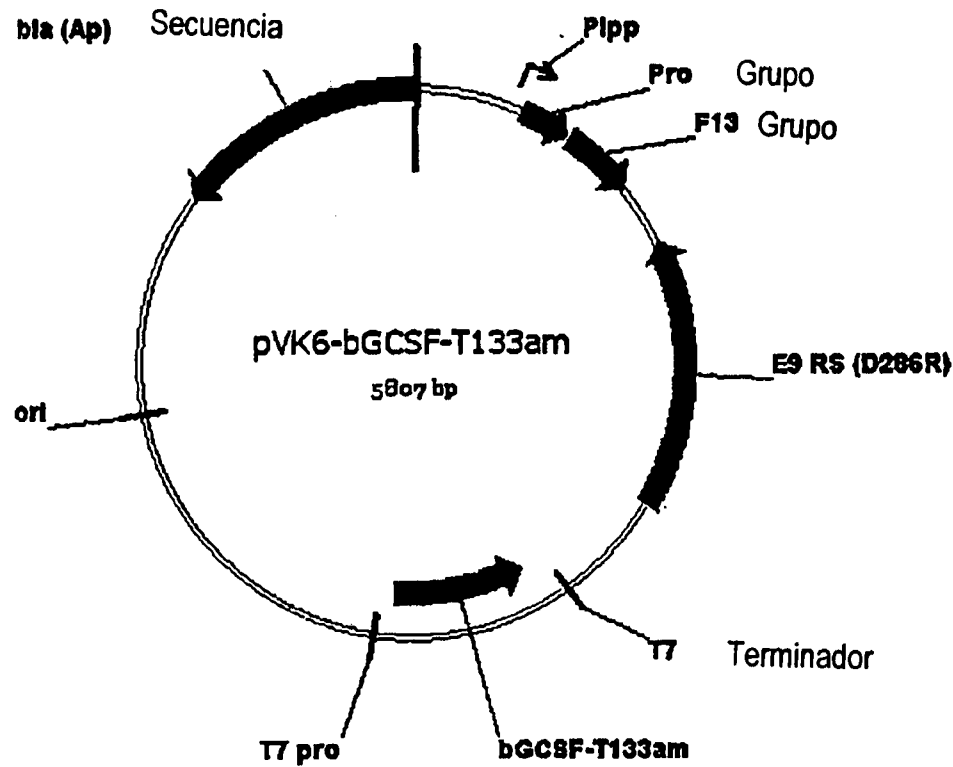


Fig 2

CEPA: E. COLI DERIVADO DE LA CEPA E. COLI K12-W3110

GENOTIPO: F-I-*rph*-1 INV (*rrnD*-*rrnE*) *araB*::*g1 tetA*

Genotipo	Explicación
F	Huesped carece de epitoma F'
λ -	No lisogénico-fago no se integra al cromosoma
<i>rph</i> -1	Defase en <i>rph</i> (ribo nucleasa PH) que afecta los niveles de expresión de <i>pyre</i> (orotato fosforribosiltransferasa)
INV (<i>rrnE</i> - <i>rrnD</i>)	La porción de cromosoma ((785 kb) entre los genes <i>rrnE</i> y <i>rrnD</i> está inadvertida
<i>araB</i> :: <i>g1 tetA</i>	Gen <i>g1</i> de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 bajo el control del promotor <i>araB</i> . El marcador de inserción es (<i>tetA</i> (resistencia tetracicliba)

