



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월23일

(11) 등록번호 10-1699142

(24) 등록일자 2017년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7032081(분할)

(22) 출원일자(국제) 2005년06월17일

심사청구일자 2014년12월03일

(85) 번역문제출일자 2014년11월17일

(65) 공개번호 10-2015-0005973

(43) 공개일자 2015년01월15일

(62) 원출원 특허 10-2006-7027061

원출원일자(국제) 2005년06월17일

심사청구일자 2010년06월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/021579

(87) 국제공개번호 WO 2006/009901

국제공개일자 2006년01월26일

(30) 우선권주장

60/581,334 2004년06월18일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

JP2009132704 A

KR1020020012292 A*

W02002085923 A2*

KR1020040029975 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

암브룩스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아주 92037 라호야 노스 터레이 파
인스 로드 10975 수트 100

(72) 발명자

조, 호성

미국 캘리포니아주 92122 샌 디에고 아파트먼트
#107 퍼오레 테라스 5225

다니엘, 토마스, 오.

미국 캘리포니아 92037 라 졸라 비아 프라비아
2201

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김태홍, 김진희

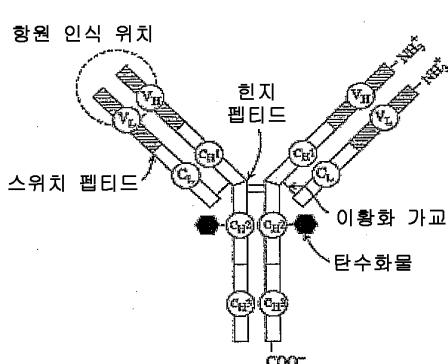
전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 신규 항원-결합 폴리펩티드 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 신규의 항원-결합 폴리펩티드(ABP) 및 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

월슨, 트로이, 이.

미국 캘리포니아주 91108 산 마리노 올드 밀 로드
575

큐첵, 토마스, 피.

미국 캘리포니아주 92131 샌 디에고 글렌크리크 서
클 10988

티안, 평

미국 캘리포니아주 92129 샌 디에고 벽위트 스트리
트 9003

헤이스 푸트남, 안나-마리아 에이.

미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 비아 알리칸트
#251 3187

김멜, 브루스, 이.

미국 캘리포니아주 92130 샌 디에고 자카르트 코트
13236

호, 릴리안

미국 캘리포니아주 92103 샌 디에고 써어드 애비뉴
3831

(30) 우선권주장

60/648,222 2005년01월28일 미국(US)

60/654,018 2005년02월17일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

상피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하는 제1 항원-결합 폴리펩티드(ABP)와 EGFR 또는 HER2에 결합하는 제2 항원-결합 폴리펩티드(ABP) 중 하나 또는 둘의 불변 영역에서, 1 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기에 의해 형성되는 공유 결합을 통해 서로 결합되어 있는 상기 제1 ABP와 상기 제2 ABP를 포함하는 이중특이적(bispecific) 항원-결합 폴리펩티드(ABP)로서, 상기 작용기는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 1 이상의 케톤 또는 아지드를 포함하고, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌 또는 파라-아지도-페닐알라닌이며, EGFR에 결합하는 하나의 ABP는 scFv-108의 131번 세린, 136번 세린, 144번 히스티딘, 156번 루신, 190번 티로신, 193번 세린 및 248번 리신 중 어느 하나가 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 대체되어 있는 scFv-108을 포함하고, scFv-108은 서열번호 19의 24번 내지 276번 잔기에 해당하는, mAb108의 V_L 및 V_H 영역 및 링커(GGGGS)₄로 구성되며, scFv-108의 131번 세린은 서열번호 19의 154번 세린에 해당하고, scFv-108의 136번 세린은 서열번호 19의 159번 세린에 해당하며, scFv-108의 144번 히스티딘은 서열번호 19의 167번 히스티딘에 해당하고, scFv-108의 156번 루신은 서열번호 19의 179번 루신에 해당하며, scFv-108의 190번 티로신은 서열번호 19의 213번 티로신에 해당하고, scFv-108의 193번 세린은 서열번호 19의 216번 세린에 해당하며, scFv-108의 248번 리신은 서열번호 19의 271번 리신에 해당하는 것인 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 2

독소 분자에 커플링되어 있는 제1항의 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 단일 아미노산에서 항원-결합 폴리펩티드에 공유 결합으로 연결된 수용성 중합체를 포함하는 것인 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 1 이상의 링커 또는 생물 활성 분자를 포함하고, 상기 링커 또는 생물 활성 분자는 리보솜에 의해 폴리펩티드 내에 삽입되어 있는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통하여 상기 폴리펩티드에 부착되어 있으며, 상기 링커는 소분자 유기 화합물, 수용성 중합체 또는 폴리펩티드이고, 상기 생물 활성 분자는 약물, 전구 약물, 방사성 핵종, 영상제, 항생제, 살진균제, 항바이러스 제제, 소염제, 항종양 제제, 심혈관 제제, 항불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드 제제, 미생물 유래 독소, 리간드, 에피토프 태그, 웨티드 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드.

발명의 설명

기술 분야

[관련 출원에 관한 상호 참고 문헌]

[0001]

본 출원은 2004년 6월 18일 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/581,334 호, 2005년 1월 28일 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/648,222 호 및 2005년 2월 17일 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/654,018 호에 대하여 우선권을 주장하고 있으며, 상기 출원들의 상세한 설명은 그 자체로서 본원에 인용되어 있다.

[0002]

[본 발명의 분야]

[0003]

본 발명은 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산(non-naturally encoded amino acid)을 포함하는 신규의 항원-결합 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 일반적으로 화학적 방법 및 재조합 DNA 양자 모두를 사용하는, 분자 생물학적 방법에 의해 항원-결합 폴리펩티드를 생산 및 선별하는 기술 분야에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 천연 생산된 항체(Ab)는 2개의 동일한 면역 글로불린(Ig) 중쇄와 2개의 동일한 경쇄로 이루어진 사량체 구조이다. Ab의 중쇄 및 경쇄는 상이한 영역으로 이루어져 있다. 각각의 경쇄는 하나의 가변 영역(VL)과 하나의 불변 영역(CL)을 갖는 반면에, 각각의 중쇄는 하나의 가변 영역(VH)과 3개 또는 4개의 불변 영역(CH)을 갖는다. 약 110개의 아미노산 잔기들로 이루어진 각각의 영역은 서로에 대해서 팩킹된 2개의 β -시트로 형성되어 있는, 특징적인 β -샌드위치 구조(면역 글로불린 폴드; immunoglobulin fold)로 폴딩되어 있다. 상기 VL 영역은 각각 3개의 상보성 결정부(CDR1-3)를 보유하며 상기 VH 영역은 각각 4개 이하의 상보성 결정부(CDR1-4)를 보유하는데, 여기서 상기 부분들은 루프이거나 선회부로서 각 영역의 한쪽 말단부에서 β -사슬을 연결시킨다. 경쇄 및 중쇄들 다의 가변부는 일반적으로 항원 특이성에 기여 하지만, 이 특이성에 대한 각 사슬의 기여도는 반드시 동등하지는 않다. 항체 분자는 랜덤화된 CDR 루프 구조를 이용하여 다수의 분자들과 결합하도록 진화되었다.
- [0006] Ab의 기능성 종속 구조는 단백 분해 및 재조합 방법에 의해 형성될 수 있다. 이러한 종속 구조들로서는, 단일의 사슬간 이황화 결합으로 결합된 중쇄의 VH-CH1 영역 및 경쇄의 VL-CL1 영역을 포함하는 Fab 단편과, VH 및 VL 영역만을 포함하는 Fv 단편, 그리고 분자의 비 항원 결합부를 포함하는 Fc 부분을 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 단일의 VH 영역은 항원에 대하여 상당한 친화성을 보유한다[Ward 외 다수, 1989, Nature 341, 554-546]. 또한 임의의 단량체 κ 경쇄는 그것의 항원에 특이적으로 결합할 것이라는 사실도 밝혀진 바 있다[L. Masat 외 다수, 1994, PNAS 91:893-896]. 분리된 경쇄 또는 중쇄는 때때로 약간의 항원-결합 활성도 보유하는 것으로 밝혀진 바 있다[Ward 외 다수, 1989, Nature 341, 554-546].
- [0007] 다른 기능성 종속 구조로서는, 면역 글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변부로 이루어졌으며, 웨პ티드 링커에 의해 공유 결합되어 있는 단일 사슬의 Fv(scFv)가 있다[S-z Hu 외 다수, 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061]. 이와 같이 작은(Mr 25,000) 단백질은 일반적으로 단일 폴리웨პ티드인 항원에 대하여 특이성 및 친화성을 보유하며, 보다 큰 항원-특이적 분자에 대해 편리한 기초 단위(building block)를 제공할 수 있다. 혈류내 scFv의 짧은 반감기는 다수의 경우에 있어서 치료적 유용성을 제한한다.
- [0008] "미니바디(minibody)"라 불리우는 작은 단백질 골격은 주형으로서 Ig VH 영역의 일부분을 사용하여 고안되었다 [Pessi 외 다수, 1993, Nature 362, 367-369]. 인터루킨-6에 대하여 고도의 친화성을 보유하는(해리 상수(K_d) = 약 10^{-7} M) 미니바디는 VH의 CDR1 및 CDR2에 해당하는 루프를 랜덤화한 후, 파아지 디스플레이법을 사용하여 돌연변이체를 선별함으로써 확인되었다[Martin 외 다수, 1994, EMBO J. 13, 5303-5309].
- [0009] 낙타 혈청으로부터 유래된 IgG 유사 물질을 분석하였을 때 낙타는 종종 가변 경쇄 영역이 결여된 것을 알 수 있는데, 이는 충분한 항체 특이성 및 친화성이 VH 영역(3~4개의 CDR 루프)만으로부터 유래될 수 있음을 시사하는 것이다. 친화성이 높은 "낙타화된" VH 영역이 얻어졌으며, 고도의 특이성은 CDR3만을 랜덤화 시킴으로써 얻어질 수 있다.
- [0010] "미니바디"에 대한 대안이 "다이아바디(diabody)"이다. 다이아바디는 2개의 항원-결합 위치를 보유하는, 2가(bivalent)이며 이중특이적인(bispecific), 작은 항체 단편이다. 상기 단편은 동일한 폴리웨პ티드 사슬(V_H-V_L) 상에서 경쇄 가변 영역(V_L)에 결합되어 있는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함한다. 다이아바디는 Fab 단편과 크기가 유사하다. 동일한 사슬 상에서 2개의 영역끼리 짹을 이를 수 있도록 하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 영역들은 다른 사슬의 상보성 영역과 짹을 이루도록 강제되어 2개의 항원-결합 위치를 형성하게 된다. 이러한 이량체성 항체 단편 또는 "다이아바디"는 2가이며 이중특이적이다. 문헌[P. Holliger 외 다수, PNAS 90:6444-6448 (1993)]을 참조하시오.
- [0011] CDR 웨პ티드 및 유기 CDR 모의체가 생산된 바 있다[Dougall 외 다수, 1994, Trends Biotechnol. 12, 372-379]. CDR 웨პ티드는 짧으며, 통상적으로 고리형인 웨პ티드로서, 항체의 CDR 루프 아미노산 서열에 해당한다. CDR 루프는 항체-항원 상호 작용에 관여한다. CDR 웨პ티드 및 유기 CDR 모의체는 약간의 결합 친화성을 보유하는 것으로 밝혀졌다[Smyth & von Itzstein, 1994, J. Am. Chem. Soc. 116, 2725-2733]. 마우스 CDR은 친화성을 잃지 않고서 인간의 Ig 구조들에 이식되었다[Jones 외 다수, 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann 외 다수, 1988].
- [0012] 체내에서, 특이적 Ab는 거대한 라이브러리로부터 선택 및 증폭된다(친화성 성숙; affinity maturation). 이 과정은 병행 라이브러리 기술을 사용하여 시험관 내에서 재현될 수 있다. 박테리오파지 표면상에 Ab 단편을 성공적으로 디스플레이시킴으로써, 다수의 CDR 돌연변이를 생성 및 스크리닝할 수 있게 된다[McCafferty 외 다수, 1990, Nature 348, 552-554; Barbas 외 다수, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982; Winter 외 다수, 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455]. 다수의 Fab 및 Fv(및 이들의 유도체)는 이 기술에 의해 생산

된다. 병행 기술은 Ab 모의체와 함께 사용될 수 있다.

[0013] 단백질 골격으로서 사용될 수 있는 다수의 단백질 영역은 파아지 캡시드 단백질과 함께 융합체로서 발현된다. 문헌[Clackson & Wells, Trends Biotechnol. 12:173-184 (1994)]을 참조하시오. 이러한 단백질 영역들 중 일부는 이미 랜덤한 펩티드 서열 예를 들어, 소 체장 트립신 억제 인자[Roberts와 다수, PNAS 89:2429-2433 (1992)], 인간 성장 호르몬[Lowman와 다수, Biochemistry 30:10832-10838 (1991); Venturini와 다수, Protein Peptide Letters 1:70-75 (1994)], 그리고 스트렙토코카스의 IgG 결합 영역[O'Neill과 다수, Techniques in Protein Chemistry V (Crabb, L., ed.) pp. 517-524, Academic Press, San Diego (1994)]의 디스플레이용 골격으로서 사용되고 있다. 이러한 골격은 단일의 랜덤화된 루프 또는 부분을 디스플레이한다. 텐더미스탯(Tendamistat)은 사상 파아지 M13에서 제시 골격(presentation scaffold)으로서 사용되었다[McConnell and Hoess, 1995, J. Mol. Biol. 250:460-470].

[0014] ErbB 군의 수용체 티로신 키나제는 세포 성장 및 분화에 있어서 중추적인 역할을 한다. 이러한 수용체의 이상 활성화는 인간의 암과 관련되어 있다. 이량체화(수용체의 짹 형성)는 모든 ErbB 수용체의 시그널링 활성에 필수적이다. ErbB2의 이량체화 활성을 차단하면 ErbB가 다른 ErbB 수용체 단백질과 이량체화 하는 능력을 직접적으로 억제하는 것으로 보인다. 수용체의 이량체화를 억제하면 ErbB 시그널링 경로의 활성화를 억제한다. ErbB 시그널링을 억제 조절하는 길항 분자는 항종양 제제로서의 기능을 할 수 있다. ErbB 시그널링 네트워크는 현재 항종양 약물의 개발에 있어서 주요 목표가 되고 있다. ErbB-1은 EGF에 대한 특이적 수용체인 반면에, ErbB-2는 공지의 천연 리간드를 보유하지 않는다. ErbB2는 EGF를 첨가함에 따라서 ErbB-1과 이종 이량체를 형성할 수 있다. ErbB2는 또한 키나제-사멸 ErbB-3 및 ErbB-4[이들은 둘 다 뉴레귤린(neuregulin)에 대한 수용체임]에 대한 바람직한 이량체화 과트너로서의 기능도 갖는다. 이러한 ErbB 시그널링 네트워크는 또한 G-커플링된 단백질 수용체의 리간드 및 시토킨에 의한 시그널링 동안 간접적 방식으로 활성화될 수 있는데, 이는 곧 상기 ErbB 시그널링 네트워크가 다수의 상이한 세포 유형들의 성장 조절에 있어서 중심적인 역할을 한다는 것을 시사해 주는 것이다.

[0015] 전 발암 유전자 c-erbB-1은 상피 상장 인자 수용체를 코딩한다. 이것의 이름은 아미노-말단 리간드-결합 영역이 결여된 닮의 c-ErbB-1 유전자의 단편으로서 함유되어 있는 경우, 조류의 적아세포증 바이러스(AEV)로부터 분리된 바이러스 상동체 v-erbB에서 유래한다. erbB-1 유전자의 과발현은 광범위한 종양 예를 들어, 다양한 위치의 편평암종 및 선암종에서 발생한다. 인간의 c-erbB-1 유전자는 염색체의 7p14 및 7p12 부위에 위치한다.