Fig 3

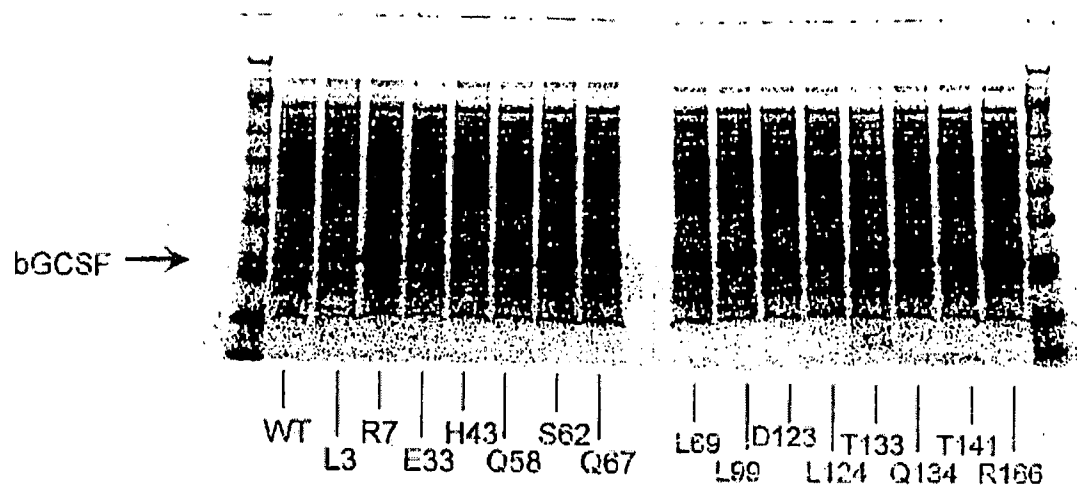


Fig 4

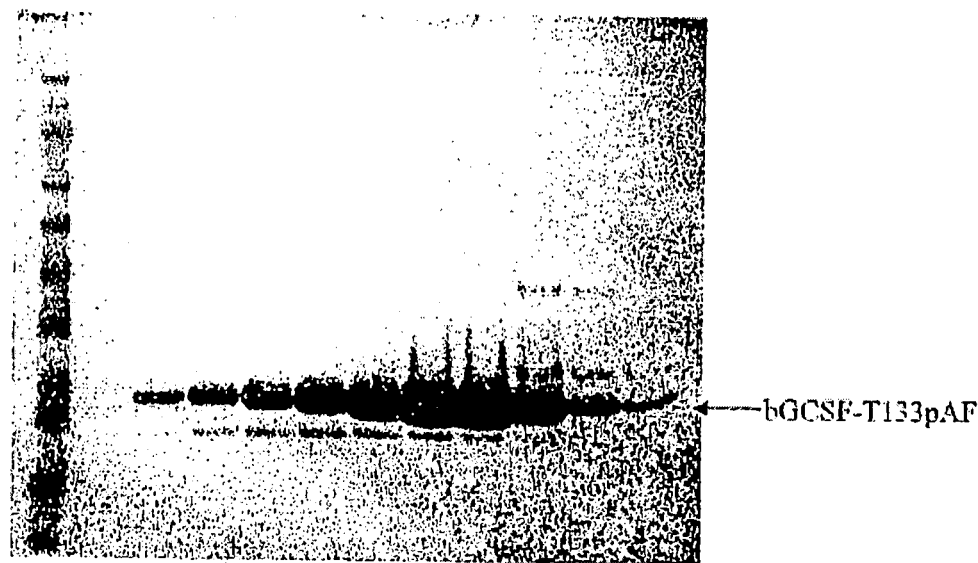


Fig 5

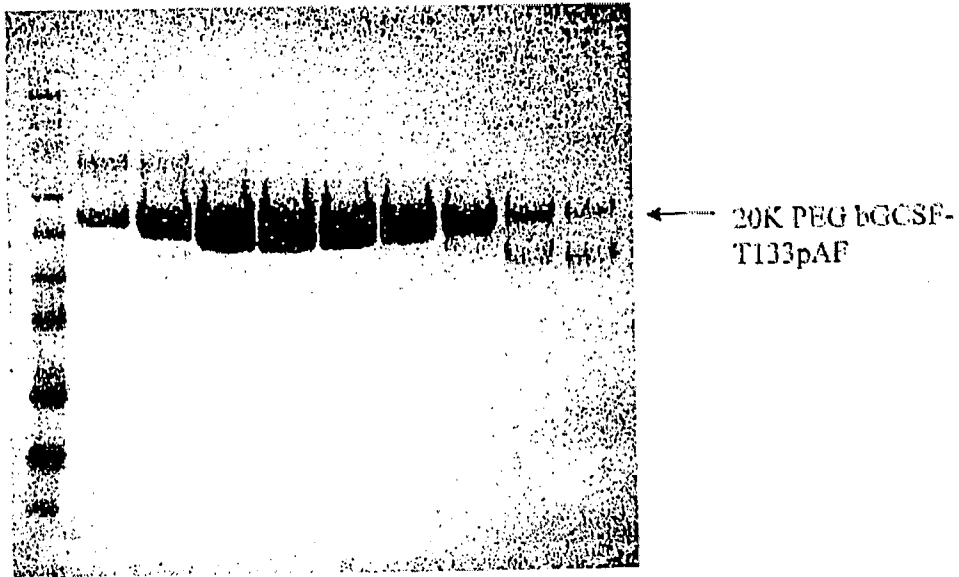


Fig 6

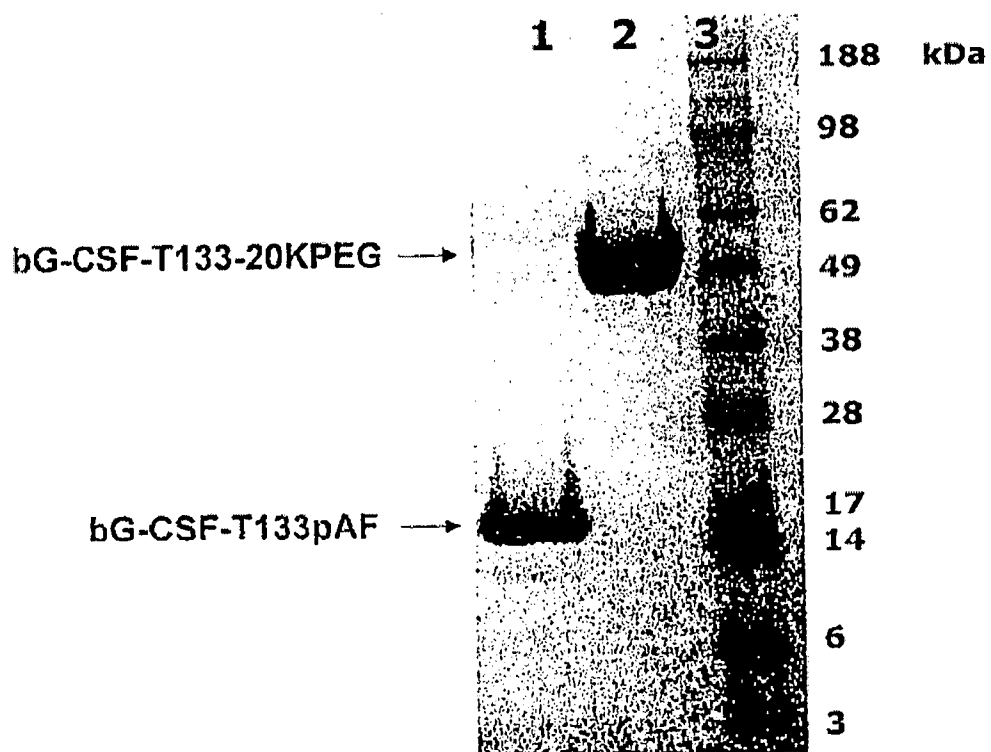
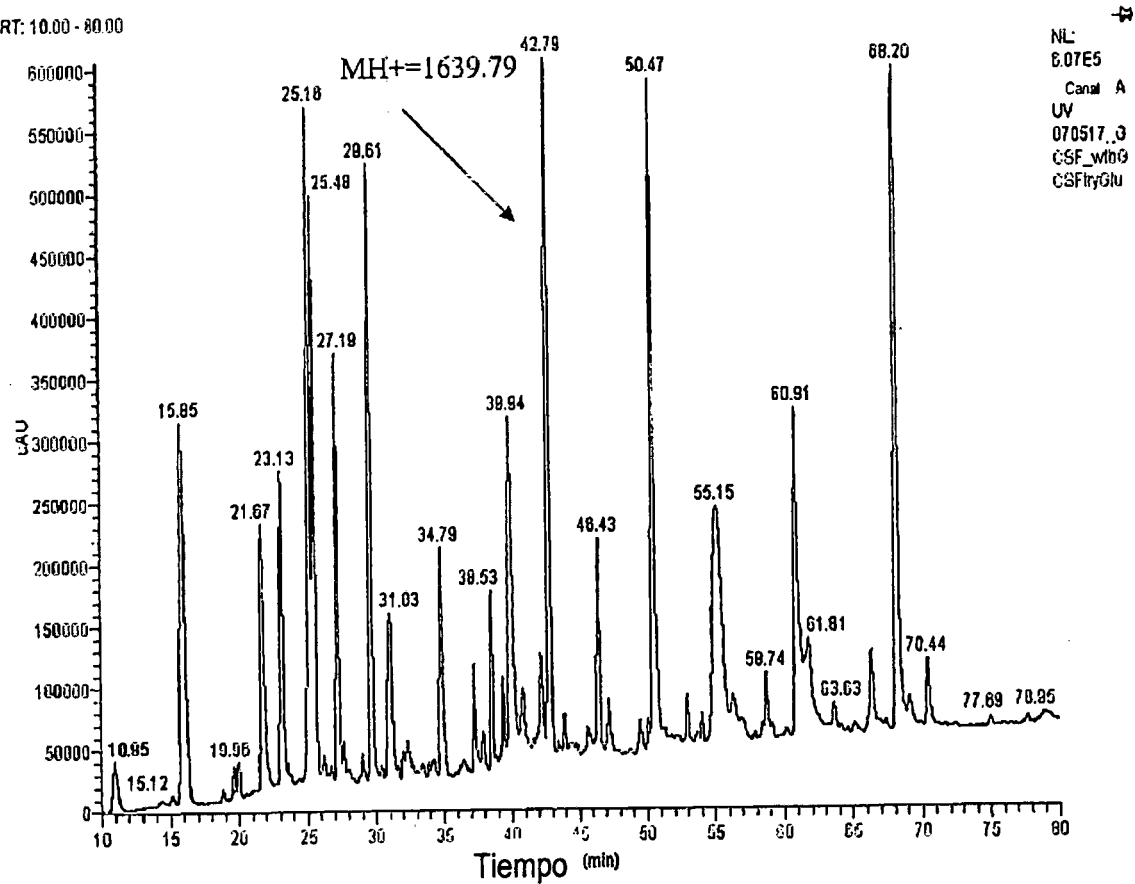


Fig 7a

Péptido que contiene
T133



416

Fig 7b

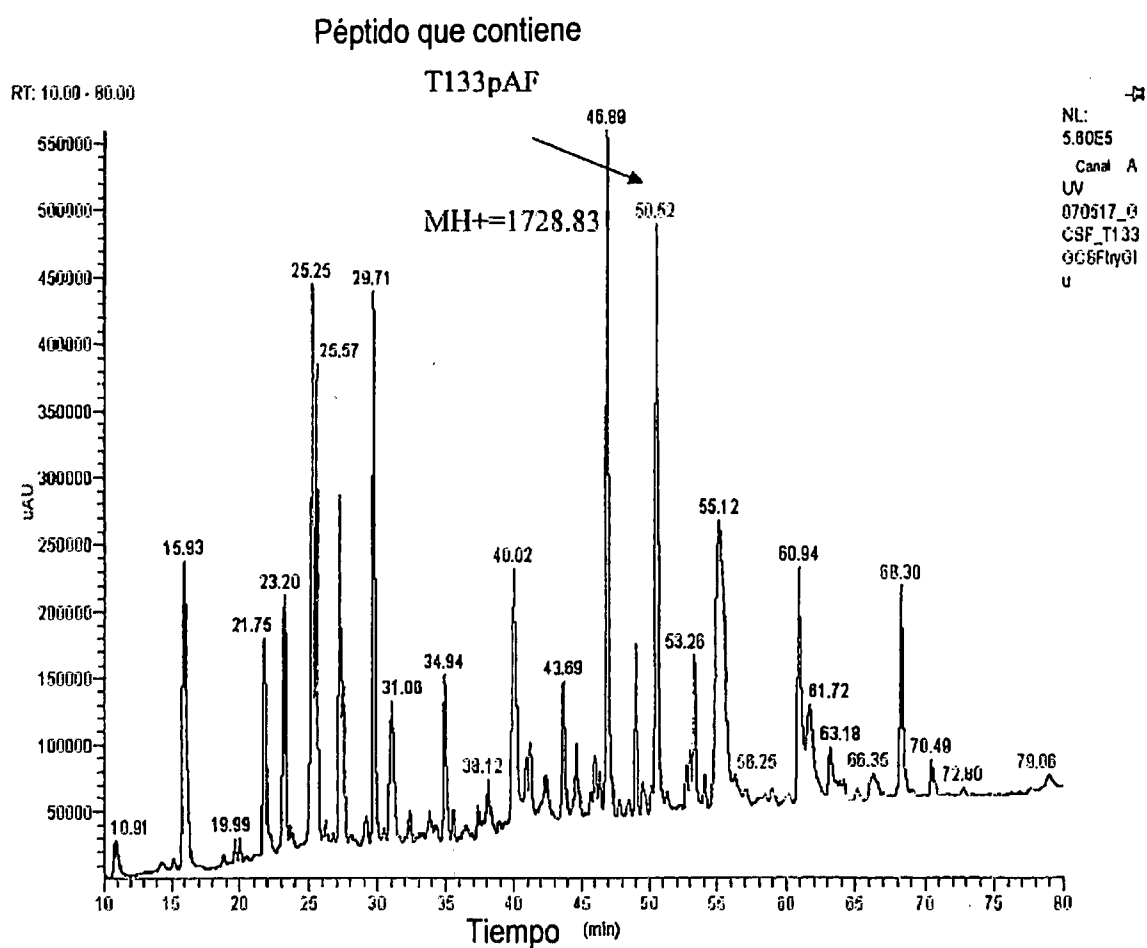


Fig 8a

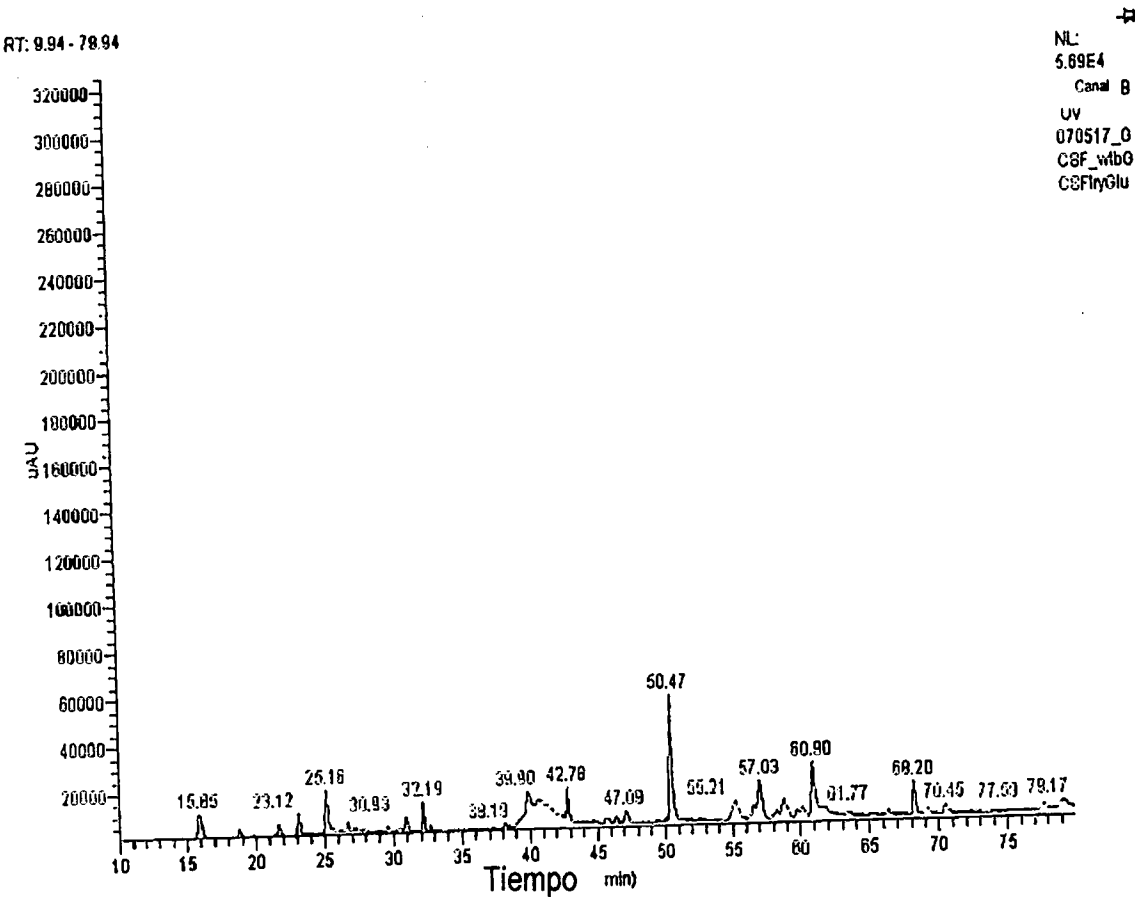


Fig 8b

Péptido que contiene

T133pAF

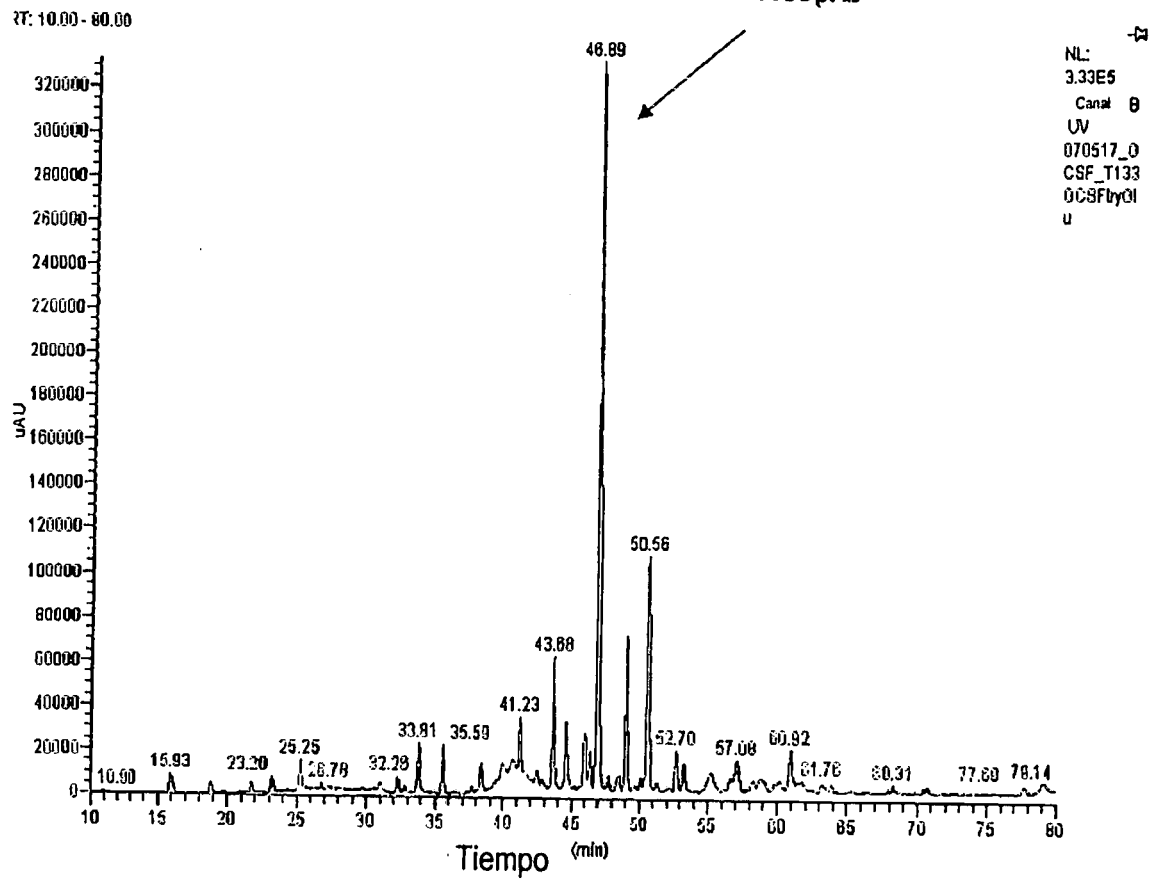


Fig 9a