[0016] ErbB-2 전 발암 유전자(Neu, EGFR-2 또는 HER-2라고도 칭함)는 경막 수용체 티로신 키나제 군의 일원으로서, 이는 또한 EGF 수용체 및 EGFR-3(HER-3 또는 ErbB-3)를 포함한다. ErbB-2는 내재성 티로신 키나제 활성을 보유하는 185 kDa의 경막 수용체 유사 당단백을 코딩한다. 비록 ErbB-2가 어떠한 공지의 고친화성 리간드를 보유하지 않더라도, 이의 키나제 활성은 과발현 또는 수용체 ErbB 군의 기타 일원과의 이종 결합에 의하여 리간드 없이도 활성화될 수 있다. ErbB-2 유전자의 증폭 및 이의 생산물의 과발현은 1차적 인간 유방 종양 중 거의 40% 정도에서 확인되었다. ErbB-2 과발현은 또한 난소, 위, 이하선 및 비 소세포 폐 암종에서도 관찰된다. ErbB-2는 뉴레귤린 수용체인 ErbB-3 및 ErbB-4와 뉴레귤린의 이종 이량체로서 활성화된다. 인간화된 항ErbB-2 모노클로날 항체 허셉틴(herceptin)(모노클로날 4D5로부터 유래)은 ErbB-2를 과발현하는 암의 치료용으로서 FDA 승인을 받았다. 개발중인 다른 항ErbB-2 항체로서는 퍼투즈맙(pertuzumab)(모노클로날 2C4로부터 유래)이 있다. ErbB-1(EGF 수용체)의 티로신 키나제 활성의 특이적 억제제도 또한 임상 실험중에 있다.

[0017] 항 ErbB2 항체에 관하여는 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 4,753,894 호; 동 제 5,169,774 호; 동 제 5,677,171 호; 동 제 5,720,937 호; 동 제 5,720,954 호; 동 제 5,725,856 호; 동 제 5,770,195 호; 동 제 5,772,997 호; 동 제 5,783,186 호; 동 제 6,054,561 호; 동 제 6,165,464 호; 동 제 6,333,169 호; 동 제 6,015,567 호; 동 제 6,387,371 호; 동 제 6,399,063 호; 동 제 6,441,143 호; 동 제 6,458,356 호; 동 제 6,627,196 호에 공지되어 있는 바와 같이 당 업계에 공지되어 있다.

[0018] 친수성 중합체인 폴리(에틸렌 글리콜)(약칭 PEG)의 공유 결합은 수용성, 생체 적합성, 혈청 반감기, 치료적 반감기를 증가시키고, 면역원성 및 생물 활성을 조절하며, 다수의 생물 활성 분자 예를 들어, 단백질, 펩티드 및 구체적으로 소수성 분자의 순환 시간을 연장시키는 한 가지 방법이 된다. PEG는 인공 주입물 및 생체 적합성, 무독성 및 무 면역원성이 중요한 부분을 차지하고 있는 기타 분야에서 제약학적으로 광범위하게 사용되어 오고 있다. PEG의 목적 특성을 최대화시키기 위하여, 생물 활성인 분자에 결합되어 있는 PEG 중합체(들)의 총 분자량 및 수화 상태는 PEG 중합체 결합과 통상적으로 관련되어 있는 유리한 특징들 예를 들어, 증가된 수용성 및 혈류 내 반감기를 부여하도록 충분히 커야 하지만, 근원 분자의 생체 활성에 악영향을 미치지는 않아야 한다.

[0019]

PEG 유도체는 종종 반응성 화학 작용기 예를 들어, 리신, 시스테인 및 히스티딘 잔기, N-말단 및 탄수화물 부분을 통하여 생물 활성 분자에 결합된다. 단백질 및 기타 분자들은 종종 중합체를 결합시킬 수 있는 제한된 수의 반응성 위치를 갖는다. 종종 중합체 결합을 통한 변형에 가장 적합한 위치들은 수용체 결합에 있어서 중요한 역할을 하며, 이 위치들은 분자의 생물 활성을 보유하는데 필요하다. 결과적으로, 생물 활성인 분자 상의 이러한 반응성 위치들에 중합체 사슬이 무차별적으로 결합하면 중합체-변형 분자의 생물 활성이 상당히 감소되거나 또는 이러한 활성이 전체적으로 상실되기도 한다[R. Clark 외 다수, (1996), J. Biol. Chem., 271:21969-21977]. 선행 기술에 따른 연구 결과, 표적 분자에 목표로 하는 이점을 부여하는데 충분한 중합체 분자량을 갖는 컨쥬게이트를 형성하기 위하여는 이 분자에 다수의 중합체 팔(arm)을 랜덤하게 결합시킴으로써, 근원 분자의 생물 활성의 감소 또는 전체적인 상실에 대한 위험성을 증가시켜야 한다는 것을 알게 되었다.

[0020]

PEG 유도체의 결합을 위한 위치를 단백질에 형성시키는 반응성 위치들은 단백질 구조에 의해 지정된다. 단백질 예를 들어, 효소는 다양한 알파-아미노산 서열(일반 구조식: $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$)로 이루어져 있다. 하나의 아미노산의 알파 아미노 부분($\text{H}_2\text{N}-$)은 인접한 아미노산의 카복실 부분($-\text{COOH}$)에 결합되어 아미드 결합을 형성하는데, 이때, 상기 아미드 결합은 $-(\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO})_n-$ [여기서, n은 100 또는 1000일 수 있음]으로 표시할 수도 있다. R로 표시되는 단편은 단백질 생물 활성 및 PEG 유도체의 결합을 위한 반응성 위치들을 함유할 수 있다.

[0021]

예를 들어, 아미노산 리신의 경우, 앱실론 위치 및 알파 위치에는 $-\text{NH}_2$ 부분이 존재한다. 앱실론 $-\text{NH}_2$ 는 염기성 pH 조건하에서 반응하기 위하여 유리되어 있다. PEG를 이용하는 단백질 유도체화 분야에 있어서 다수의 선행 기술은 단백질에 존재하는 리신 잔기들의 앱실론 $-\text{NH}_2$ 부분에 결합시키기 위한 PEG 유도체를 개발할 수 있게 하였다. "개선된 PEG화에 대한 폴리에틸렌 글리콜 및 유도체"(Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17)를 참조하시오. 이러한 PEG 유도체는 모두 공통적인 한계를 갖지만, 이러한 유도체는 단백질 표면상에 존재하는 다수의 리신 잔기들과 선택적으로 형성될 수는 없다. 이러한 특징은 예를 들어, 효소 활성 위치에 존재하는 리신 잔기가 단백질 활성에 중요한 경우, 또는 리신 잔기가 수용체 결합 위치의 경우와 같이, 기타 생물 학적 분자와 단백질의 상호 작용을 막개하는 역할을 하는 경우에 상당한 제약이 될 수 있다.

[0022]

현존하는 단백질 PEG화 방법의 두 번째로 중요한 문제점은, PEG 유도체는 원하는 잔기 이외의 잔기와 원하지 않는 부 반응을 진행할 수 있다는 점이다. 히스티딘은 반응성 이미노 부분(구조식: $-\text{N}(\text{H})-$)를 함유하는데, 앱실론 $-\text{NH}_2$ 와 반응하는 다수의 화학 반응성 종들은 $-\text{N}(\text{H})-$ 와 반응할 수도 있다. 이와 유사하게, 아미노산 시스테인의 측쇄는 유리 설프히드릴기(구조식: $-\text{SH}$)을 보유한다. 몇몇 경우, 리신의 앱실론 $-\text{NH}_2$ 기에서 유도된 PEG 유도체는 또한 시스테인, 히스티딘 또는 기타 잔기들과도 반응한다. 이로써 PEG-유도체화 생물 활성 분자의 복잡하고 이중성인 혼합물을 형성할 수 있으며, 표적화된 생물 활성 분자의 활성을 파괴시킬 위험성이 있다. 이후 명확하고 예측 가능한 단백질 표면상의 특이적 위치에서 생물 활성 분자에 하나 이상의 PEG 중합체가 선택적으로 커플링 할 수 있도록 만드는, 단백질내 단일 위치에 화학적 작용기가 도입될 수 있는 PEG 유도체의 개발이 요망되고 있다.

[0023]

리신 잔기 이외에, 당 업계에서는 기타 아미노산 측쇄 예를 들어, 시스테인, 히스티딘 및 N-말단을 표적화하는 활성화된 PEG 시약을 개발하고자 하는 다수의 시도들이 행해지고 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[미국 특허 제 6,610,281 호 및 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17.]을 참조하시오. 시스테인 잔기는 위치-유도성 돌연변이 유발법 및 당 업계에 공지되어 있는 기타 기술을 사용하여 단백질의 구조에 위치-특이적으로 도입될 수 있으며, 그 결과로서 생성된 유리 설프히드릴 부분은 티올-반응성 작용기를 보유하는 PEG 유도체와 반응할 수 있다. 그러나, 이러한 연구 과정은 유리 설프히드릴기의 도입이 결과로 생성되는 단백질의 발현, 폴딩 및 안정성을 얻기 위해 할 수 있다는 점에서 복잡한 과정이라고 할 수 있다. 그러므로, 화학적 작용기를 생물 활성 분자 [하나 이상의 PEG 중합체가 단백질에 선택적으로 커플링될 수 있도록 만들고 동시에 이 단백질에서 통상적으로 발견되는 설프히드릴 및 기타 화학적 작용기와 양립할 수 있는(즉, 바람직하지 않은 부 반응에 관여하지 않는) 생물 활성 분자]에 도입하는 수단을 보유하는 것이 바람직할 것이다.

[0024]

당 업계의 일례에서 살펴볼 수 있는 바와 같이, 단백질의 측쇄 구체적으로, 리신 아미노산 측쇄 상의 $-\text{NH}_2$ 부분 및 시스테인 측쇄상의 $-\text{SH}$ 부분에 부착하도록 개발된 다수의 유도체들은 그것의 합성 및 사용에 있어서 문제가 있는 것으로 밝혀졌다. 일부는 단백질과 불안정한 결합을 형성하여 가수 분해됨으로써 파괴,

분해되거나, 또는 수성 환경(예를 들어, 혈류) 중에서 불안정하게 된다. 일부는 보다 안정한 결합은 형성하지만, 결합이 형성되기 이전에 가수 분해되는데, 이는 곧 PEG 유도체상 반응기가 단백질이 결합하기 이전에 불활성화될 수 있음을 의미한다. 일부는 약간 독성을 띠고 있기 때문에 생체 내에서 사용하기에는 그다지 적당하지 않다. 일부는 반응이 너무 느려서 실질적으로 유용하지 않다. 일부는 단백질 활성에 기여하는 위치들에 결합함으로써 단백질 활성을 상실시킨다. 일부는 그것들이 결합할 위치에 있어서 특이적이지 않아서, 바람직한 활성을 상실시키고, 또한 결과의 재현성을 결여시킬 수 있다. 단백질을 폴리(에틸렌 글리콜) 부분으로 변형시킬 때 초래될 수 있는 문제점들을 극복하기 위해서, PEG 유도체는 보다 안정하거나(예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,602,498 호) 또는 분자 및 표면상의 티올 부분과 선택적으로 반응하도록(예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,610,281 호) 개발되었다. 당 업계에서는 선택적으로 반응하여 안정한 화학 결합을 형성할 때까지 생리적 환경에서 화학적으로 비활성인 PEG 유도체에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0025] 최근들어, 단백질 과학 분야에 있어서 완전히 새로운 기술이 보고된 바 있는데, 이 기술은 단백질의 위치-특이적 변형과 관련된 다수의 한계를 극복할 것으로 기대된다. 구체적으로, 신규의 성분을 원핵 생물인 *에스케리치아 콜라이*(*Escherichia coli*)(이. 콜라이; *E. coli*)[예를 들어, L. Wang와 다수, (2001), *Science* 292:498-500] 및 진핵 생물인 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)(에스. 세레비지애; *S. cerevisiae*)[예를 들어, J. Chin와 다수, *Science* 301 :964-7 (2003)]의 단백질 생합성 기작에 가하는 것인데, 이로써 생체 내에서 단백질 내에 유전적으로 코딩되지 않는 아미노산을 삽입할 수 있게 된다. 새로운 화학적, 물리적 또는 생물학적 특성을 보유하는 다수의 신규 아미노산 예를 들어, 광진화성 표지 및 광이성화 가능한 아미노산, 케토 아미노산 및 당화 아미노산이 앰버 코돈(amber codon) 즉, TAG에 따라서 효과적으로 고도의 신뢰성을 갖고 이. 콜라이 및 효모 내에 있는 단백질 내에 상기와 같은 방식으로 삽입되었다. 예를 들어 문헌[예를 들어, J. W. Chin와 다수, (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *ChemBioChem* 11:1135-1137; J. W. Chin와 다수, (2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024; 및 L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-10]을 참조하시오. 이러한 연구를 통하여, 단백질에서 발견되지 않고, 유전적으로 코딩된 20개의 공통 아미노산에서 발견되는 모든 작용기에 대하여 화학적으로 비활성이며, 효과적이고 선택적으로 반응하여 안정한 공유 결합을 형성하는데에 사용될 수 있는 화학적 작용기 예를 들어, 케톤기, 알kin기 및 아지드 부분이 선택적 및 통상적으로 도입될 수 있음을 알 수 있게 되었다.

[0026] 유전적으로 코딩되지 않는 아미노산을 단백질 내로 삽입시키는 능력에 의하여, 천연 발생 작용기 예를 들어, 리신의 엡실론 -NH₂, 시스테인의 설프히드릴 -SH, 히스티딘의 이미노기에 대한 유용한 대안을 제공할 수 있는 화학적 작용기가 도입될 수 있다. 어떠한 화학적 작용기는 유전적으로 코딩되는 20개의 공통 아미노산에서 발견되는 작용기에 비활성인 것으로 공지되어 있으나, 이러한 작용기는 분명하고 효과적으로 반응하여 안정한 결합을 형성한다. 예를 들어, 아지드 및 아세틸렌 기는 촉매량의 구리가 존재하는 수성 조건하에서 휘스텐 [3 + 2] 고리 첨가 반응을 수행하는 것으로 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Tornoe와 다수, (2002) *Org. Chem.* 67:3057-3064; 및 Rostovtsev와 다수, (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599]을 참조하시오. 예를 들어, 아지드 부분을 단백질 구조에 도입함으로써, 단백질에서 발견되는 아민, 설프히드릴, 카복실산, 히드록실 기에 화학적으로 비활성이되, 아세틸렌 부분과 원활하고 효과적으로 반응하여 고리 첨가 생성물을 생성하기도 하는 작용기를 도입시킬 수도 있다. 중요한 점은 아세틸렌 부분이 존재하지 않을 경우, 기타 단백질 측쇄 존재 및 생리적인 조건하에서 아지드는 화학적으로 비활성이고 무반응성인 상태로 남게 된다는 점이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0027] 본 발명은 다른 무엇보다도, 항원-결합 폴리펩티드 및 이의 단편의 활성 및 생산에 관련된 문제점들, 그리고 개선된 생물학적 또는 약리학적 특성 예를 들어, 개선된 치료 반감기를 보유하는 항원-결합 폴리펩티드의 생산에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

발명의 개요

[0029] 본 발명은 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산(non-naturally encoded amino acid)을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드(ABP)를 제공한다. 몇몇 구체예에서, ABP은 완전한 항체 중쇄를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP

는 완전한 항체 경쇄를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 항체 경쇄의 가변부를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 항체 중쇄의 가변부를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 항체 경쇄의 CDR을 하나 이상 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 항체 중쇄의 CDR을 하나 이상 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 하나 이상의 경쇄 CDR 및 하나 이상의 중쇄 CDR을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 Fab을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 2 이상의 Fab을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 scFv를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 2 이상의 scFv을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 미니바디를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 2 이상의 미니바디를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 다이아바디를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 2 이상의 다이아바디를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 경쇄의 가변부와 중쇄의 가변부를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 완전 경쇄 및 완전 중쇄를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 하나 이상의 Fc 영역 또는 이의 일부를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 상기 구체예들 중 임의의 조합을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 상기 ABP은 전술한 구체예들 중 임의의 것의 동종 이량체, 이종 이량체, 동종 다량체 또는 이종 다량체를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 결합 파트너에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는데, 여기서 상기 결합 파트너는 항원, 폴리펩티드, 핵산 분자, 중합체 또는 기타 분자 또는 물질을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 비 항체 골격 분자 또는 물질과 결합되어 있다.

[0030] 몇몇 구체예에서, ABP는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP는 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, ABP는 이중 작용성 중합체, 이중 작용성 링커 또는 하나 이상의 부가 ABP에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, ABP는 ABP가 아닌 폴리펩티드에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 비 천연 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 하나 이상의 부가적 항원-결합 폴리펩티드(비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함할 수도 있음)에 결합되어 있다.

[0031] 몇몇 구체예에 있어서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 이중 작용성 중합체이다. 몇몇 구체예에서, 이중 작용성 중합체는 제2의 폴리펩티드와 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 제2의 폴리펩티드는 항원-결합 폴리펩티드이다.

[0032] 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 수용성 중합체에 결합되어 있는 2 이상의 아미노산을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 아미노산은 비-천연적으로 코딩된 아미노산이다.

[0033] 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 친화성과 비교하였을 때, 항원에 대한 항원-결합 폴리펩티드의 친화성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 안정성과 비교하였을 때, 항원-결합 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 면역원성과 비교하였을 때, 항원-결합 폴리펩티드의 면역원성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 혈액순환 시간과 비교하였을 때, 항원-결합 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 혈액순환 시간을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

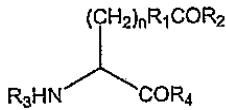
[0034] 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 수용성과 비교하였을 때, 해당 항원-결합 폴리펩티드의 수용성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 가용성과 비교하였을 때, 숙주 세포내 생산되는 항원-결합 폴리펩티드의 가용성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 발현과 비교하였을 때, 시험관 내에서의 합성을 또는 숙주 세포 내 항원-결합 폴리펩티드의 발현율을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 치환, 부가 또는 결실이 존재하지 않는 해당 항원-결합 폴리펩티드의 프로테아제 내성을 비교하였을 때, 항원-결합 폴리펩티드의 프로테아제 내성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0035] 몇몇 구체예에서, ABP 내 아미노산 치환은, 하나 이상의 치환이 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 행하여질 때, 천연 발생 또는 비 천연 발생 아미노산으로 행하여질 수 있다.

[0036] 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아세틸기, 아미노옥시기, 히드라진기, 히드라지드기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킬기를 포함한다.

[0037]

몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다.



[0038]

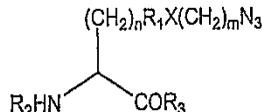
[상기 식 중, n 은 0~10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이며; R_2 는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴이고; R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이며; R_4 는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0040]

몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 아미노옥시기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 히드라지드기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 히드라진기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 세미카바지드기를 포함한다.

[0041]

몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다.

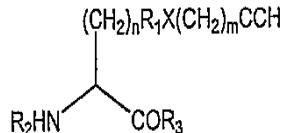


[0042]

[상기 식 중, n 은 0~10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이거나 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나 존재하지 않고; m 은 0~10이며; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이고; R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0044]

몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 알킬기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다.



[0045]

[상기 식 중, n 은 0~10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이며; X는 O, N, S이거나 존재하지 않고; m 은 0~10이며; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이고; R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0047]

몇몇 구체예에서, 폴리펩티드는 작동약, 부분 작동약, 길항제, 부분 길항제 또는 하나 이상의 항원 활성을 갖는 역 작동약이다. 몇몇 구체예에서, 작동약, 부분 작동약, 길항제, 부분 길항제 또는 역 작동약은 수용성 중합체에 결합된 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 작동약, 부분 작동약, 길항제, 부분 길항제 또는 역 작동약은 비-천연적으로 코딩된 아미노산과 하나 이상의 번역 후 변형, 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함한다.

[0048]

본 발명은 또한 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산을 제공하는데, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 선택자 코돈(selector codon) 예를 들어, 서열 18, 20, 22, 25, 27, 29를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 상기 선택자 코돈은 앰버 코돈(amber codon), 오커 코돈(ochre codon), 오펠 코돈(opal codon), 특이 코돈(unique codon), 희귀 코돈(rare codon) 및 4 염기 코돈(four-base codon)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049]

본 발명은 또한 수용성 중합체에 결합된 항원-결합 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 상기 방법은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 분리된 항원-결합 폴리펩티드와, 비-천연적으로 코딩된

아미노산과 반응하는 부분을 포함하는 수용성 중합체를 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 공통 아미노산 중 임의의 것에 대하여 무반응성인 수용성 중합체에 대하여 반응성이다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 공통 아미노산 중 임의의 것에 대하여 무반응성인 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 대하여 반응성이다.

- [0050] 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체에 결합된 항원-결합 폴리펩티드는 카르보닐 함유 아미노산을 포함하는 항원 결합 폴리펩티드와 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 반응시킴으로써 생산된다. 몇몇 구체예에서, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드기는 아미드 결합을 통하여 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 결합되어 있다.
- [0051] 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체에 결합된 항원-결합 폴리펩티드는 카보닐기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 반응시킴으로써 생산된다.
- [0052] 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체에 결합된 항원-결합 폴리펩티드는 알킨-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와 아지드 부분을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 반응시킴으로써 생산된다. 몇몇 구체예에서, 아지드 또는 알킨 기는 아미드 결합을 통하여 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 결합되어 있다.
- [0053] 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체에 결합된 항원-결합 폴리펩티드는 아지드-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와 알킨 부분을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 반응시킴으로써 생산된다. 몇몇 구체예에서, 아지드 또는 알킨 기는 아미드 결합을 통하여 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 결합되어 있다.
- [0054] 몇몇 구체예에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자의 분자량은 약 0.1~약 100 kDa이다. 몇몇 구체예에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자의 분자량은 0.1~50 kDa이다.
- [0055] 몇몇 구체예에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 중합체이다. 몇몇 구체예에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각 분지의 분자량은 1~100 kDa, 또는 1~50 kDa이다.
- [0056] 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 결합된 수용성 중합체는 폴리알킬렌 글리콜 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카보닐기, 아미노옥시기, 히드라지드기, 히드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카보닐 부분을 포함하고, 수용성 중합체는 아미노옥시, 히드라지드, 히드라진 또는 세미카바지드 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 알킨 부분을 포함하며, 수용성 중합체는 아지드 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드 부분을 포함하며, 수용성 중합체는 알킨 부분을 포함한다.
- [0057] 본 발명은 또한 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 몇몇 구체예에 있어서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 결합되어 있다.
- [0058] 본 발명은 또한 선택자 코돈을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 몇몇 구체예에서, 세포는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 항원-결합 폴리펩티드 내로 치환시키기 위한 오르토고날(orthogonal) RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함한다.
- [0059] 본 발명은 또한 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 항원-결합 폴리펩티드의 발현이 가능한 조건 하에서 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 오르토고날 RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함하는 세포를 배양하는 단계; 및 세포 및/또는 배양 배지로부터 항원-결합 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0060] 본 발명은 또한 항원-결합 폴리펩티드의 치료적 반감기, 혈청 반감기 또는 혈액 순환 시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 폴리펩티드의 면역원성을 조절하는 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 천연 발생 항원-결합 폴리펩티드에서 1 이상의 임의의 아미노산을 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환시키고/시키거나 상기 항원-결합 폴리펩티드를 링커, 중합체, 수용성 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 본 발명은 또한 치료가 필요한 환자를 유효량의 본 발명에 따른 항원-결합 폴리펩티드로 치료하는 방법을 제공

한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 환자에게 치료학적 유효량의 약학 조성물(비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용가능한 담체 포함)을 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 결합되어 있다.

[0062] 본 발명은 또한 서열 19, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 31의 서열 및 이의 단편, 또는 임의의 기타 항원-결합 폴리펩티드 서열(단, 하나 이상의 아미노산이 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환됨)을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 결합된다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아미노옥시기, 히드라지드기, 히드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다.

[0063] 본 발명은 또한 약학적으로 허용가능한 담체 및 서열 19, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 31의 서열 및 이의 단편, 또는 기타 항원-결합 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공하는데, 여기서 하나 이상의 아미노산은 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 의하여 치환된다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 당 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체는 당 부분을 통하여 폴리펩티드에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 당 부분을 통하여 항원-결합 폴리펩티드에 결합되어 있다.

[0064] 본 발명은 또한 공유 결합에 의하여 단일 아미노산에 존재하는 항원-결합 폴리펩티드에 결합된 수용성 중합체를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체에 공유 결합된 아미노산은 폴리펩티드내에 존재하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산이다.

[0065] 본 발명은 하나 이상의 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 제공하는데, 여기서 상기 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 폴리펩티드에 리보솜에 의하여 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통하여 폴리펩티드에 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 폴리펩티드는 모노PEG화되어 있다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합되어 있는 링커, 중합체 또는 생물 활성인 분자를 포함하는 ABP 폴리펩티드를 제공하는데, 여기서 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 미리 선택한 위치(pre-selected site)에 리보솜에 의하여 삽입되어 있다.

[0066] 다른 구체예에서, 하나 이상의 비 천연 발생 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드의 다른 분자(예를 들어, PEG)로의 컨쥬게이트화는 비 천연 아미노산으로의 컨쥬게이트화에 이용되는 독특한 화학 반응으로 인하여 실질적으로 정제된 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드의 다른 분자 예를 들어, PEG로의 컨쥬게이트화는, 실질적으로 순수한 항원-결합 폴리펩티드를 제공하는 컨쥬게이트화 단계 이전 또는 이후에 수행된 기타 정제 기술로써 수행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 항체 분자(IgG) 및 이의 항원 결합 부분의 일반적인 구조를 나타내는 모식도이다. 여기서 CDR는 항원 인식 위치내에 포함되어 있다.

도 2는 scFv-108의 주변 세포질(도 2의 패널 A) 및 세포질(도 2의 패널 B) 발현/억제에 사용되는 구조물을 나타내는 것이다. 앰버 종결 코돈의 위치들을 표시하였다. 도 2의 패널 C는 Fab-108 단편의 발현/억제에 사용되는 이중 시스트론 카세트(biscitronic cassette)를 나타내는 것이다. 도 2의 패널 D 및 패널 E는 scFv-4D5 단편의 주변 세포질 발현/억제에 사용되는 구조물을 나타내는 것이다. 도 2의 패널 F는 Fab-4D5 단편의 발현/억제를 위한 시스트론을 나타내는 것이다.

도 3은 GlySer 링커의 두 번째 세린에 있어서의 앰버 돌연변이(S131Am)의 억제(도 3의 패널 A) 및 상응하는 pAcF-함유 scFv의 IMAC 정제 분석 결과(도 3의 패널 B)를 나타내는 것이다.

도 4는 scFv의 세포질 발현 동안 VL 사슬 내 앰버 돌연변이(L156)의 억제 결과를 나타내는 것이다.

도 5의 패널 A는 pAcF-scFv-108 단편의 PEG화 및 이량체화 결과를 나타내는 것이다. 모노-PEG화된 scFv 및 이량체의 위치는 각각 단일 및 이중 화살표 머리로 표시하였다. 도 5의 패널 B는 pAcF-scFv-108 단편-(S136)의 PEG화 결과를 나타내는 것이다. 도 5의 패널 C는 WT scFv의 PEG화가 일어나지 않았음을 나타내는 것이다.

도 6은 scFv-108 동종 이량체의 정제 동안에 취한 분획의 겔 전개 결과를 나타내는 것이다.

도 7의 패널 A~C는 pAcF 또는 pAcF-PEG-함유 scFv 단백질이 EGF 수용체를 발현하는 A431 세포에 결합하였을 때의 결과를 나타내는 것이다.

도 8의 패널 A는 mAb 108의 pAcF-PEG-함유 Fab 단편 및 pAcF의 젤 전개 결과를 나타내는 것이다. 도 8의 패널 B~D는 EGF 수용체를 발현하는 A431 세포에 mAb108의 Fab 단편이 결합한 결과를 나타내는 것이다.

도 9는 본 발명의 이종-이종 작용성 ABP의 일례를 나타내는 것이다.

도 10은 C-말단(도 10의 패널 A) 또는 N-말단(도 10의 패널 B) scFv-4D5 단편 중 GlySer 링커의 두 번째 세린에 있어서의 앰버 돌연변이의 억제를 나타내는 젤 전개 결과이다.

도 11의 패널 A는 환원 및 비 환원 조건 하에서의 pAcF-Fab-4D5-(K139) 및 Fab-4D5-cys의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다. 도 11의 패널 B는 도 11의 패널 A에 나타낸 시료의 웨스턴 븍릿(항His 항체 사용) 결과를 나타내는 것이다.

도 12는 웹티드 T20에 결합된 HIV-1 중화 인간 Fab 4E10을 나타내는 것이다.

도 13은 이량체화 과정의 모식도를 나타내는 것이다.

도 14는 scFv 이량체 형성의 비 환원성(도 14의 패널 A) 및 환원성(도 14의 패널 B) SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다.

도 15는 정제된 scFv 이량체의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 정의

본 발명은 본원에 기술된 특정의 방법, 계획, 세포주, 구조물 및 시약에 제한되지 않고 이것들을 변형시킬 수 있다는 사실을 이해하여야 한다. 본원에 사용된 기술은 특정 구체예만을 기술하기 위한 목적의 것이며, 본 발명의 범위(즉, 첨부된 청구의 범위에 의하여만 제한될 것임)를 제한하고자 하는 것은 아니라는 사실도 이해하여야 한다.

본원 및 첨부된 청구의 범위에 사용된 단수를 나타내는 "하나", "하나의" 및 "상기"란, 내용에서 다른 것이라고 명백히 밝히지 않는 한 복수도 포함하는 의미이다. 그러므로, 예를 들어, "항원-결합 폴리펩티드" 또는 "ABP"를 참고로 하였을 때, 이러한 단백질을 하나 이상 의미하는 것으로서, 여기에는 당업자에게 공지되어 있는 균등물들도 포함하는 것이다(이하 동일함).

달리 정의하지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 업계의 숙련자가 통상적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에 기술된 것과 유사하거나 균등한 임의의 방법, 장치 및 재료는 본 발명을 실시 또는 시험하는데 사용될 수 있으며, 바람직한 방법, 장치 및 재료는 본 상세한 설명에 기술되어 있다.

본원에 언급된 모든 공보 및 특허는 예를 들어, 이러한 공보에 기술되어 있는 구조물 및 방법을 기술 및 개시하기 위한 목적의 참고 문헌으로 본원에 인용되어 있으며, 이러한 구조물 및 방법은 또한 본원에 기술되어 있는 발명과 관련하여 사용될 수 있다. 본원에 기술된 공보들은 본원의 출원일 이전에 개시되어 제공되었다. 본원에 있어서 발명자는 선행 발명에 의한 공개를 위하여 또는 여하의 이유로든 이 공보보다 앞선 날짜로 변경할 권리가 갖지 않음을 자백하는 것으로 추론되지는 않는다.