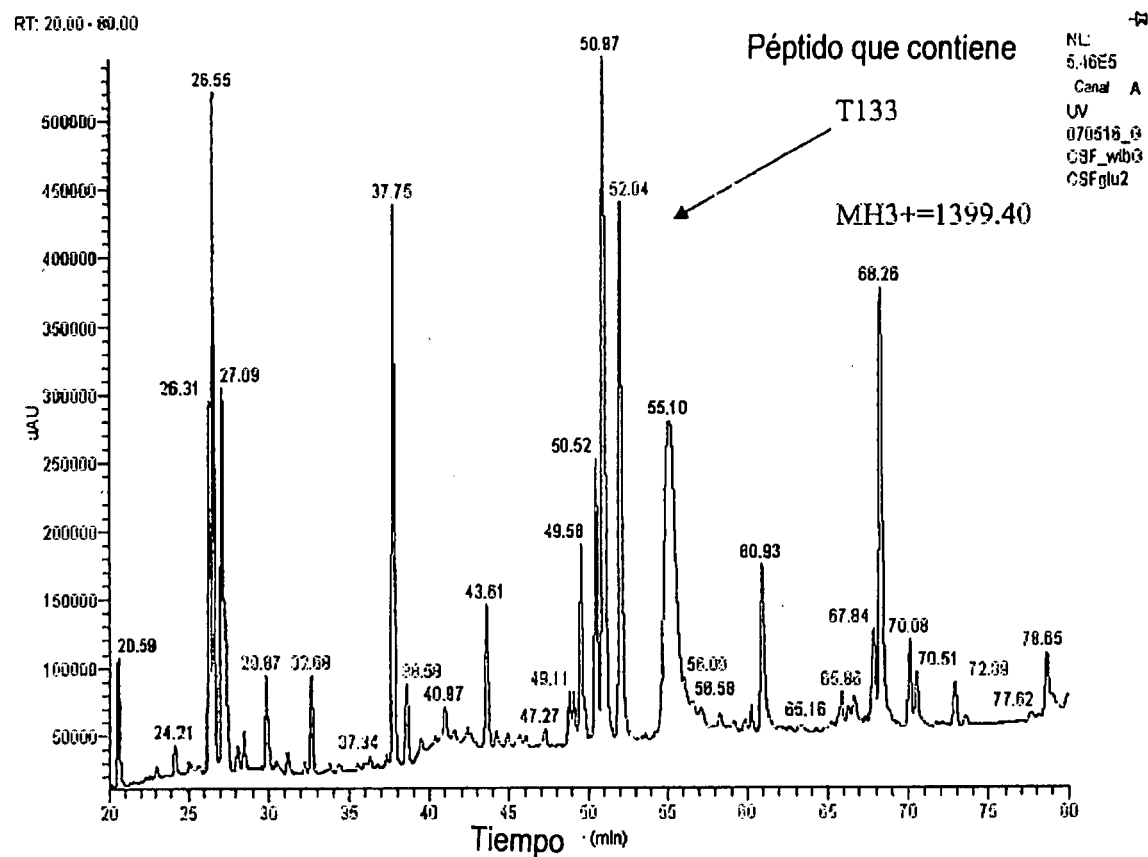


Fig 9b

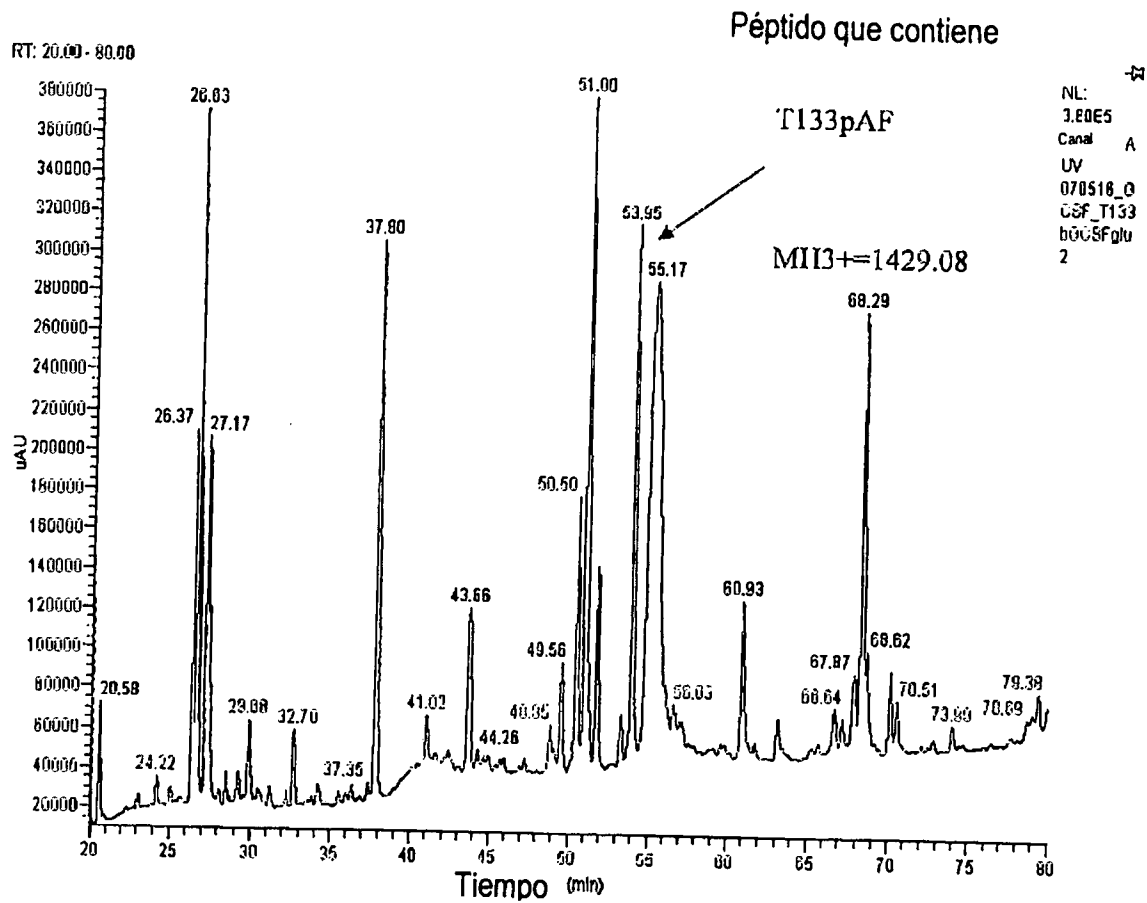


Fig 10a

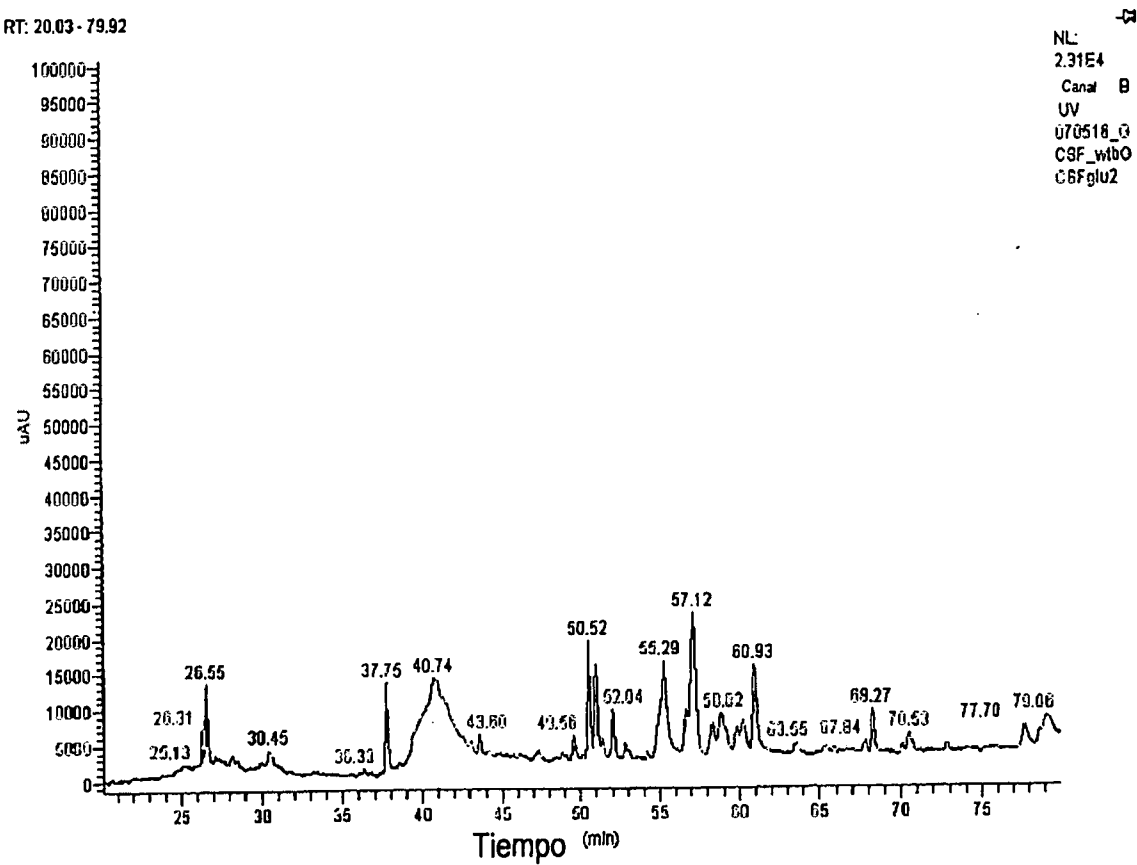
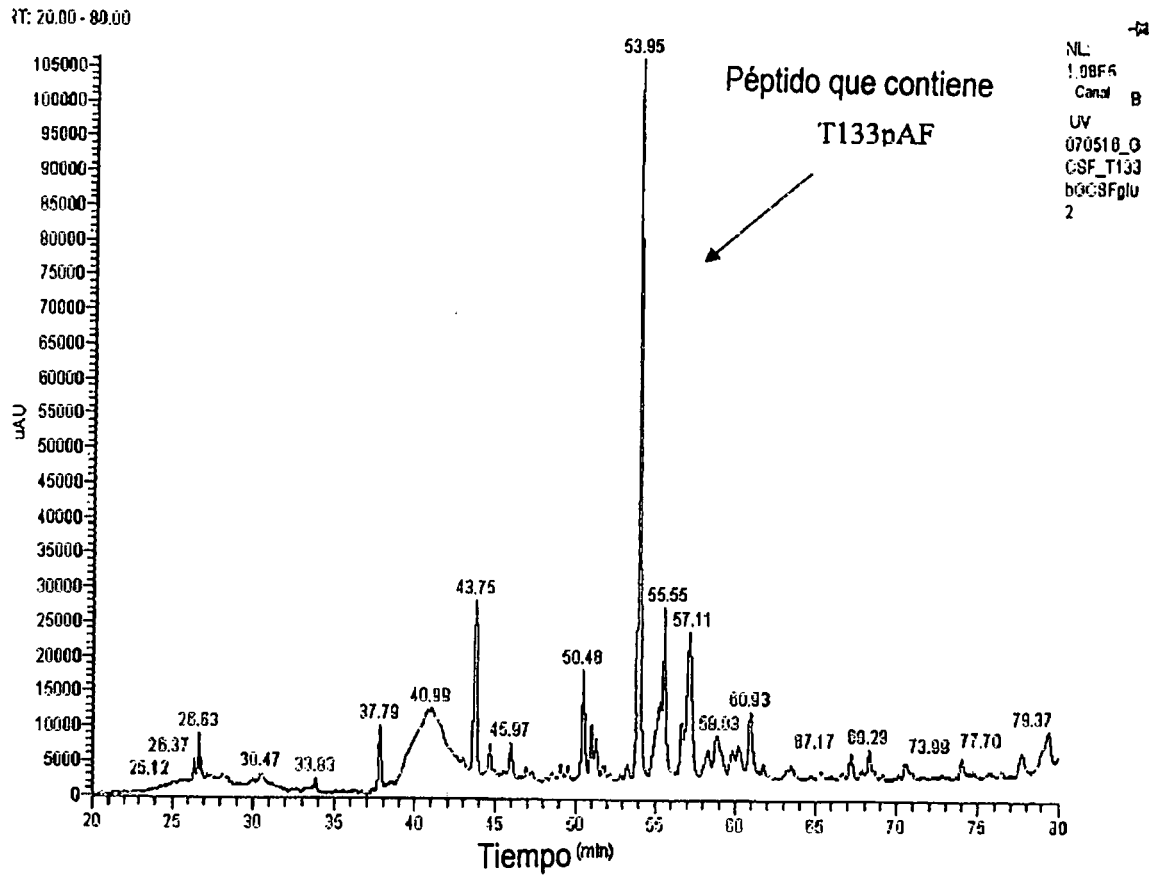
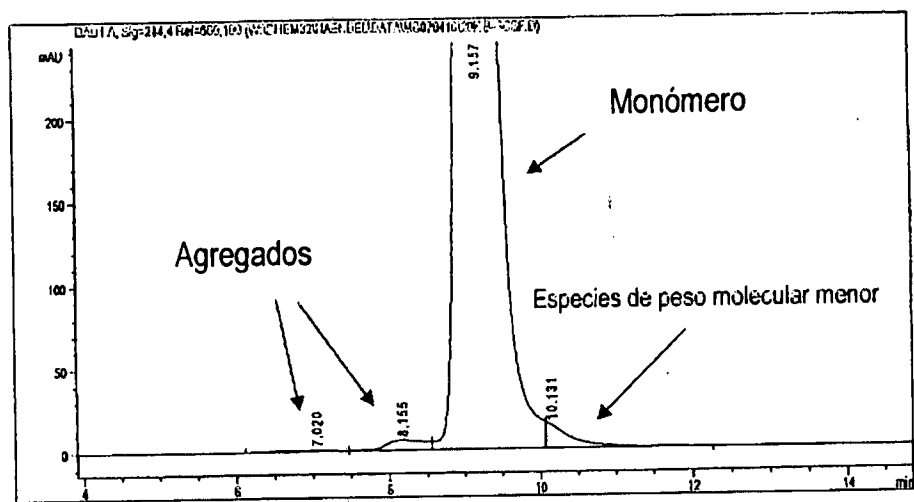