"실질적으로 정제된"이란 용어는, 재조합 생산된 ABP의 경우에 있어서, 천연 발생 환경 즉, 원래 세포 또는 숙주 세포에서 발견되는 단백질과 상호 작용하거나 또는 이를 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않을 수 있는 ABP를 의미하는 것이다. 세포 물질이 실질적으로 존재하지 않을 수 있는 ABP로서는 오염 단백질이 건조 중량을 기준으로 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만 존재하는 단백질 제제를 포함한다. ABP 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의하여 재조합 생산될 때, 단백질은 세포 건조 중량의 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1% 미만으로 존재할 수 있다. ABP 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의하여 재조합 생산될 때, 단백질은 배양 배지 중에 약 5g/l, 약 4g/l, 약 3g/l, 약 2g/l, 약 1g/l, 약 750mg/l, 약 500mg/l, 약 250mg/l, 약 100mg/l, 약 50mg/l, 약 10mg/l 또는 약 1mg/l 미만의 세포 건조 중량으로 존재할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법에 의하여 생산된 "실질적으로 정제된" ABP의 순도 수준

은 SDS/PAGE 분석법, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기 영동과 같은 적당한 방법으로 측정되는 바와 같이, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상일 수 있으며, 구체적으로 순도 수준은 약 75%, 80%, 85% 이상, 더욱 구체적으로 순도 수준은 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 99% 이상일 수 있다.

[0074] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"란, 삽입에 사용되는 방법 예를 들어, 직접 흡수법, 형질 도입법, f-메이팅(f-mating), 또는 기타 재조합 숙주 세포를 생산하는 당 업계에 공지된 방법에 상관없이, 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 의미하는 것이다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 삽입되지 않는 벡터 예를 들어, 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 또는 숙주 게놈에 삽입될 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 "배지" 또는 "배지들"이란 용어는 임의의 숙주 세포 예를 들어, 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 생물 숙주 세포, 포유 동물 숙주 세포, CHO 세포 또는 이.콜라이 및 세포 내용물을 지지 또는 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반고체 또는 견고한 지지체를 포함한다. 그러므로, 상기 용어는 숙주 세포가 생장한 배지 예를 들어, ABP가 준비된 배지 예를 들어, 증식 단계 이전 또는 이후의 배지를 포함할 수 있다. 상기 용어는 또한 예를 들어, ABP가 세포 내에서 생산되고 숙주 세포는 용해 또는 파괴되어 상기 ABP를 방출시키는 경우, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충액 또는 시약을 포함할 수도 있다.

[0076] 단백질 리폴딩(refolding)과 관련하여 본원에 사용된 "환원제"는 설프히드릴기를 환원된 상태로 유지시키고 분자내 또는 분자간 이황화 결합을 환원시키는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적당한 환원제로서는 디티오트레이톨(DTT), 2-머캅토에탄올, 디티오에리트리톨, 시스테인, 시스테아민(2-아미노에탄티올) 및 환원된 글루타치온을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당업자는 다양한 환원제가 본 발명의 방법 및 조성물에 사용되기에 적당하다는 사실을 용이하게 파악할 수 있다.

[0077] 단백질 리폴딩과 관련하여 본원에 사용된 "산화제"는 산화된 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적당한 산화제로서는 산화된 글루타치온, 시스틴, 시스타민, 산화된 디티오트레이톨, 산화된 에리트레이톨 및 산소를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당업자는 다양한 산화제가 본 발명의 방법에 사용되기에 적당하다는 사실을 용이하게 파악할 수 있다.

[0078] 본원에 사용된 "변성 제제" 또는 "변성제"란, 단백질을 가역적으로 언풀딩(unfolding) 시킬 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 변성 제제 또는 변성제의 강도는 특정 변성 제제 또는 변성제의 특성 및 농도에 의하여 측정될 것이다. 적당한 변성 제제 또는 변성제로서는 무질서 유발 물질(chaotrope), 세제, 유기 용매, 수 혼화성 용매, 인지질일 수 있으며, 또는 이러한 제제들 중 2 이상을 병용할 수도 있다. 적당한 무질서 유발 물질로서는 우레아, 구아닌 및 티오시안화나트륨을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 유용한 세제로서는 강한 세제 예를 들어, 황산 소듐 도데실 또는 폴리옥시에틸렌 에테르(예를 들어, 트윈(Tween) 또는 트리톤(Triton) 세제), 사코실(Sarkocyl), 온화한 비 이온계 세제(예를 들어, 디지토닌), 온화한 양이온계 세제 예를 들어, N->2,3-(디올레이옥시)-프로필-N,N,N-트리메틸암모늄, 온화한 이온계 세제(예를 들어, 소듐 콜레이트 또는 소듐 데옥시콜레이트) 또는 양쪽성 이온계 세제 예를 들어, 설포베타인(쯔비터전트;Zwittergent), 황산 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-1-프로판(CHAPS) 및 셀론산 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-2-히드록시-1-프로판(CHAPSO)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 유기 수혼화성 용매 예를 들어, 아세토니트릴, 저급 알카놀(특히, C₂~C₄ 알카놀 예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올), 또는 저급 알칸디올(특히, C₂~C₄ 알칸디올 예를 들어, 에틸렌-글리콜)도 변성제로서 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 인지질은 천연 발생 인지질 예를 들어, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린 및 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체 또는 변이체 예를 들어, 디헥사노일포스파티딜콜린 또는 디헵타노일포스파티딜콜린일 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 "리풀딩"이란, 이황화 결합과 관련하여 이황화 결합 함유 폴리펩티드가 적당하지 않게 폴딩되거나 또는 폴딩되지 않은 상태에서 원래 형태로 또는 적당히 폴딩된 형태로 변형되는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 의미한다.

[0080] 본원에 사용된 "코폴딩(cofolding)"이란, 구체적으로 서로 상호 작용하여 폴딩되지 않거나 또는 부적당하게 폴딩된 폴리펩티드를 원형 그대로의 적당히 폴딩된 폴리펩티드로 변형시키는 2 이상의 폴리펩티드를 사용하는 리풀딩 과정, 반응 또는 방법을 의미한다.

[0081] 항체는 특이 항원에 대하여 결합 특이성을 나타내는 단백질이다. 원래의 항체는 일반적으로 분자량이 약 150,000 달톤인 이종 사량체 당단백질로서, 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 이루어져 있다.

각각의 경쇄는 하나의 이황화 공유 결합에 의하여 중쇄에 결합되어 있는 반면에, 이황화 결합의 수는 상이한 면역 글로불린 아형(isotype)의 중쇄들 간에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 일정한 간격의 사슬 내에 이황화 결합을 갖는다. 각 중쇄는 한쪽 끝에 가변 영역(V_H)이 존재하며 그에 이어서 다수의 불변 영역이 존재한다. 각 경쇄는 한쪽 끝에 가변 영역(V_L)이 존재하며 다른 쪽 끝에는 불변 영역이 존재하는데; 경쇄의 불변 영역은 중쇄의 첫 번째 불변 영역과 결합되어 있고, 경쇄의 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 결합되어 있다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 영역 사이에 계면을 형성하는 것으로 생각된다.

[0082] "가변"이란 용어는, 가변 영역의 임의의 부분의 서열이 항체들 간에 매우 상이하여 각 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 특이성을 좌우하는 경우를 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 영역을 통하여 부여되는 것은 아니다. 여기서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역 모두에 있어서 상보성 결정 부위(CDR)라고 칭하여지는 3개의 절편으로 초점을 옮겨야 할 것이다. 가변 영역의 보다 많이 보존된 부분을 구조를 부위(FR)라 한다. 원래의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 4개의 FR 부위를 포함하는데, 이 부위는 대부분 β -시트 형태를 띠고 있으며, 3~4개의 CDR로 연결되어 루프 연결 구조를 형성하고, 몇몇 경우에 있어서는 이 β -시트 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬의 CDR는 FR 부위에 의해 함께 근접하여 모아져 있으며, 다른 사슬의 CDR는 항체의 항원 결합 위치 형성에 기여한다[Kabat 외 다수, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)].

[0083] 불변 영역은 항원-항체 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 중쇄 불변부의 아미노산 서열에 따라서, 항체 또는 면역 글로불린은 상이한 부류로 나누어질 수 있다. 여기에는 5개의 면역 글로불린 주 부류가 있으며(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM), 이들 중 몇몇은 추가로 아류(아형) 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 나누어질 수도 있다. 면역 글로불린의 상이한 부류에 대응하는 중쇄 불변부를 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라 칭한다. 다양한 인간 면역 글로불린 부류 중에서, 오로지 인간의 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgM만이 보체를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0084] 생체 내에서, 항체의 친화성 성숙은 보다 높은 친화성을 갖는 항체 변이체(1차적으로 체성 과 돌연변이 유발에 의해 생성됨)의 항원 선택에 의해 촉진된다. "레파토리 이동"은 또한 2차 또는 3차 반응의 우세한 생식 계열 유전자가 1차 또는 2차 반응의 우세한 생식 계열 유전자와 상이한 것으로 나타나는 경우에 발생한다.

[0085] 면역계의 친화성 성숙 과정은 돌연변이를 시험관 내에서 항체 유전자에 도입되고 친화성이 개선된 돌연변이체를 분리하는 친화성 선택법을 사용함으로써 반복될 수 있다. 이러한 돌연변이 항체는 사상 박테리오파지 또는 미생물 예를 들어, 효모의 표면상에 디스플레이될 수 있으며, 항체는 이의 항원에 대한 친화성과 항원으로부터의 해리 동력학(오프-레이트; off-rate)에 의하여 선택될 수 있다[Hawkins 외 다수 J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]. CDR 워킹 돌연변이 유발법(CDR walking mutagenesis)은 인간 면역결핍증 바이러스 제1형(HIV-1)의 인간 외피 당단백 gp120[Barbas III 외 다수 PNAS (USA) 91 : 3809-3813 (1994); 및 Yang 외 다수 J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995)]; 및 항-c-erbB-2 단일 사슬 Fv 단편[Schier 외 다수 J. Mol. Biol. 263:551567 (1996)]에 결합하는 친화성 성숙 인간 항체에 사용된다. 항체 사슬 셔플링 및 CDR 돌연변이 유발법은 HIV의 제3의 고가변성 루프에 대하여 유도된 친화성 성숙 고친화성 인간 항체에 대해 사용되었다[Thompson 외 다수 J. Mol. Biol. 256:77-88 (1996)]. 문헌[Balint and Larrick Gene 137:109-118 (1993)]에는 컴퓨터-원조 올리고데옥시리보뉴클레오티드-유도 주사 돌연변이 유발법에 관하여 기술되어 있는데, 이 방법에 의하여 가변부 유전자의 모든 CDR은 개선된 변이체에 대하여 동시에 그리고 철저하게 검색된다. α ν β 3-특이적 인간화 항체는 초기 제한적 돌연변이 유발 기술을 사용하여 친화성 성숙 되었으며, 이때 상기 기술에서 6개 모두의 CDR 중 모든 위치는 성숙 된 후 친화성이 가장 높은 돌연변이체를 포함하는 조합 라이브러리를 발현시켜 스크리닝한다[Wu 외 다수 PNAS (USA) 95: 6037-6-42 (1998)]. 파지 디스플레이된 항체에 관하여는 문헌[Chiswell and McCafferty TIBTECH 10:80-84 (1992); 및 Rader and Barbas III Current Opinion in Biotech. 8:503-508 (1997)]을 참조하시오. 근원 항체에 비하여 개선된 친화성을 갖는 돌연변이 항체가 상기 참고 문헌에 보고되어 있는 각각의 경우에 있어서, 돌연변이 항체는 CDR에 아미노산 치환이 일어나 있다.

[0086] 본원에 있어서, "친화성 성숙(affinity maturation)"이란, 항체의 항원에 대한 친화성이 강화되는 과정을 의미한다. 친화성 성숙 방법으로서는 컴퓨터에 의한 스크리닝 방법 및 실험적 방법이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0087] 본원에 있어서, "항체"란, 실질적으로 항체 유전자 모두 또는 일부에 의해서 코딩된 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 의미한다. 이러한 면역 글로불린 유전자로서는 카파, 람다, 알파, 감마(IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4), 엘타, 앱실론 및 뮤 불변부 유전자와, 다수의 면역 글로불린 가변부 유전자를 포함하나, 이에 한정되

는 것은 아니다. 본원의 항체는 전장 항체 및 항체 단편을 포함하며, 임의의 유기체에 천연으로 존재하는 항체 또는 조작된 항체(예를 들어, 변이체)를 포함하는 의미이다.

[0088] "항체 단편"이란, 전장 형태 이외에 임의의 형태의 항체를 의미한다. 본원의 항체 단편은 전장 항체 내에 존재하는 작은 성분인 항체와, 조작된 항체를 포함한다. 항체 단편으로서는 Fv, Fc, Fab, 및 (Fab')₂, 단일 사슬 Fv (scFv), 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 이중 작용성 하이브리드 항체, CDR1, CDR2, CDR3, CDR의 조합체, 가변부, 구조를 부위, 불변부 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다[Maynard & Georgiou, 2000, Ann. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402].

[0089] 본원에 있어서 "컴퓨터 스크리닝 방법"이란, 단백질 내에 하나 이상의 돌연변이를 고안하기 위한 임의의 방법을 의미하는데, 여기서 상기 방법은 잠재되어 있는 아미노산 측쇄 치환부 상호 간 및/또는 이 치환부와 단백질의 나머지 부분과의 상호 작용 에너지를 계산하는데 컴퓨터를 이용한다.

[0090] 본원에 있어서 "Fc"란, 면역 글로불린 영역 C_y2 및 C_y3으로 이루어진 항체의 일부분을 의미한다(C_y2 및 C_y3). Fc는 또한 C_y2 및 C_y1 사이의 N-말단 힌지에 존재하는 임의의 잔기를 포함할 수도 있다(C_y1). Fc는 분리된 부위, 또는 항체 또는 항체 단편 내부의 부위를 의미할 수도 있다. Fc는 또한 임의의 변형된 형태의 Fc 예를 들어, 원래의 단량체, 원래의 이량체(이황화 결합된), 변형된 이량체(이황화 및/또는 비 공유 결합된) 및 변형된 단량체(즉, 유도체)를 포함하기도 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0091] 본원에서 "전장 항체"란, 항체 H 및/또는 L 사슬의 생물학적 천연 형태를 포함하는 구조를 의미한다. 대부분의 포유 동물 예를 들어, 인간 및 마우스에 있어서, 이러한 형태는 2개의 면역 글로불린 사슬 중 2개의 동일한 쌍으로 이루어진 사량체로서, 각 쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 보유하며, 각 경쇄는 면역 글로불린 영역인 V_L 및 C_L을 포함하고, 각 중쇄는 면역 글로불린 영역인 V_H, C_y1, C_y2 및 C_y3을 포함한다. 각 쌍에 있어서, 경쇄 및 중쇄 가변부(V_L 및 V_H)는 모두 항원에의 결합에 관여하며, 불변부(C_L, C_y1, C_y2 및 C_y3, 특히, C_y2 및 C_y3)는 항체의 효과기 작용에 관여한다. 몇몇 포유 동물 예를 들어, 낙타 및 라마에 있어서, 전장 항체는 2개의 중쇄로만 이루어져 있는데, 각 중쇄는 면역 글로불린 영역인 V_H, C_y2 및 C_y3을 포함한다.

[0092] 본원에서 "면역 글로불린(Ig)"이란, 실질적으로 면역 글로불린 유전자에 의해 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 의미한다. 면역 글로불린에는 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 면역 글로불린은 다수의 구조적 형태 예를 들어, 전장 항체, 항체 단편 및 각각의 면역 글로불린 영역(예를 들어, V_H, C_y1, C_y2, C_y3, V_L 및 C_L)를 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0093] 본원에서 "면역 글로불린(Ig) 영역"이란, 실질적으로 면역 글로불린 유전자에 의하여 코딩되는 폴리펩티드로 이루어진 단백질 영역을 의미한다. Ig 영역에는 V_H, C_y1, C_y2, C_y3, V_L 및 C_L을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다(도 1).

[0094] 본원에 사용된 "변이체 단백질 서열"이란, 다른 유사한 단백질 서열과 아미노산 상동성 면에서 상이한 하나 이상의 잔기를 보유하는 단백질 서열을 의미한다. 상기 유사한 단백질 서열은 천연의 야생형 단백질 서열 또는 야생형 서열의 다른 변이체일 수 있다. 일반적으로, 출발 서열은 "근원" 서열이라 칭하여 지며, 이는 야생형이거나 또는 변이체 서열일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 바람직한 구체예는 변이체를 생산하기 위한 컴퓨터 분석이 수행될 때 인간화된 근원 서열을 이용할 수 있다.

[0095] 본원에 있어서 항체의 "가변부"란, 도 1에 나타낸 바와 같이, V_H 면역 글로불린 영역, V_L 면역 글로불린 영역 또는 V_H 및 V_L 면역 글로불린 영역으로 이루어진 폴리펩티드(들)를 의미한다(변이체 포함). 가변부는 분리된 폴리펩티드 즉 Fv 단편, scFv 단편, 보다 큰 항체 단편 내부 부위, 또는 전장 항체 또는 비 항체 골격 분자의 내부 부위를 의미할 수 있다.

[0096] 본 발명은 다양한 근원으로부터 얻어진 항체에 응용될 수 있다. 항체는 실질적으로 임의의 유기체 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 낙타, 라마, 단봉 낙타, 원숭이, 특히 포유 동물 및 특히 인간 및 특히 마우스 및 래트로부터 유래된 항체 유전자(들)에 의해 코딩될 수 있다. 하나의 구체예에서, 항체는 트랜스게닉 마우스 또는 기타 동물[Bruggemann & Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458] 또는 선별 방법과 관련된 인간 항체 라이브러리[Griffiths & Duncan, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:102-108]를 사용하여 예를 들어, 환자 또는 개체로부터 얻어진, 완전히 인간의 것일 수 있다. 항체는 임의의 근원으로부터 유래된 것으로서, 예

를 들어, 인공 또는 천연 발생된 것 일 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 조작된 항체 예를 들어, 키메라 항체 및 인간화된 항체[Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402] 또는 조합 라이브러리로부터 유래된 항체(이에 한정되는 것은 아님)를 사용할 수 있다. 뿐만 아니라, 최적화된 항체는 하나 이상의 천연 항체 유전자에 의하여 실질적으로 코딩되는 항체의 조작된 변이체 일 수 있다. 예를 들어, 하나의 구체예에서, 최적화된 항체는 친화성 성숙에 의해 확인된 항체이다.

[0097] 본 발명의 ABP에 있어서, "항원 특이적" 또는 "특이적으로 결합하다"라는 용어는 목적으로 하는 항원 또는 결합 파트너의 하나 이상의 에피토프에 결합되며, 항원의 혼합 군집을 함유하는 시료중 기타 분자를 실질적으로 인지하지 않고 이와 결합하지 않는 ABP를 의미한다.

[0098] 본원에 사용된 "이중특이적(bispecific) ABP" 또는 "다중 특이적(multispecific) ABP"란 용어는, 2 이상의 항원-결합 위치 또는 결합 파트너-결합 위치를 포함하는 ABP를 의미하는데, 여기서 제 1 결합 위치는 제1 항원 또는 에피토프에 대한 친화성을 보유하고, 제 2 결합 위치는 제 1 항원으로부터 멀리 떨어져 있는 제2 항원 또는 에피토프에 대한 친화성을 보유한다.

[0099] 본원에 사용된 "에피토프"란 용어는, ABP에 의하여 인지되는 항원 또는 결합 파트너상의 위치를 의미한다. 만일 항원이 폴리펩티드를 포함하면, 에피토프는 아미노산의 선형 또는 기하학적으로 형성된 서열 또는 형태일 수 있다. 에피토프는 또한 ABP가 항원에 결합하는 임의 형태의 항원 상에 존재하는 임의의 위치일 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 "항원-결합 폴리펩티드" 또는 "ABP"란, 특정 결합 파트너 예를 들어, 항원, ABP 유사체, ABP 아형, ABP 모의체, ABP 단편, 하이브리드 ABP 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 상동체, 당화 패턴 변이체 및 이것들의 돌연변이체에 대한 특이적 결합의 생물 활성을 최소한으로 보유하는 폴리펩티드 및 단백질을 포함하는데, 이때 상기 폴리펩티드 및 단백질은 이들의 생물 활성과 상관없으며, 또한 이들의 합성 또는 제조 방법 예를 들어, 재조합 방법(cDNA, 계놈 DNA, 합성 DNA 또는 핵산의 다른 형태로부터 제조되었는지 여부에 따라서), 시험관 내 방법, 생체 내 방법, 핵산 분자의 미세 주입법, 합성법, 트랜스유전자 방법 및 유전자 활성화 방법과 상관없이, 생물학적 활성을 최소한으로 갖는 폴리펩티드 및 단백질을 포함하는 의미이다. ABP의 구체예로서는 항체 분자, 중쇄, 경쇄, 가변부, CDR, Fab, scFv, 대안적 골격 비 항체 분자, 리간드, 수용체, 웹티드 또는 항원에 결합하는 임의의 아미노산 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0101] "ABP" 또는 "항원-결합 폴리펩티드"란 용어는, 전술한 바와 같은 ABP와, 천연 발생 항체의 하나 이상의 생물 활성을 예를 들어, 항원 결합 이외의 활성(이에 한정되는 것은 아님)을 보유하는 폴리펩티드를 의미한다. 항원 결합 이외의 활성으로서는 Fc와 관련된 하나 이상의 임의의 활성을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0102] 항원 결합 폴리펩티드로서는 약학적으로 허용가능한 염파 전구 약물, 그리고 염의 전구 약물, 다형체, 수화물, 용매 화합물, 생물 활성인 단편, 생물 활성인 변이체 및 천연 발생 인간 ABP의 입체 이성체 및 작동약, 모의체 및 천연 발생 인간 ABP의 길항체 변이체 및 이의 폴리펩티드 융합체를 포함한다. 상기 융합체는 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 둘 다에 부가 아미노산을 포함하며, 이 융합체는 또한 "항원-결합 폴리펩티드"라는 용어에 포함된다. 대표적인 융합체로서는 예를 들어, 메티오닌이 재조합 발현에 의해 생성된 ABP의 N-말단에 결합되어 있는 메티오닐 ABP, 정제용 융합체(폴리히스티딘 또는 친화성 에피토프를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님), 기타의 생물 활성 분자에 ABP를 결합시키기 위한 융합체, 혈청 알부민 결합 웹티드를 보유하는 융합체 및 혈청 단백질 예를 들어, 혈청 알부민을 보유하는 융합체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] "항원" 또는 "결합 파트너"란 용어는, ABP에 의하여 나타내어지는 결합 활성에 대한 표적이 되는 물질을 의미한다. 실질적으로 임의의 물질이 ABP에 대한 항원 또는 결합 파트너가 될 수 있다. 항원 또는 결합 파트너의 예로서는 알파-1 항트립신, 엔지오스타틴, 항용혈 인자, 항체, 아포리포프로테인, 아포프로테인, 심방 나트륨 배설 인자, 심방 나트륨 배설 폴리펩티드, 심방 웹티드, C-X-C 케모카인(예를 들어, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), 칼시토닌, CC 케모카인(예를 들어, 단핵구 화학 유인 단백질-1, 단핵구 화학 유인 단백질-2, 단핵구 화학 유인 단백질-3, 단핵구 염증 단백질-1 알파, 단핵구 염증 단백질-1 베타, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), CD40 리간드, C-키트 리간드, 콜라겐, 군락 촉진 인자(Colony stimulating factor; CSF), 보체 인자 5a, 보체 억제제, 보체 수용체 1, 시토킨(예를 들어, 상피 중성구 활성 웹티드-78, GRO□/MGS, GRO, GRO, MIP-1, MIP-1, MCP-1), 상피 성장 인자(EGF), 조혈 인자("EPO"), 박피 독소 A 및 B, 인자 IX, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 X, 섬유아세포 성장 인자(FGF), 피브리노겐, 피브로넥틴, G-CSF, GM-CSF, 글루코세레бр로시다제(Glucocerebrosidase), 고나도트로핀, 성장 인자, 헤지호그 단백질(Hedgehog proteins)(예를 들어, 소낙, 인디안, 데저트), 혼모글로빈, 간세포 성장 인자(HGF), 히루딘, 인간 혈청 알부민, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 인터페론(예를 들어, IFN- α ,

IFN- β , IFN- γ , 인터루킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 등), 각질 세포 성장 인자(KGF), 락토페린, 백혈병 억제 인자, 루시피라제, 뉴어튜린(Neurturin), 중성구 억제 인자(NIF), 온코스타틴(oncostatin) M, 골 형성 단백질, 부갑상선 호르몬, PD-ECSF, PDGF, 웨티드 호르몬(예를 들어, 인간 성장 호르몬), 플레이오토로핀(Pleiotropin), 단백질 A, 단백질 G, 발열성 외독소 A, B 및 C, 릴렉신(Relaxin), 레닌(Renin), SCF, 가용성 보체 수용체 I, 가용성 I-CAM 1, 가용성 인터루킨 수용체 ((IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), 가용성 TNF 수용체, 소마토메딘(Somatomedin), 소마토스타틴(Somatostatin), 소마토트로핀(Somatotropin), 스트렙토키나제, 슈퍼 항원(Superantigens) 즉, 스타필로코커스 내독소(SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), 과산화 억제 효소, 독성 쇼크 증후군 독소(TSST-1), 티모신 알파 1, 조직 플라스미노겐 활성 인자, 종양 괴사 인자 베타(TNF 베타), 종양 괴사 인자 수용체(TNFR), 종양 괴사 인자-알파 (TNF 알파), 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGEF), 유로키나제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0104] 상기 단백질중 다수는 시판중에 있으며(예를 들어, Sigma Biosciences 2002 카타로그 및 가격 리스트 참조), 해당 단백질 서열 및 유전자, 그리고 통상적으로 이들의 다수의 변이체는 널리 공지되어 있다(예를 들어, Genbank 참조).

[0105] 부가의 항원 또는 결합 파트너로서는 전사 및 발현 활성 인자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 전사 및 발현 활성 인자의 예로서는, 세포 성장, 분화, 조절 등을 조절하는 유전자 및 단백질을 포함한다. 치료 표적이 광범위할 경우, 발현 및 전사 활성 인자는 원핵 생물, 바이러스 및 진핵 생물 예를 들어, 곰팡이, 식물, 및 동물 예를 들어, 포유 동물에서 발견된다. 발현 및 전사 활성 인자는 다수의 기작 예를 들어, 수용체와의 결합, 시그널 전달 캐스케이드의 촉진, 전사 인자의 발현 조절, 프로모터 및 인핸서와의 결합, 프로모터 및 인핸서에 결합하는 단백질과의 결합, DNA의 풀림, 전구-mRNA의 스플라이싱, RNA의 폴리아데닐화 및 RNA의 분해에 의하여 전사를 조절하는 것을 알 수 있을 것이다. 항원 또는 결합 파트너로서는 발현 활성 인자 예를 들어, 시토킨, 염증 분자, 성장 인자, 이의 수용체 및 발암 유전자 생성물 예를 들어, 인터루킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-8 등), 인터페론, FGF, IGF-I, IGF-II, FGF, PDGF, TNF, TGF- α , TGF- β , EGF, KGF, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4/VCAM-1, ICAM-1 /LFA-1, 및 히알루린/CD44; 시그널 전달 분자 및 상응하는 발암 유전자 생성물 예를 들어, Mos, Ras, Raf, 및 Met; 그리고 전사 활성 인자 및 억제 인자 예를 들어, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, 및 스테로이드 호르몬 수용체 예를 들어, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 테스토스테론 수용체, 알도스테론 수용체, LDL 수용체 리간드 및 코르티코스테론을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0106] 백신 단백질은 항원 또는 결합 파트너 예를 들어, 감염성 곰팡이 예를 들어, 아스페릴러스(*Aspergillus*), 칸디다(*Candida*) 종; 박테리아 특히 병인성 박테리아의 대명사인 이.콜라이, 그리고 의학적으로 중요한 박테리아 예를 들어, 스타필로코커스(*Staphylococci*) (예를 들어, 아우레우스(*aureus*)), 또는 스트렙토코커스(*Streptococci*)(예를 들어, 뉴모니아애(*pneumoniae*)); 원생 동물 예를 들어, 포자충류(예를 들어, 플라스모디아(*Plasmodia*)), 리조포드(*rhizopods*)(예를 들어, 엔타모에바(*Entamoeba*)) 및 편모충류(트리파노소마(*Trypanosoma*), 레이쉬마니아(*Leishmania*), 트리코모나(*Trichomonas*), 지아디아(*Giardia*) 등); 바이러스 예를 들어, (+) RNA 바이러스(예를 들어, 폭스바이러스(*Poxviruses*) 예를 들어, 백시니아(*vaccinia*); 피코나바이러스(*Picornaviruses*) 예를 들어, 폴리오(*polio*); 토가바이러스(*Togaviruses*) 예를 들어, 루벨라(*rubella*); 플래비바이러스(*Flaviviruses*) 예를 들어, HCV; 및 코로나바이러스(*Coronaviruses*), (-) RNA 바이러스(예를 들어, 라비도바이러스(*Rhabdoviruses*) 예를 들어, VSV; 파라믹소바이러스(*Paramyxoviruses*) 예를 들어, RSV; 오르소믹소바이러스(*Orthomyxoviruses*), 예를 들어, 인플루엔자(*influenza*); 번야바이러스(*Bunyaviruses*); 및 아레나바이러스(*Arenaviruses*), dsDNA 바이러스(예를 들어, 레오바이러스(*Reoviruses*)), RNA→DNA 바이러스 즉, 레트로바이러스(*Retroviruses*) 예를 들어, HIV 및 HTLV, 그리고 임의의 DNA→RNA 바이러스 예를 들어, 해파티티스 B(*Hepatitis B*)로부터 유래된 단백질 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0107] 항원 또는 결합 파트너로서는 효소 예를 들어, 아미다제, 아미노산 라세미화 효소, 아실화 효소, 탈 할로겐화 효소, 이중 산소 효소, 이중 아릴 프로판 과산화효소, 에피머라제, 에폭시드 하이드롤라제, 에스테르화 효소, 이성화 효소, 키나제, 글루코즈 이성화 효소, 당질 분해 효소, 글리코실 전이효소, 할로 과산화효소, 모노옥시게나제(예를 들어, p450), 리파제, 리그닌 과산화 효소, 니트릴 수산화 효소, 니트릴라제, 프로테아제, 포스파타제, 서브틸리신, 트랜스 아미나제 및 뉴클레아제일 수 있는데, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0108] 농업적으로 관련된 단백질 예를 들어, 곤충 내성 단백질(예를 들어, Cry 단백질), 녹말 및 지질 생산 효소, 식물 및 곤충 독소, 독소-내성 단백질, 미코톡신 해독 단백질, 식물 성장 효소(예를 들어, 리볼로즈 1,5-비스포스페이트 카복실라제/옥시게나제, "RUBISCO"), 리포옥시게나제(LOX) 및 포스포에놀피루베이트(PEP) 카복실라제 또

한 항원 또는 결합 파트너일 수 있다.