Fig 10b



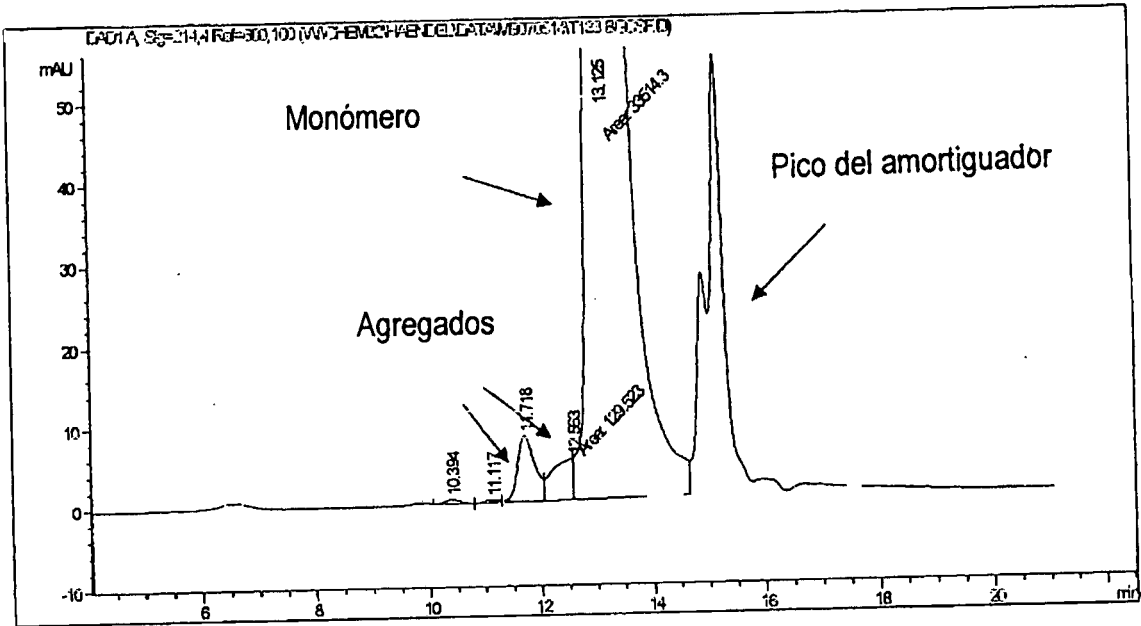
423

Fig 11



424

Fig 12



425

Fig 13

Ensayo de Proliferación de NFS60- Valores Brutos de EC50
De Compuestos 20KPEGilados