[0109] 예를 들어, 항원 또는 결합 파트너는 질환-관련 분자 예를 들어, 종양 표면 항원 예를 들어, B-세포 유전자형, 악성 B 세포상의 CD20, 백혈병 아세포 상의 CD33 및 유방암 HER2/neu 일 수 있다. 대안적으로, 상기 항원 또는 결합 파트너는 성장 인자 수용체일 수 있다. 성장 인자의 예로서는 상피 성장 인자(EGF), 트랜스페린, 인슐린-유사 성장 인자, 변형 성장 인자(TGF), 인터루킨-1 및 인터루킨-2를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, EGF 수용체의 고 발현은 다양한 인간 상피 1차 종양에서 관찰된다. TGF- α 는 암 세포에서 자가 분비 자극 경로를 매개하는 것으로 관찰된다. 몇몇 쥐 모노클로날 항체는 EGF 수용체와 결합할 수 있고, EGF 수용체에 리간드가 결합하는 것을 차단할 수 있으며, 배양액 및 이종 이식편 모델에서 다양한 인간 암 세포주의 증식을 억제할 수 있는 것으로 입증되었다. 문헌[Mendelsohn and Baselga (1995) Antibodies to growth factors and receptors, in Biologic Therapy of Cancer, 2nd Ed., JB Lippincott, Philadelphia, pp 607-623]을 참조하시오. 그러므로, 본 발명의 ABP는 다양한 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0110] 항원 또는 결합 파트너는 또한 관상 동맥 질환과 관련된 세포 표면 단백질 또는 수용체 예를 들어, 혈소판 당단백질 Iib/IIIa 수용체, 자가면역 질환과 관련된 세포 표면 단백질 또는 수용체 예를 들어, CD4, CAMPATH-1 및 그람-음성 박테리아 리포 다당류의 지질 A 부위일 수 있다. CD4에 대해 인간화된 항체가 임상 실험 즉, 균상식 육종 환자(농포성 건선, 중증도 건선 및 류마티스성 관절염 동반)의 치료를 통해 시험되었다. 그람-음성 박테리아 리포 다당류의 지질 A 부위에 대한 항체는 임상 실험(폐혈성 쇼크 치료)에서 시험되었다. CAMPATH-1에 대한 항체는 또한 임상 실험(난치성 류마티스성 관절염 치료)에서 시험되었다. 그러므로, 본 발명의 ABP는 다양한 자가 면역 질환의 치료에 사용될 수 있다. 문헌[Vaswani와 다수 (1998) "Humanized antibodies as potential therapeutic drugs" Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105-115]을 참조하시오.

[0111] 항원 또는 결합 파트너는 또한 인간의 알레르기성 질환과 관련된 단백질 또는 웨티드 예를 들어, 염증 매개 단백질 예를 들어, 인터루킨-1(IL-1), 종양因子 인자(TNF), 루코트리엔 수용체 및 5-리폭시게나제, 그리고 부착 분자 예를 들어, V-CAM/VLA-4일 수도 있다. 뿐만 아니라, IgE도 또한 항원 또는 결합 파트너로 사용될 수 있는데, 그 이유는 IgE가 제 I 형 급성 과민 알레르기 반응 예를 들어, 천식에 있어서 중요한 역할을 하기 때문이다. 연구 결과, 종 혈청 IgE의 수준은 질환 특히 천식의 심각성과 상관되는 경향이 있다는 사실을 알 수 있었다. 문헌[Burrows와 다수 (1989) "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens" New Engl. J. Med. 320:271-277]을 참조하시오. 그러므로, IgE에 대하여 선택된 ABP는, 알레르기성 질환의 치료에 있어서 정상의 면역 기능에 실질적인 영향을 미치지 않고, IgE의 수준을 낮추고 IgE가 비만 세포 및 호염구에 결합하는 것을 차단하는데에 사용될 수 있다.

[0112] 항원 또는 결합 파트너는 또한 숙주의 면역 반응을 촉발하는 항원으로서 사용될 수 있는 바이러스 표면 또는 중심 단백질일 수도 있다. 이러한 바이러스 표면 단백질의 예로서는 당단백질(또는 표면 항원 예를 들어, GP120 및 GP41) 및 캡시드 단백질(또는 구조 단백질 예를 들어, P24 단백질); A, B, C, D 또는 E 형 간염 바이러스의 표면 항원 또는 중심 단백질[예를 들어, B형 간염 바이러스의 B형 간염 소 표면 항원(SHBsAg) 및 C형 바이러스의 중심 단백질, NS3, NS4 및 NS5 항원]; 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV)의 당단백질(G-단백질) 또는 융합 단백질(F-단백질); 헤르페스 심플렉스 바이러스 HSV-1 및 HSV-2의 표면 및 중심 단백질(예를 들어, HSV-2 유래 당단백질 D)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0113] 항원 또는 결합 파트너는 또한 종양-억제 기능을 상실한 돌연변이된 종양 억제 유전자 생산물일 수 있으며, 세포가 암에 보다 영향받기 쉽도록 만들 수도 있다. 종양 억제 유전자는 세포 성장 및 세포 분열 주기를 억제하는 기능을 갖는 유전자이므로, 이는 신생 물질 형성의 진행을 막을 수 있다. 종양 억제 유전자 내부의 돌연변이는 세포가 억제 시그널 네트워크 성분 중 하나 이상을 무시하도록 만들어, 세포 주기 조절 시기(cell cycle check point)를 넘어가게 되며, 그 결과 보다 높은 비율로 세포 성장(암)을 억제하게 된다. 이와 같은 종양 억제 유전자의 예로서는, DPC-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 및 BRCA2를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0114] DPC-4는 췌장암에 관여하는데 즉, 세포 분열을 억제하는 세포질 경로에 참여한다. NF-1은 Ras를 억제하는 단백질 즉, 세포질 억제 단백질을 코딩한다. NF-1은 신경계의 신경 섬유종 및 갈색 세포종과 골수성 백혈병에 관여한다. NF-2는 신경계의 척수 종양, 신경초종 및 상의 세포종에 관여하는 핵 단백질을 코딩한다. RB는 pRB 단백질, 세포 주기의 주요 억제 인자인 핵 단백질을 코딩한다. RB는 망막 아종과, 뼈, 방광, 소세포 폐암 및 유방암에 관여한다. p53은 세포 분열을 조절하고 세포 사멸을 유도할 수 있는 p53 단백질을 코딩한다. p53의 돌연변이 및/또는 불활성화는 다양한 종류의 암에서 관찰된다. WT1은 신장의 월류 종양에 관여한다. BRCA1은 유방암 및 난소암에 관여하고, BRCA2는 유방암에 관여한다. 그러므로, ABP는 종양 개시 및 진행 과정에 있어서, 유전자 산

물과 기타 단백질 또는 생화학 물질과의 상호 작용을 차단하는 데에 사용될 수 있다.

[0115]

항원 또는 결합 파트너는 CD 분자로서, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3 γ, CD3 δ, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 α, CD8 β, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79 α, CD79 β, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD110-113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, CD129, CDw130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, 및 TCR Σ를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 항원 또는 결합 파트너는 VEGF, VEGF 수용체, EGFR, Her2, TNFa, TNFRI 수용체, GPIIb/IIIa, IL-2R 알파 사슬, IL-2R 베타 사슬, RSV F 단백질, 알파4 인테그린, IgE, IgG 수용체, 디곡신, 카펫 바이퍼(carpet viper) 독, 보체 C5, OPGL, CA-125 종양 항원, 스타필로코커스 단백질, 스타필로코커스 상피 단백질, 스타필로코커스 아우레우스 단백질, 스타필로코커스 감염(예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스타필로코커스 에피데미스(*Staphylococcus epidermidis*) 감염)에 관여하는 단백질, IL-6 수용체, CTLA-4, RSV, IL-2 수용체의 Tac 서브유닛, IL-5 및 EpCam일 수 있다. 항원 또는 결합 파트너는 문자의 단편일 수 있다.

[0116]

이중특이적인 ABP의 예로서는, 종양 세포 항원에 대하여 유도된 하나의 ABP와 세포 독성 촉발 분자에 대하여 유도된 다른 ABP를 보유하는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-Fc γ RI/항-CD 15, 항-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD 16), 항-CD3/항-악성 B-세포 (1D10), 항-CD3/항-p185^{HER2}, 항-CD3/항-p97, 항-CD3/항-신장 세포 암종, 항-CD3/항-OVCAR-3, 항-CD3/L-D1 (항-결장 암종), 항-CD3/항-멜라닌 세포 자극 호르몬 유사체, 항-EGF 수용체/항-CD3, 항-CD3/항-CAMA1, 항-CD3/항-CD19, 항-CD3/MoV18, 항-신경 세포 부착 분자 (NCAM)/항-CD3, 항-엽산 결합 단백질 (FBP)/항-CD3, 항-pan 암종 관련 항원 (AMOC-31)/항-CD3; 종양 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 ABP와 독소에 결합하는 다른 ABP를 보유하는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-사포린/항-Id-1, 항-CD22/항-사포린, 항-CD7/항-사포린, 항-CD38/항-사포린, 항-CEA/항-리신 A 사슬, 항-인터페론-α (IFN- α)/항-하이브리도마 유전자형, 항-CEA/항-빈카 알칼로이드; 효소 활성화 전구 약물을 전환시키는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-CD30/항-알칼리성 포스파타제(미토마이신 포스페이트 전구 약물의 미토마이신 알콜로의 전환을 촉진시킴); 섬유소 용해제제로서 사용될 수 있는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-피브린/항-조직 플라스미노겐 활성 인자(tPA), 항-피브린/항-유로키나제형 플라스미노겐 활성 인자(uPA); 면역 복합체를 세포 표면 수용체에 표적화시키는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-저밀도 리포단백(LDL)/항-Fc 수용체(예를 들어, Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII); 감염성 질환의 치료에 사용되는 이중특이적 ABP 예를 들어, 항-CD3/항-헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV), 항-T-세포 수용체:CD3 복합체/항-인플루엔자, 항-Fc γ R/항-HIV; 시험관 내 또는 생체 내 종양 검출을 위한 이중특이적 ABPs 예를 들어, 항-CEA/항-EOTUBE, 항-CEA/항-DPTA, 항-p185^{HER2}/항-헵텐; 백신 애쥬반트로서의 이중특이적 ABP[Fanger, MW외 다수, Crit Rev Immunol. 1992;12(3-4):101-24(본원에 참고용으로 인용됨)]; 및 이중특이적 ABP 진단 도구 예를 들어, 항-토끼 IgG/항-페리틴, 항-호오스 래디쉬 페옥시다제 (HRP)/항-호르몬, 항-소마토스 타틴/항-물질 P, 항-HRP/항-FITC, 항-CEA/항-β-갈락토시다제[Nolan, O et R. O'Kennedy, Biochim Biophys Acta. 1990 Aug 1;1040(1):1-11(본원에 참고용으로 인용됨)]를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 삼중 특이적 ABP의 예로서는 항-CD3/항-CD4/항-CD37, 항-CD3/항-CD5/항-CD37 및 항-CD3/항-CD8/항-CD37을 포함한다.

[0117]

다수의 참고 문헌에는 중합체 컨쥬게이트화 또는 당화에 의하여 폴리펩티드를 변형시키는 것에 관하여 개시되어 있다. "ABP" 또는 "항원-결합 폴리펩티드"란 용어는 중합체 예를 들어, PEG에 컨쥬게이트화된 폴리펩티드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 "ABP" 또는 "항원-결합 폴리펩티드"는 시스테인, 리신, N 또는 C 말단 아미노산 또는 기타 잔기들 중 하나 이상이 부가 유도체화된 것을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, ABP는 링커, 중합체 또는 생물 활성인 분자를 포함할 수도 있는데, 여기서 링커, 중합체 또는 생물 활성인 분자에 컨쥬게이트화된 아미노산은 본 발명에 따른 비 천연 아미노산일 수 있거나, 또는 리신 또는 시스테인과의 커플링

과 같이 당 업계에 공지된 기술을 이용하여 천연 코딩된 아미노산에 컨쥬케이트화 될 수도 있다. 미국 특허 제 4,904,584 호에는 PEG화된 리신 결여 폴리펩티드에 관하여 개시되어 있는데, 여기서 하나 이상의 리신 잔기는 결여되어 있거나 또는 임의의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있다. WO 99/67291에는 단백질을 PEG로 컨쥬케이트화 시키는 방법에 관하여 개시되어 있는데, 여기서 단백질 상에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기는 결실되어 있으며, 단백질은 단백질로의 컨쥬케이트화를 실행하기에 충분한 조건하에서 PEG와 접촉된다. WO 99/03887에는 성장 호르몬 상과에 속하는 폴리펩티드의 PEG화된 변이체에 관하여 개시되어 있는데, 여기서 시스테인 잔기는 폴리펩티드의 특정 부위에 위치하고 있는 불필수 아미노산 잔기로 치환되었다. WO 00/26354에는 상응하는 근원 폴리펩티드에 비하여 알레르기 유발성이 감소된 당화 폴리펩티드 변이체를 제조하는 방법에 관하여 개시되어 있는데, 여기서 상기 변이체는 하나 이상의 부가적 당화 위치를 포함한다.

[0118] "항원-결합 폴리펩티드"란 용어는 또한 당화된 ABP 예를 들어, 임의의 아미노산 위치가 당화된 폴리펩티드, 폴리펩티드의 N-결합 또는 C-결합 당화 형태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 단일의 뉴클레오티드가 변경된 변이체는 또한 ABP의 생물 활성 변이체인 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 스플라이싱 변이체도 포함된다. "항원-결합 폴리펩티드"란 용어는 또한 하나 이상의 임의의 ABP 또는 임의의 기타 폴리펩티드, 단백질, 탄수화물, 중합체, 소분자, 링커, 리간드 또는 기타 생물 활성인 임의의 형태의 분자의 ABP 이종 이량체, 동종 이량체, 이종 다양체 또는 동종 다양체(화학적 수단에 의하여 결합되거나, 또는 융합 단백질로서 발현됨), 그리고 예를 들어, 특이적 결실부 또는 생물 활성을 여전히 유지하고 있는 기타의 변형부를 포함하는 폴리펩티드 유사체를 포함한다.

[0119] 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는 추가로 ABP의 생물 활성을 조절하는 부가, 치환 또는 결실을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 ABP의 하나 이상의 특성 또는 활성 예를 들어, 항원에 대한 친화성의 조절, 항원의 형태적 변화 또는 기타 2차, 3차 또는 4차 구조 변화의 조절(예를 들어, 증가 또는 감소; 이에 한정되는 것은 아님), 항원의 형태적 변화 또는 기타 2차, 3차 또는 4차 구조 변화의 안정화, 항원의 형태적 변화 또는 기타 2차, 3차 또는 4차 구조 변화의 유도 또는 촉진, 혈류 반감기의 조절, 치료적 반감기의 조절, 폴리펩티드의 안정성 조절, 투여량 조절, 방출 또는 생체 적합성 조절, 정제 촉진, 또는 특정 투여 경로의 개선 또는 변경을 조절할 수 있다. 이와 유사하게, 항원-결합 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체-결합 영역(예를 들어, FLAG 또는 폴리-His; 이에 한정되는 것은 아님) 또는 기타 친화성 기반 서열(예를 들어, FLAG, 폴리-His, GST; 이에 한정되는 것은 아님) 또는 폴리펩티드의 검출(예를 들어, GFP; 이에 한정되는 것은 아님), 정제 또는 기타 특성을 개선시키는 결합된 분자(예를 들어, 바이오틴; 이에 한정되는 것은 아님)를 포함할 수 있다.

[0120] "항원-결합 폴리펩티드"란 용어는 또한 예를 들어, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄를 통하여 동일하거나 상이한 비-천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄, 천연 코딩 아미노산 측쇄에 융합체로서 직접 결합되어 있거나, 링커를 통하여 간접적으로 결합되어 있는(이에 한정되는 것은 아님) ABP 동종 이량체, 이종 이량체, 동종 다양체 및 이종 다양체를 포함하는 의미이다. 대표적인 링커로서는 소분자 유기 화합물, 다양한 길이를 갖는 수용성 중합체 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리넥스트란, 또는 다양한 길이의 폴리펩티드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0121] 당업자는 특정 항원-결합 폴리펩티드 서열 내 위치에 상응하는 아미노산 위치는 항원-결합 폴리펩티드 또는 관련 항원-결합 폴리펩티드 등의 단편 내에서 용이하게 확인될 수 있다는 사실을 이해할 것이다. 예를 들어, 서열 정렬 프로그램 예를 들어, BLAST는 관련 서열에 존재하는 위치에 상응하는 단백질내 특정 위치를 정렬 및 확인하는데에 사용될 수 있다.

[0122] "항원-결합 폴리펩티드"라는 용어는, 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드는 하나 이상의 비 천연 아미노산 변형과 함께 하나 이상의 천연 아미노산으로 인한 변형으로 이루어질 수 있다. 천연 발생 ABP 폴리펩티드 내 다양한 아미노산 위치중 대표적인 치환 예를 들어, 항원-결합 폴리펩티드의 생물 활성 중 하나 이상을 조절(예를 들어, 작동약 활성의 증가, 폴리펩티드 가용성의 증가, 폴리펩티드의 길항제으로의 변환 등)하는 치환(이에 한정되는 것은 아님)에 관하여는 이미 개시된 바 있으며, 이는 "ABP"라는 용어에 포함된다.

[0123] "비-천연적으로 코딩된 아미노산"이란, 20개의 공통 아미노산 또는 피롤리신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 의미한다. "비-천연적으로 코딩된 아미노산"이라는 용어와 동의어로서 사용될 수 있는 다른 용어로서는 "비 천연(non-natural) 아미노산", "인공적인(unnatural) 아미노산", "비 천연 발생 아미노산", 그리고 이들의 다양한 외래 및 비 외래 아미노산이 있다. "비-천연적으로 코딩된 아미노산"이란 용어는 또한 천연 코딩

아미노산(예를 들어, 20개의 공통 아미노산 또는 피롤리신 또는 셀레노시스테인; 이에 한정되는 것은 아님)을 변형(예를 들어, 번역 후 변형)하여 생성되되, 그 자체는 천연에서 번역 복합체에 의하여 성장하고 있는 폴리펩티드 사슬에 삽입되지는 않는 아미노산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 비 천연 발생 아미노산으로서는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포티로신을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0124] "아미노 말단 변형 기"란, 폴리펩티드의 아미노 말단에 결합될 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 이와 유사하게, "카르복시 말단 변형 기"란, 폴리펩티드의 카르복시 말단에 결합될 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 말단 변형 기로서는 다양한 수용성 중합체, 펩티드 또는 단백질 예를 들어, 혈청 알부민, 또는 펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 기타 부분을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0125] 당 업계 및 본원에 사용되고 있는 "작용기", "활성 부위", "활성화 기", "이탈 기", "반응 위치", "화학적으로 반응성인 기" 및 "화학적으로 반응성인 부위"란 용어는, 분자의 분명하고, 한정 가능한 부분 또는 단위를 의미한다. 상기 용어들은 화학 업계에서는 어느 정도 유사한 것으로 통하며, 본원에서는 몇몇 기능 또는 활성을 수행하고, 다른 분자들과 반응성인 분자의 부분들을 나타내는 것으로 사용되었다.

[0126] 본원에 사용된 "결합" 또는 "링커"란 용어는, 일반적으로 화학 반응의 결과로서 형성되고, 통상적으로는 공유 결합된 기 또는 결합을 의미한다. 가수 분해에 안정한 결합이란, 예를 들어, 장시간 동안(최대한으로는 영구적으로)의 생리 조건 하에서와 같이, 수중에서 실질적으로 안정하고 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않는 결합을 의미한다. 가수 분해에 불안정하거나 또는 분해 가능한 결합이란, 수중 또는 수용액 중 예를 들어, 혈액 중에서 분해 가능한 결합을 의미한다. 효소에 불안정하거나 또는 분해 가능한 결합이란, 하나 이상의 효소에 의하여 분해될 수 있는 결합을 의미한다. 당 업계에서 통용되고 있는 바와 같이, PEG 및 관련 중합체는 중합체 골격, 또는 중합체 골격 내부 및 중합체 분자의 말단 작용기 중 하나 이상의 사이에 존재하는 링커 기 내부의 분해 가능한 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생물 활성 제제 상에서의 PEG 카르복시산 또는 활성화 PEG 카르복시산과 알콜기의 반응에 의하여 형성된 에스테르 결합은 생리적 조건하에서 가수 분해되어 제제를 방출하게 된다. 기타 가수 분해 가능한 결합으로서는 카보네이트 결합; 아민 및 알데히드의 반응으로 형성된 이민 결합; 알콜과 포스페이트기의 반응에 의하여 형성된 포스페이트 에스테르 결합; 히드라지드와 알데히드의 반응 생성물인 히드라존 결합; 알데히드와 알콜의 반응 생성물인 아세탈 결합; 포르메이트와 알콜의 반응 생성물인 오르토에스테르 결합; 중합체 예를 들어 PEG의 한쪽 말단(이에 한정되는 것은 아님)에 존재하는 아민기, 및 펩티드의 카르복시기에 의하여 형성된 펩티드 결합; 중합체의 말단에 존재하는 포스포라미다이트기 및 올리고뉴클레오티드의 5'-히드록시기에 의하여 형성된 올리고뉴클레오티드 결합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 분지형 링커는 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드에 사용될 수 있다.

[0127] 본원에 사용된 "생물 활성인 분자", "생물 활성인 부위" 또는 "생물 활성 제제"라는 용어는 유기체 예를 들어, 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포손, 프리온, 곤충, 곰팡이, 식물, 동물 및 인간(이에 한정되는 것은 아님)과 관련된 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호 작용중 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 특히, 본원에 사용된 바와 같은, 생물 활성인 분자로서는 인간 또는 기타 동물에 있어서 질환을 진단, 치료, 완화, 처치 또는 예방하기 위한 임의의 물질, 또는 인간이나 동물의 신체적 또는 정신적 건강을 강화시키는 임의의 물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 생물 활성인 분자의 예로서는 펩티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 경질 약물, 연질 약물, 염료, 지질, 뉴클레오시드, 올리고뉴클레오티드, 독소, 세포, 바이러스, 리포좀, 미립자 및 미셀을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적당한 생물 활성 제제의 부류에는 약물, 전구 약물, 방사성 핵종, 영상제, 중합체, 항생제, 살진균제, 항바이러스 제제, 소염제, 항종양 제제, 심혈관 제제, 항불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드 제제, 미생물 유래 독소 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0128] 임의의 구체예에서, 본 발명의 ABP 분자는 생물 활성인 분자 또는 종양 위치에 대하여 검출가능한 표지를 유도하는데에 사용될 수 있다. 이는 종양 사멸, 확인 및/또는 국소화 또는 기타 효과를 촉진시킬 수 있다. 진단 프로브 또는 이미지화 프로브도 또한 본 발명의 ABP 분자에 결합될 수 있다. 특히 바람직한 임의의 구체예에서, ABP의 생물 활성인 분자 성분은 "방사선 불투파성의" 표지 예를 들어, x-선을 사용하여 눈으로 쉽게 파악 가능한 표지이다. 방사선 불투파성 물질은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 가장 일반적으로 사용되는 방사선 불투파성 물질로서는 요드화물, 브롬화물 또는 바륨 염을 포함한다. 기타의 방사선 불투파성 물질도 또한 공지되어 있는데, 그 예로서는 유기 비스무트 유도체(예를 들어, 미국 특허 제 5,939,045 호), 방사선 불투파성 멀티우레탄(예를 들어, 미국 특허 제 5,346,981 호), 오르가노비스무트 복합 재료(예를 들어, 미국 특허 제 5,256,334 호), 방사선 불투파성 바륨 다량 복합체(예를 들어, 미국 특허 제 4,866,132 호) 등을 포함하나, 이에 한정되는

것은 아니다.

[0129] 본 발명의 ABP는 방사선 불투과성 부위에 직접적으로 커플링될 수 있거나, 또는 방사선 불투과성 물질을 보유 또는 함유하는 "팩키지"(예를 들어, 퀼레이트, 리포좀, 다량체 미소비드 등)에 결합 될 수 있다.

[0130] 방사선 불투과성 표지에 더하여, 기타 표지들도 본 발명에 사용하기에 적당하다. 본 발명의 ABP의 생물 활성인 분자 성분으로 사용하기에 적당한 검출 가능 표지로서는 분광기, 광화학적, 생화학적, 면역 화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단으로 검출가능한 임의의 조성물을 포함한다. 본 발명에 유용한 표지로서는 자성 비드(예를 들어, 다이나비드(Dynabeads)(상표명)), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드, 로다민, 그린 형광 단백질 등), 방사성 표지(예를 들어, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^{32}P), 효소(예를 들어, 호오스 래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 기타 ELISA에 통상적으로 사용되는 효소) 및 비색 표지 예를 들어, 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 멀티스티렌, 멀티프로필렌, 라텍스 등) 비드를 포함한다.

[0131] 다수의 바람직한 방사성 표지로서는 ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{113}mIn , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , ^{52}mMn , ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , 및 ^{111}Ag 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0132] 이러한 표지를 검출하는 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 그러므로, 예를 들어, 방사성 표지는 사진 필름, 섬광 검출기 등을 사용하여 검출할 수 있다. 형광 마커는 발광된 조명을 검출하는 광검출기를 사용하여 검출할 수 있다. 효소 표지는 통상적으로 효소에 그의 기질을 공급하여 기질 상 효소의 작용에 의해 생산되는 반응 생성물을 확인함으로써 검출하며, 비색 표지는 착색된 표지를 간단히 눈으로 확인함으로써 검출한다.

[0133] 임의의 특정 구체예에서, 본 발명은 종양 및/또는 기타 암 세포의 검출을 위하여 면역 컨쥬게이트(키메라 부위)를 사용하는 것을 고려한다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 이중특이적 항체는, 감마 카메라로 검출할 경우에는 감마 발광 방사성 동위원소(예를 들어, Na-22, Cr-51, Co-60, Tc-99, I-125, I-131, Cs-137, Ga-67, Mo-99)에, 양전자 방사 단층 촬영(PET) 기구로 검출할 경우에는 양전자 방사 동위원소(예를 들어, C-11, N-13, O-15, F-18 등)에, 그리고 자기 공명 이미지화(MRI)로 검출할 경우에는 금속 콘트라스트 제제(예를 들어, Gd 함유 시약, Eu 함유 시약 등)에 컨쥬게이트화 될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 이중특이적 항체는 통상의 면역 조직 화학 분야(예를 들어, 형광 표지, 나노 결정 표지, 효소 및 비색 표지 등)에 사용될 수 있다.

[0134] 다른 구체예에서, 생물 활성인 분자는 세포 상에서 전리 방사선(예를 들어, ^{60}Co 또는 x-선)에 의해 생성될 수 있는 방사선)의 세포 독성 효과를 강화시키는 방사선 증감제일 수 있다. 다수의 방사선 증감제가 공지되어 있으며, 그 예로서는 벤조포르피린 유도체 화합물(예를 들어, 미국 특허 제 5,945,439 호), 산화1,2,4-벤조트리아진(예를 들어, 미국 특허 제 5,849,738 호), 임의의 디아민을 함유하는 화합물(예를 들어, 미국 특허 제 5,700,825 호), BCNT(예를 들어, 미국 특허 제 5,872,107호), 방사선 증감 니트로벤조산 아미드 유도체(예를 들어, 미국 특허 제 4,474,814 호), 다수의 복소환 유도체(예를 들어, 미국 특허 제 5,064,849 호), 백금 착물(예를 들어, 미국 특허 제 4,921,963 호) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0135] 생물 활성인 분자는 또한 리간드, 에피토프 태그, 웨티드, 단백질 또는 기타 ABP일 수도 있다. 리간드 및 항체는 면역 세포 상의 표면 마커에 결합하는 것일 수 있다. 이러한 항체를 생물 활성인 분자로서 이용하는 키메라 분자는 리간드 또는 ABP에 대한 결합 파트너를 보유하는 면역 세포와 EGFR 군 일원을 발현하는 종양 세포 사이의 결합을 확립하는 이중 작용성 링커로서의 역할을 한다.

[0136] 본원에 기술된 다수의 약물 및/또는 방사성 표지는 특히, 예비-표적화 기술이 사용될 경우 퀼레이트로서 제공될 수 있다. 퀼레이트화 분자는 통상적으로 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP에 부착된 에피토프 태그와 특이적으로 결합하는 분자(예를 들어, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 등)에 커플링된다.

[0137] 퀼레이트화 기는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 임의의 구체예에서, 퀼레이트화 기는 에틸렌 디아민 테트라-아세트산(EDTA), 디에틸렌 트리아민 웬타-아세트산(DTPA), 시클로헥실 1,2-디아민 테트라-아세트산(CDTA), 에틸렌글리콜-0,0'-비스(-2-아미노에틸)-N,N,N',N'-테트라-아세트산(EGTA), N,N-비스(히드록시벤질)-에틸렌디아민-N,N'-디아세트산(HBED), 트리에틸렌 테트라민 혼사-아세트산(TTHA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N'-N",N'"-테트라-아세트산(DOTA), 히드록시에틸디아민 트리아세트산(HEDTA), 1,4,8,11-테트라-아자시클로테트라-

데칸- N,N',N'',N'''-테트라-아세트산(TETA), 치환 DTPA, 치환 EDTA 등으로부터 유래된다.

[0138] 임의의 바람직한 킬레이트화제의 예로서는 비치환 또는 치환 2-이미노티울란 및 2-이미노티아시클로헥산, 특히 2-이미노-4-머캅토메틸티울란 및 SAPS (N-(4-[211At] 아스타토페네틸)숙신이메이트)를 포함한다.

[0139] 킬레이트화제의 하나인 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N,N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이 특히 유리한데, 그 이유는 다수의 진단학적 및 치료학적으로 중요한 금속 예를 들어, 방사성 핵종 및 방사성 표지에 킬레이트화 되는 이것들의 능력 때문이다.

[0140] DOTA 및 단백질 예를 들어, 항체의 컨쥬게이트화 생성물에 관하여는 이미 개시된 바 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,428,156 호에는 DOTA를 항체 및 ABP 단편에 컨쥬게이트화시키는 방법에 관하여 교시되어 있다. 이러한 컨쥬게이트를 제조하기 위하여, DOTA 중 하나의 카르복시산기는 ABP 또는 ABP 단편상의 아민 또는 셀프히드릴 기와 반응할 수 있는 활성 에스테르로 전환되어야 한다. 문헌[Lewis와 다수 (1994) Bioconjugate Chem. 5: 565-576]에는, DOTA의 하나의 카르복시기가 활성 에스테르로 전환되고, 활성화된 DOTA는 ABP와 혼합되며, ABP의 리신 잔기에 있는 엡실론-아미노기를 통하여 DOTA에 ABP가 결합함으로써, DOTA의 하나의 카르복시기를 아미드 부위로 전환시키는, 유사한 방법이 개시되어 있다.