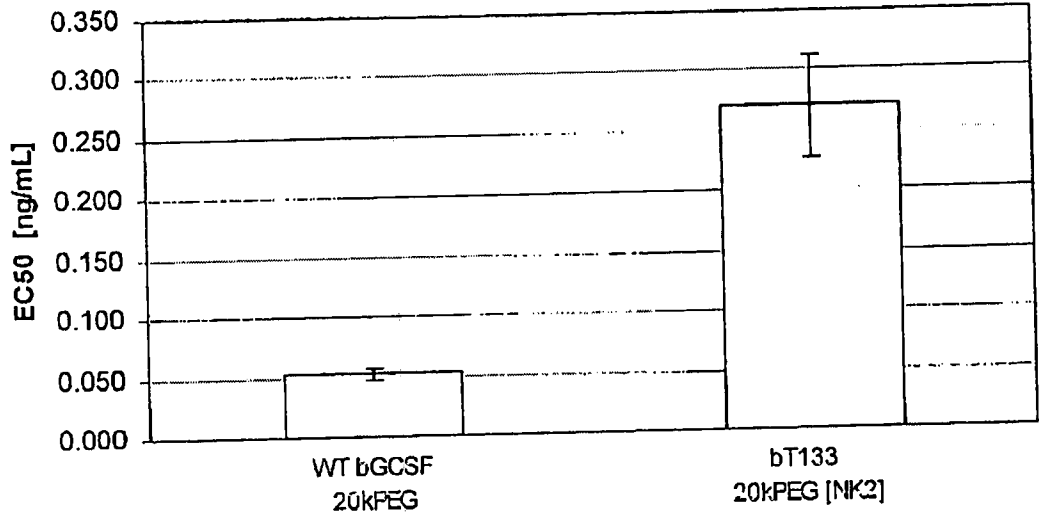


Fig. 14

Ensayo de Proliferación de NFS60 – Diferencias de EC50 en Veces vs WT

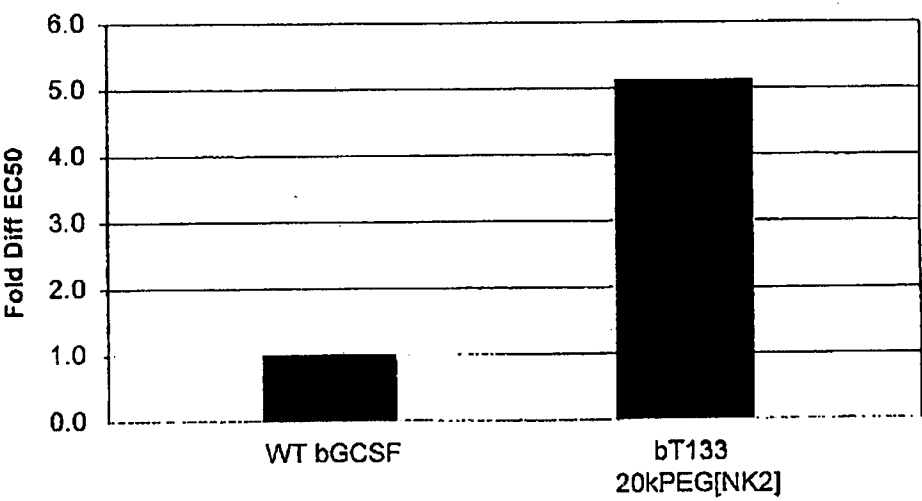


Fig 15

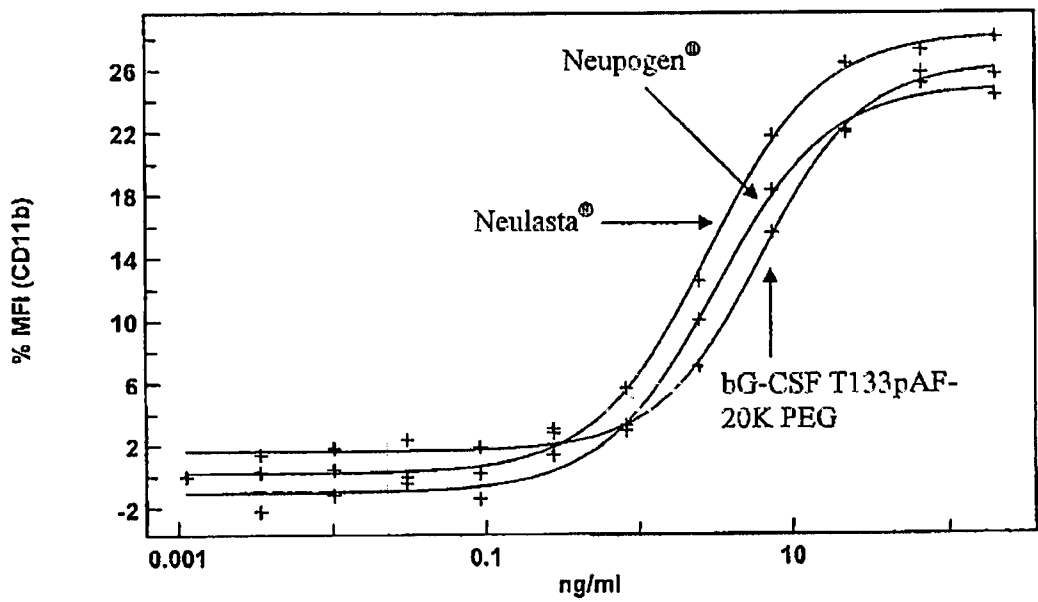


Fig 16

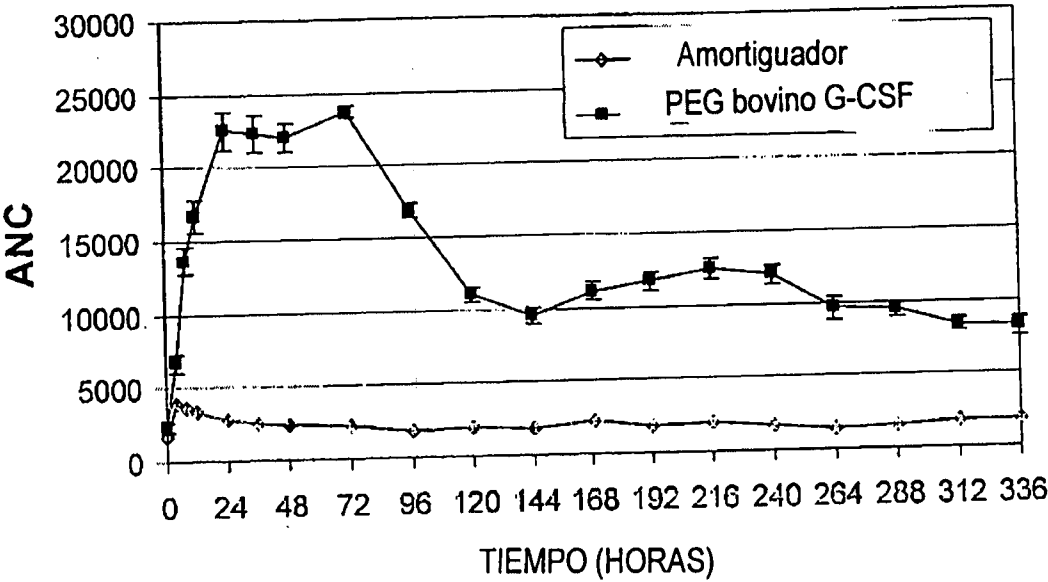


Fig 17

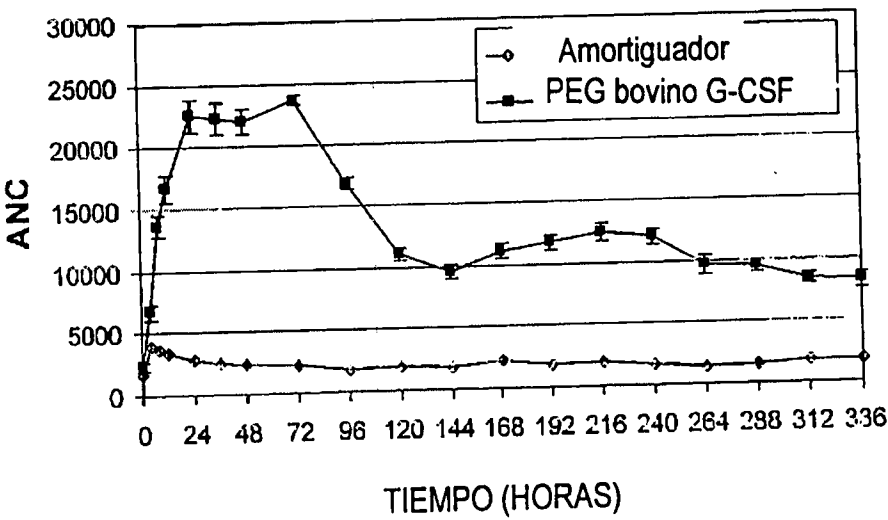


Fig 18

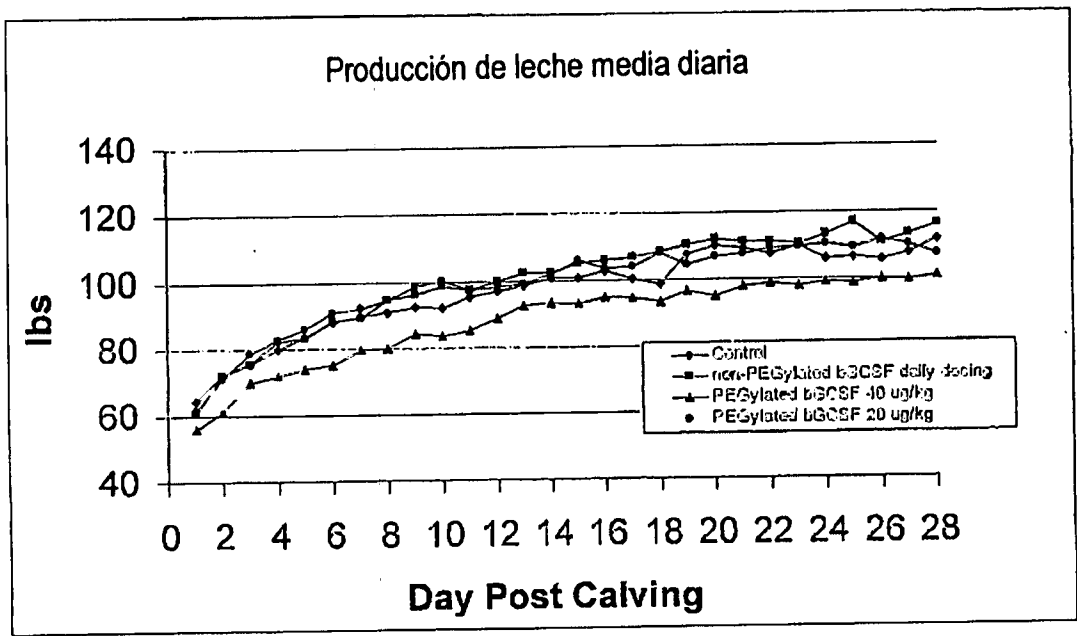
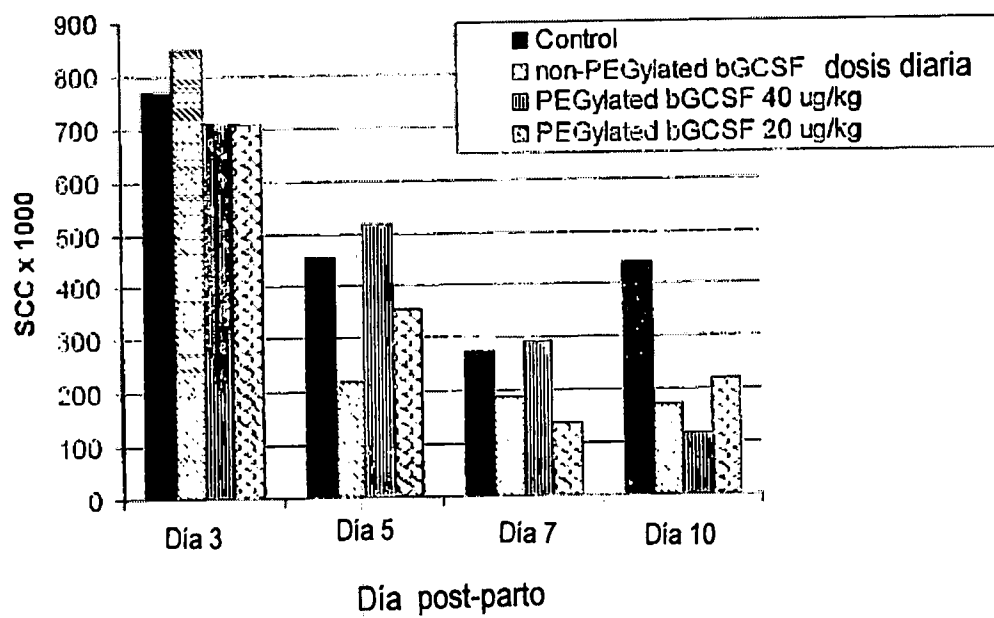


Fig . 19

Recuento de Células Somáticas



432

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Hays Putnam, Anna-Maria
		Knudsen, Nick
5		Norman, Thea
		Koder, Alan
		Kraynov, Vadim
		Ho, Lillian
		Canning, Peter
10	<120>	Polipéptidos G-CSF bovinos modificados y sus usos
	<130>	AMBX-0154.00PCT
15	<150>	Documento 61/083.132
	<151>	23-07-2008
	<160>	24
20	<170>	PatentIn versión 3.4
	<210>	1
	<211>	174
	<212>	PRT
25	<213>	<i>Bos taurus</i>
	<400>	1
30	Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys	
	1 5 10 15	
	Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln	
	20 25 30	

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met
 35 40 45

5 Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
 65 70 75 80

10 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
 85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
 15 100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro
 115 120 125

20 Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
 130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe
 145 150 155 160

25 Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
 165 170

<210> 2

30 <211> 175
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

<400> 2

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

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
 40 20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
5 65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
10 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
20 145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170 175

25 <210> 3
<211> 525
<212> ADN
<213> *Bos taurus*

30 <400> 3

actccattag gtctgcaag tagcctgctt caaagttttc tgctgaaatg cctggagcag 60

gtcgcacaaa ttcaagctga tggcgaggaa ctgcaggagc gtctgtgtgc cgcacataaa 120

35 ctgtgccacc cggaagaact gatgtgtctg cgcattcac tgggaatccc acaggctcct 180

ctgtcctcgt gtagctctca aagctgcag ctgacttcat gctgaatca actgcacgga 240

40 ggctgttcc tgtatcaggg tctgtgcag gcgctggcgc ggattcccc ggagctggca 300

cgcacactgg acacctgca actggatgta acggactttg ctactaacat ctggctgcag 360

atggaagatc tgggagcggc cccagcagtg caacctacac agggcgctat gccgacctc 420
 acgtggcggt ttcagcgctg cgccgggtggc gttctggctg caagccaact gcacgtttc 480
 5 ctggagctgg cgtaccggcg tctgcgttat ctggctgaac cgtaa 525
 <210> 4
 <211> 528
 <212> ADN
 10 <213> *Bos taurus*
 <400> 4
 atgactccat taggtcctgc acgtagcctg cctcaaagtt ttctgtgaa atgcctggag 60
 15 caggtcgcga aaattcaagc tgatggctgg gaactgcagg agcgtctgtg tgccgcacat 120
 aaactgtgcc acccggaaga actgatgctg ctgcgccatt cactgggaat cccacaggct 180
 20 cctctgtcct cgtgtagctc tcaaagtctg cagctgactt catgcctgaa tcaactgcac 240
 ggaggcctgt tctgtatca gggctctctg caggcgctgg ccgggatttc cccggagctg 300
 gcaccgacac tggacaccct gcaactggat gtaacggact ttgtactaa catctggctg 360
 25 cagatggaag atctgggagc ggccccagca gtgcaacctc cacagggcgc tatgcggacc
 420
 ttaacgtcgg cgtttcagcg tcgcgcgggt ggcggtctgg tcgcaagcca actgcacgt 480
 30 ttctggagc tggcgtaccg cggctctcgt tatctggctg aaccgtaa 528
 <210> 5
 <211> 77
 35 <212> ADN
 <213> *Methanococcus jannaschii*
 <400> 5
 40 ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

	tcgggcccgc cggacca	77
	<210> 6	
5	<211> 88	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Un ARNt supresor ámba optimizado	
	<400> 6	
	ccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgtctc gtaggagttc	60
15	gaggggtcga atccctccc tgggacca	88
	<210> 7	
	<211> 89	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Un ARnt supresor de desplazamiento de marco AGGA	
25	optimizado	
	<400> 7	
	gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt	60
30	cgaggggtcg aatccctccc ctgcacca	89
	<210> 8	
	<211> 307	
35	<212> PRT	

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-L-fenilalanina

<400> 8

10	Gly Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile
	1 5 10 15
	Ser Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala
	20 25 30
15	Gly Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu
	35 40 45
	Gln Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile
20	50 55 60
	Ile Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu
	65 70 75 80
	Asp Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala
25	85 90 95
	Met Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp
	100 105 110
30	Lys Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu
	115 120 125
	Lys Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn
35	130 135 140
	Pro Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr
	145 150 155 160
40	Tyr Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys
	165 170 175
	Ile His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile
	180 185 190

	His Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser
	195 200 205
5	Ser Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg
	210 215 220
	Ala Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn
	225 230 235 240
10	Pro Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile
	245 250 255
	Lys Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu
15	260 265 270
	Glu Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu
	275 280 285
20	Lys Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg
	290 295 300
	Lys Arg Leu
25	305
	<210> 9
	<211> 306
	<212> PRT
	<213> Artificial
30	
	<220>
	<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina
35	
	<400> 9
	Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
	1 5 10 15
40	Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
	20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 5 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 10 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 15 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 20 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 30 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 35 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 45 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

5 Arg Leu
305

<210> 10
<211> 305
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
15 propargil-fenilalanina

<400> 10

20 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

25 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

30 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

35 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

40 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
	130				135			140								
5	Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Ala	Ile	Tyr
	145				150			155				160				
	Leu	Ala	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	His
				165				170				175				
10	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His	Asn
		180				185			190							
	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser	Lys
15		195				200			205							
	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Lys
		210				215			220							
20	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro	Ile
	225				230				235			240				
	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys	Arg
				245				250				255				
25	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu
		260				265					270					
	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys	Asn
30		275				280			285							
	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys	Arg
		290				295			300							
35	Leu															
	305															
	<210>	11														
	<211>	305														
	<212>	PRT														
40	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de														

propargil-fenilalanina

<400> 11

5 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 10 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 15 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 20 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 25 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
 145 150 155 160
 35 Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190
 40 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 45

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240

5 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270

10 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 15 290 295 300

Leu
 305

20 <210> 12
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
 propargil-fenilalanina

<400> 12

30 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 35 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

40 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
5 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

10 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
20 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

25 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240

35 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

40 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 13
<211> 306
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

10 <400> 13

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
15 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
20 35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
25 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
30 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
35 115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
40 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145 150 155 160

446

	Tyr	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	
			165				170				175						
5	His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His	
			180				185				190						
	Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser	
10			195				200				205						
	Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	
			210				215				220						
	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro	
15			225				230				235				240		
	Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys	
							245				250				255		
20	Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu	
							260				265				270		
	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys	
25							275				280				285		
	Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys	
							290				295				300		
30	Arg	Leu					305										
	<210>	14															
	<211>	306															
	<212>	PRT															
35	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de															
		p-azido-fenilalanina															
40																	
	<400>	14															

447

	Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
	1 5 10 15
5	Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
	20 25 30
	Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
	35 40 45
10	Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
	50 55 60
	Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
15	65 70 75 80
	Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
	85 90 95
20	Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
	100 105 110
	Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
	115 120 125
25	Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
	130 135 140
	Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
30	145 150 155 160
	Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
	165 170 175
35	His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
	180 185 190
	Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
	195 200 205
40	Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
	210 215 220
	Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
45	225 230 235 240
	Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
	245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

5 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

10 Arg Leu
 305

<210> 15

15 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

20 <223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
 p-azido-fenilalanina

<400> 15

25 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

30 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

35 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

40 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

5 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

10 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

20 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

25 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

35 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

40 Arg Leu
 305

<210> 16

45 <211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

5

<400> 16

10	Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser	1	5	10	15
	Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr	20	25	30	
15	Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln	35	40	45	
	Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile	50	55	60	
20	Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp	65	70	75	80
	Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met	85	90	95	
25	Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys	100	105	110	
	Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys	115	120	125	
30	Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro	130	135	140	
35	Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His	145	150	155	160
	Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile	165	170	175	
40	His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His	180	185	190	

	Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser
	195					200			205							
5	Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala
	210				215			220								
	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro
10	225				230			235			240					
	Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
			245				250			255						
	Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu
15			260			265			270							
	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys
		275			280			285								
20	Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys
	290				295			300								
	Arg	Leu														
25	305															
	<210>	17														
	<211>	306														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
30	<220>															
	<223>	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina														
35	<400>	17														
	Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
	1		5				10			15						
40	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu
		20				25			30							

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 5 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 10 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 15 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
 145 150 155 160
 25 Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 30 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 40 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 45 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

	Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys
	290				295				300							
5	Arg	Leu														
	305															
	<210>	18														
	<211>	306														
10	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de														
15		p-acetil-fenilalanina														
	<400>	18														
20	Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
	1		5				10			15						
	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu
		20			25				30							
25	Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
		35			40			45								
	Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
	50			55			60									
30	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
	65			70			75			80						
	Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
35			85			90				95						
	Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Glu	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
		100			105				110							
40	Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
		115			120				125							

454

	Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
	130				135			140								
5	Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Gly	Thr	His
	145			150				155				160				
	Tyr	Arg	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile
			165				170				175					
10	His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His
		180				185			190							
	Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser
15		195			200			205								
	Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala
	210			215				220								
20	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro
	225			230				235			240					
	Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
		245				250			255							
25	Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu
		260				265			270							
	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys
30		275			280			285								
	Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys
	290			295				300								
35	Arg	Leu														
	305															
	<210>	19														
	<211>	306														
	<212>	PRT														
40	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de														

255

p-acetil-fenilalanina

<400> 19

5 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 10 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 15 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 20 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 25 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 30 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His
 145 150 155 160
 35 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 40 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 45 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

	Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
	225 230 235 240
5	Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
	245 250 255
	Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
10	260 265 270
	Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
	275 280 285
	Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
15	290 295 300
	Arg Leu
	305
20	<210> 20
	<211> 306
	<212> PRT
	<213> Artificial
25	<220>
	<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
	p-azido-fenilalanina
	<400> 20
30	Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
	1 5 10 15
	Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
35	20 25 30
	Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
	35 40 45
40	Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
	50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

5 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

10 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 15 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
 145 150 155 160

20 Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

25 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 30 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

35 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

40 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 45 290 295 300

Arg Leu

305

<210> 21

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

<400> 21

15 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

20 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

25 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

30 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

35 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

40 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

	145	150	155	160
	Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile			
		165	170	175
5	His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His			
		180	185	190
10	Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser			
		195	200	205
	Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala			
		210	215	220
15	Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro			
		225	230	235
				240
	Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
		245	250	255
20	Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu			
		260	265	270
	Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys			
25		275	280	285
	Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys			
		290	295	300
30	Arg Leu			
	305			
	<210> 22			
	<211> 921			
35	<212> ADN			
	<213> Artificial			
	<220>			
	<223> Sintetasa mutante derivada de sintetasa de			
40	<i>Methanococcus jannaschii</i>			
	<400> 22			

atggacgaat ttgaaatgat aaagagaaaac acatctgaaa ttatcagoga ggaagagtta 60
 agagagggtt taaaaaaga tgaaaaatct gctgttatag gtttgaacc aagtggtaaa 120
 5 atacatttag ggcattatct ccaaataaaa aagatgattg atttcaaaa tgcaggattt 180
 gatataatta tatattggc tgatttacac gctatttaa accagaaagg agagttggat 240
 10 gagattagaa aaataggaga ttatacaaaa aaagttttg aagcaatggg gttaaaggca 300
 aaatatgttt atggaagtga acatgggtctt gataaggatt atacactgaa tgtctataga 360
 15 ttggctttaa aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaacttat agcaagagag 420
 gatgaaaatc caaagggtgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggtaa tgggattcat 480
 tatgagggcg ttgatgtgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgtagca 540
 20 agggagcttt taccaaaaaa ggtgtttgt attcacaacc ctgtctaac gggtttggat 600
 ggagaaggaa agatgagttc ttcaaaaggg aatttatag ctgtgatga ctctccagaa 660
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcccagctg gagttgtga aggaaatcca 720
 25 ataatggaga tagctaaata ctctctgaa tatcctttaa ccataaaaag gccagaaaaa 780
 ttgtgtggag attgacagt taatagctat gaggagttag agagtttatt taaaaataag 840
 30 gaattgcac caatggattt aaaaaatgct gtgactgaag aacttataaa gattttagag 900
 ccaattagaa agagattata a 921
 <210> 23
 35 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> ARNt mutante derivado de ARNt de *Methanococcus*
jannaschii

<400> 23

ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaat ccgcatggcg ctgggtcaaa 60

5 tccagccccgc cggacca

77

<210> 24

<211> 306

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Sintetasa mutante derivada de sintetasa de

Methanococcus jannaschii

15

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

20

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20 25 3025 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 6030 Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

35

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
100 105 11040 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

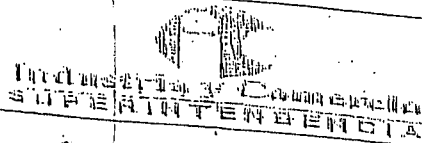
	Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
	130 135 140
5	Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
	145 150 155 160
	Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
	165 170 175
10	His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
	180 185 190
	Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
15	195 200 205
	Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
	210 215 220
20	Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
	225 230 235 240
	Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
	245 250 255
25	Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
	260 265 270
	Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Arg Leu Lys
30	275 280 285
	Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
	290 295 300
35	Arg Leu
	305

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019241- -00000-0000

Fecha: 2011-02-17 12:19:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTE/II Evt. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 463



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

1 ☒

29 ☒

410 ☒

2 ☒

Indicación que se solicita una PCT
Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño Industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 93 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica de un esquema de trazado
Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
LILLY AND COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	11 019241
	Solicitud internacional	PCT/US2009/051388
	Fecha inicio fase nacional	23/02/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

05510

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 33 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a los dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.

Anexo al presente requerimiento se sugieren los lineamientos principales para la presentación adecuada del resumen.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal F) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título II de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.



Continuación radicado No: 11 019241

446

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

25 MAR. 2011



Bogotá D.C.,
2020



Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
LILLY AND COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	11 019241
	Solicitud internacional	PCT/US2009/051388
	Fecha inicio fase nacional	23/02/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

05511

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 12 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

25 MAR. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11

ANEXO INFORMATIVO

Presentación

El resumen debe ser claro y tan conciso como lo permita la descripción. No debe exceder de 250 palabras, debiendo contener preferentemente de 50 a 150 palabras y puede incluir fórmulas químicas y matemáticas, cuadros o figuras, en tamaño 12x12.

Contenido

El resumen debe tratar esencialmente de lo que es nuevo y aporta la invención al estado de la técnica al que pertenece. De esta manera, si la naturaleza de la invención es la modificación de un aparato, o la presentación de un procedimiento, producto o compuesto, el resumen debe enfocarse hacia la descripción técnica de la modificación.

En el caso de que el documento de patente reivindique un producto, particularmente un compuesto o componente y también contenga un procedimiento o método de preparación, éste también debe ser incluido en el resumen.

En lo que concierne a los compuestos o composiciones químicas, el resumen debe contener la naturaleza química del compuesto o de la composición, así como el campo de aplicación. El resumen debe indicar la fórmula química que mejor caracterice la invención.

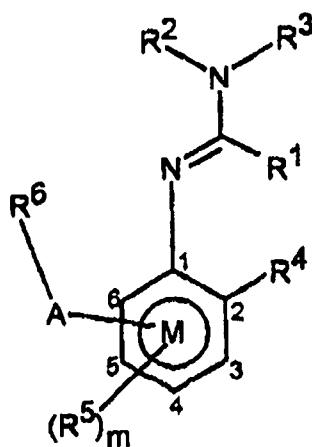
En lo que respecta a los procedimientos, el resumen debe explicar el tipo de reacción, los reactivos y las condiciones para llevar a cabo el procedimiento.

El resumen no debe contener declaraciones relativas a las ventajas asociadas a la invención.

Ejemplo:

Objeto de la Invención: Derivados de fenilamidina de fórmula (I) con aplicación como antifúngicos.

Características de la Invención: Compuestos fungicidas de fórmula (I) y sales donde: R1 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico cada uno de los cuales se encuentra sustituido; R2 y R3 son iguales o diferentes y se eligen entre: ciano, acilo, -ORa o -OSRa donde Ra es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo o heterociclilo, o bien, R2 y R3 forman conjuntamente con el átomo al cual se unen un anillo que puede sustituirse por R4 que es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico y que pueden sustituirse por hidroxilo, mercapto, azido, nitro, halógeno, ciano, acilo. R5 es igual a la definición contemplada para R4, R6 es un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido y A es un grupo enlazante o AR6 y AR5 forman un anillo fusionado con el anillo de benceno M.

Figura característica:

Campo de aplicación: Producción de agentes antifúngicos con aplicación farmacéutica