[0141] 대안적으로, 킬레이트화제는 에피토프 태그 또는 이 에피토프 태그가 결합하는 부위에 링커를 통하여 또는 이에 직접적으로 커플링될 수 있다. DOTA 및 바이오틴의 컨쥬게이트에 관하여는 문헌[예를 들어, Su (1995) J. Nucl. Med., 36(5 Suppl): 154P]에 개시되어 있는데, 여기에는 적합한 아미노 측쇄 바이오틴 유도체 예를 들어, DOTA-LC-바이오틴 또는 DOTA-벤질-4-(6-아미노-카프로아미드)-바이오틴을 통하여 바이오틴에 DOTA를 결합시키는 것에 관하여 개시되어 있다. Yau와 다수에 의한 WO 95/15335에는 바이오틴에 컨쥬게이트화 될 수 있는 니트로-벤질-DOTA 화합물의 제조 방법에 관하여 개시되어 있다. 이 방법은 히드록시기를 일시적으로 노출시키는 고리화 반응; 아민의 토실화; 일시적으로 보호된 히드록시기의 탈보호; 탈보호된 히드록시기의 토실화; 및 분자내 토실레이트의 고리화를 포함한다. 문헌[Wu와 다수 (1992) Nucl. Med. Biol., 19(2): 239-244]에는 단백질을 ¹¹¹IN 및 ⁹⁰Y로 방사선 표지화시키기 위한 거대고리 킬레이트화제의 합성에 관하여 개시되어 있다. Wu와 다수는 아비딘 즉, 연구용인 대표 단백질과의 컨쥬게이트의 안정성 및 생분포를 연구하기 위하여 표지된 DOTA-바이오틴 컨쥬게이트를 제조하였다. 이 컨쥬게이트는 시험관 내 생성된 활성화 DOTA 유도체와 반응하는 유리 아미노기를 함유하는 바이오틴 히드라지드를 사용하여 제조되었다.

[0142] 본 발명의 ABP는 생물 활성인 다른 분자 예를 들어, 세포 독성 약물, 독소, 웨პ티드, 단백질, 효소 및 바이러스 (이에 한정되는 것은 아님)에 융합될 수 있다[Chester, (2000) Dis. Markers 16:53-62; Rippmann와 다수 Biochem J. (2000) Biochem J. 349 (Pt. 3):805-812, Kreitman, R.J. (2001) Curr. Pharm. Biotechnol. 2:313-325; Rybak, S. M. (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1:995-1003; van Beusechem, V. W. 외 다수 J. Virol. (2002) 76:2753-2762].

[0143] 유효 세포 독성 제제 또는 페이로드(payload)는 표적 세포(예를 들어, 암 세포; 이에 한정되는 것은 아님) 상에서 우세하게 관찰되는 항원을 표적화하고 이에 결합하는 ABP에 결합할 수 있다. 페이로드 제제는 혈류내에서 안정하거나, 또는 예를 들어, 종양 위치에 존재하는 조건하에서 절단에 영향을 받을 수 있는 결합을 통하여 ABP에 결합된다. 페이로드 제제 예를 들어, 독소는 표적 세포로 운반되어 독소에 좌우되는 기작을 통해 세포 사멸을 개시할 수 있다.

[0144] 이러한 독소의 예로서는 소분자 예를 들어, 곰팡이 유래 칼리키아마이신[Hinman와 다수 (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342] 및 메이탄시노이드[Liu와 다수 (1996) PNAS USA 93:8618-8623, Smith, S. (2001) Curr. Opin. Mol. Ther. 3(2): 198-203], 트리코텐 및 CC1065, 또는 단백질 예를 들어, 리신 A 사슬[Messman와 다수 (2000) Clin. Cancer Res. 6(4):1302-1313], 슈도모나스 외독소[Tur와 다수 (2001) Int'l. J. Mol. Med. 8(5):579-584], 디프테리아 독소[LeMaistre와 다수 (1998) Blood 91(2):399-405] 및 리보좀-불활성화 단백질[Tazzari 외 다수 (2001), J. Immunol. 167:4222-4229]을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 칼리키아마이신 분자가 사용될 수 있다. 상기 항생제 중 칼리키아마이신 군의 일원들은 피코몰 이하의 농도로도 이중 사슬 DNA를 파괴할 수 있다. 칼리키아마이신의 체계화된 유사체도 또한 공지되어 있다. 문헌[Hinman 외 다수, Cancer Research 53: 3336-42 (1993); Lode 외 다수 (1998) Cancer Research 58:2925-28]을 참조하시오. FDA 승인을 얻은 면역독소의 예로서는 마이로타그(Mylotarg)(등록상표)(Wyeth Ayerst), 급성 골수성 백혈병용인 칼리키아마이신-컨쥬게이트화 항-CD33이 있다[Sievers 외 다수 (1999) Blood 93(11):3678-3684; Bernstein (2000) Leukemia 14:474-475]. 유사한 방식으로, 본 발명의 ABP는 독소에 융합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 ABP는 박테리아 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)에 의하여 생산되는 단백질 복

합체인, 보툴리눔 A 신경독소에 융합될 수 있다.

[0145] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 ABP는 하나 이상의 효소 활성 독소 및/또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 독소의 예로서는 디프테리아 독소의 비 결합 활성 단편, 디프테리아 A 사슬, 내독소 A 사슬[슈도모나스 애어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래], 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사신, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPAI, 및 PAP-S), 모모디카 캐란티아(*momordica charantia*) 억제제, 큐신, 크로틴 사파오나리아(*crotin sapaonaria*), 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 리스트릭토인(restrictotein), 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, WO 93/21232를 참조하시오. 특히 바람직한 세포 독소로서는 슈도모나스 외독소(PE), 디프테리아 독소, 리신 및 아브린을 포함한다. 슈도모나스 외독소 및 디프테리아 독소는 널리 공지되어 있다. PE와 같이, 디프테리아 독소(DT)는 ADP-리보실화 신장 인자 2에 의해 단백질 합성을 억제하여 세포를 사멸시킨다. 면역 독소에 관한 부가의 문헌으로서는 다음과 같은 것들을 포함한다: Brinkmann, U.(2000) In Vivo 14:21-28, Niv외 다수 (2001) Curr. Pharm. Biotechnol. 2:19-46, Reiter외 다수 (2001) Adv. Cancer Res. 81:93-124, Kreitman, R. J. (1999) Curr. Opin. Immunol., 11:570-578; Hall (2001) Meth. Mol. Biol. 166:139-154; Kreitman (2001) Curr. Opin. Investig. Drugs 2(9): 1282-1293. 다양한 리간드에 융합된 PE 또는 DT를 코딩하는 유전자의 클로닝 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다[예를 들어, Siegal1외 다수 (1989) FASEB J., 3: 2647-2652; 및 Chaudhary외 다수 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538-4542]. 상기 모든 문헌은 본원에 참고용으로 인용되어 있는 것이다.

[0146] 기타 적당한 생물 활성 분자로서는 약학 제제 또는 다양한 약학 제제를 함유하는 캡슐화 시스템을 포함한다. 그러므로, 키메라 분자의 표적화 분자는 종양에 직접 전달될 약물에 직접 결합할 수 있다. 이러한 약물은 당 업자에게 널리 공지되어 있으며, 그 예로서는 독시루비신, 빈블라스틴, 제니스타인, 안티센스 분자 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0147] 대안적으로, 생물 활성 분자는 치료 조성물 예를 들어, 약물, 해산(예를 들어, 안티센스 해산), 또는 혈류계에 직접적으로 노출되는 것을 차단하는 것이 바람직한 다른 치료 부위를 함유하는 캡슐화 시스템 예를 들어, 바이러스 캡시드, 리포좀, 또는 미셀일 수 있다. 항체에 결합된 리포좀을 제조하는 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 제 4,957,735 호, Connor외 다수 (1985) Pharm. Ther., 28: 341-365]을 참조하시오. 항원 특이성으로 인해서, 본 발명의 ABP는 약물이 로딩된 리포좀을 이것의 표적으로 인도하는데에 사용될 수 있다. 문헌[Park, J. W.외 다수 (2002) Clin. Cancer Res. 8, 1172-1181 및 Shi, N.외 다수 (2001) Pharm. Res. 18, 1091-1095]을 참조하시오.

[0148] 본 발명의 ABP는 분자 예를 들어, PEG에 컨쥬게이트되어 생체 내 전달 및 약물 동력학적 프로필이 개선될 수 있다. Leong외 다수에 따르면, 항IL-8 항체의 Fab' 단편을 위치-특이적으로 PEG화시키면, PEG화되지 않은 형태의 것에 비하여 소멸률이 감소하고, 항원 결합 활성이 거의 상실되지 않는다고 한다[Leong, S. R.외 다수 (2001) Cytokine 16:106-119].

[0149] 본 발명의 ABP는 전구 약물에 결합 될 수 있다. 본원에 사용된 "전구 약물"이란 용어는, 약리학적으로 불활성이거나 활성이 감소된 활성 약물의 유도체를 의미한다. 전구 약물은 약물의 특성 예를 들어, 물리 화학적 특성, 생물 약제학적 특성 또는 약물 동력학적 특성을 조작함으로써 원하는 작용 위치에 도달하는 약물 또는 생물 활성 분자의 양을 조절하도록 고안될 수 있다. 전구 약물은 체내에서 효소 반응 또는 비 효소 반응을 통하여 활성 약물로 전환된다. 전구 약물은 개선된 물리 화학적 특성 예를 들어, 보다 높은 가용성, 강화된 전달 특성 예를 들어, 특정 세포, 조직, 기관 또는 리간드의 특이적 표적화, 및 약물의 개선된 치료적 가치를 제공할 수 있다. 본 발명의 ABP는 전구 약물 활성화를 위해 효소에 융합될 수 있다[Kousparou, C.A.외 다수 (2002) Int. J. Cancer 99, 138-148(2002)]. 재조합 분자는 ABP 및 전구 약물에 작용하여 세포 독소 예를 들어, 시안화물을 방출시키는 효소를 포함할 수 있다.

[0150] 치료제는 전구 약물로서 투여된 후, 웨터딜 화학 요법 제제와 같은 전구 약물을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구 약물-활성화 효소에 의하여 활성화될 수 있다. 예를 들어, WO 88/07378; WO 81/01145; 미국 특허 제 4,975,278 호를 참조하시오. 일반적으로, 효소 성분은 전구 약물을 그 자체보다 더욱 활성이고 세포 독성인 형태로 전환시키는 방식으로 전구 약물에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.

[0151] 유용할 수 있는 효소로서는, 포스페이트-함유 전구 약물을 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제, 황산염 함유 전구 약물을 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 아릴설파타제; 비 독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인, 5-플루오로우라실로 전환 시키는데 유용한 시토신 디아미나제 ; 웨터드 함유 전구 약물을 유리 약

물로 전환 시키는데 유용한 프로테아제 예를 들어, 세라티아 프로테아제, 터모리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신(예를 들어, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구 약물을 전환 시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 당화된 전구 약물을 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 탄수화물 결단 효소 예를 들어, β -갈락토시다제 및 뉴라미다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 β -락타마제; 및 아미노 질소에서 폐녹시아세틸 또는 폐닐아세틸 기로 유도체화된 약물을 각각 유리 약물로 전환 시키는데 유용한 폐니실린 아미다제 예를 들어, 폐니실린 V 아미다제 또는 폐니실린 G 아미다제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0152] 대안적으로, 당 업계에 "항체 효소(abzyme)"라고도 알려져 있는 효소 활성을 갖는 항체는 본 발명의 전구 약물을 유리 활성 약물로 전환시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Massey, (1987) 328:457-48]을 참조하시오.

[0153] 당업자는 본 발명의 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP와 생물 활성 분자 부위는 통상적으로 임의의 순서로 결합할 수 있다는 사실을 이해할 것이다. 그러므로, 예를 들어, 표적 분자가 단일 사슬 단백질인 경우 생물 활성 분자는 이 표적 분자의 아미노 말단 또는 카르복시 말단 중 어느 하나에 결합할 수 있다. 생물 활성 분자는 또한 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP의 내부 부위에 결합할 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다. 이와 유사하게, 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP는 생물 활성 분자의 내부 위치 또는 말단부에 결합할 수 있다. 임의의 경우에 있어서, 결합 지점은 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP 또는 생물 활성 분자의 각각의 활성을 방해하지 않도록 선택한다.

[0154] 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP 및 생물 활성 분자는 당 업자에게 널리 공지되어 있는 다수의 방법들 중 임의의 방법에 의하여 결합될 수 있다. 통상적으로 생물 활성 분자는 이중특이적 ABP에 직접적으로 또는 링커(스페이서)를 통하여 간접적으로 컨쥬게이트화된다. 그러나, 생물 활성 분자 및 이중특이적 ABP 둘 다가 모두 폴리펩티드일 경우, 단일 사슬 융합 단백질로서 키메라 분자를 재조합적으로 발현하는 것이 바람직할 수 있다.

[0155] 하나의 구체예에서, 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP는 생물 활성 분자(예를 들어, 세포 독소, 표지, 리간드, 약물, ABP, 리포좀 등)에 화학적으로 컨쥬게이트화 된다. 화학적으로 분자를 컨쥬게이트화시키는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0156] 제제를 ABP 또는 기타 폴리펩티드 표적화 분자에 결합시키는 방법은 제제의 화학 구조에 따라서 다양할 것이다. 폴리펩티드는 통상적으로 다수의 작용기 예를 들어, 카르복시산(COOH) 또는 유리 아민($-\text{NH}_2$) 기를 함유하며, 이 작용기들은 생물 활성 분자 상에 있는 적당한 작용기와 반응하여 생물 활성 분자를 폴리펩티드에 결합시키기에 적당하다.

[0157] 대안적으로, 이중특이적 ABP 및/또는 생물 활성 분자는 유도체화되어 부가의 반응성 작용기를 노출 또는 결합시킬 수 있다. 유도체화는 다수의 링커 분자 예를 들어, 피어스 케미칼 컴퍼니(Rockford, III)에서 시판되는 것 중 임의의 것을 부착시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0158] 몇몇 경우에 있어서, 키메라 부위가 표적 위치에 도달하였을 때, 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP로부터 생물 활성 분자를 유리시키거나, 전구 약물을 활성화시키는 것이 바람직할 수 있다. 그러므로, 표적 위치의 근방에서 결단 가능한 결합을 포함하는 키메라 컨쥬게이트는 표적 위치에 생물 활성 분자가 방출될 때 사용될 수 있다. ABP로부터 제제를 방출시키는 결합의 결단 과정은 효소 활성 또는 면역 컨쥬게이트가 표적 세포 내부 또는 표적 세포 근방에서 작용을 받는 조건에 의하여 촉진될 수 있다. 표적 위치가 종양일 때, 종양 위치에 존재하는 환경(예를 들어, 종양 관련 효소 또는 산성 pH에 노출될 때)에서 결단 가능한 링커가 사용될 수 있다.

[0159] 다수의 상이한 결단 가능 링커가 당 업자에게 공지되어 있다. 미국 특허 제 4,618,492 호; 동 제 4,542,225 호 및 동 제 4,625,014 호를 참조하시오. 이러한 링커기로부터 제제가 방출되는 기작은 예를 들어, 광분해성 결합으로의 조사(irradiation) 및 산 촉매화 가수 분해를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제 4,671,958 호에는 환자의 보체 시스템의 단백질 분해 효소에 의하여 생체 내 표적 위치에서 결단되는 링커를 포함하는 면역 컨쥬게이트에 관하여 기술되어 있다. 이 링커의 길이는 ABP 및 이에 결합되어 있는 분자 사이의 바람직한 공간 관계에 따라서 예정되거나 또는 선택될 수 있다. 다수의 방사성 진단 화합물, 방사성 치료 화합물, 약물, 독소 및 기타 제제가 항체에 결합한다고 보고된 바 있는 다수의 방법을 고려하여, 당업자는 소정의 제제를 ABP 또는 기타 폴리펩티드에 결합시키는 적당한 방법을 결정할 수 있을 것이다.

[0160] 임의의 구체예에서, 생물 활성 분자는 ABP 또는 에피토프 태그에 결합되는 킬레이트를 포함한다. 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP는 해당 에피토프 태그 또는 ABP를 보유하므로, 단순히 이중특이적 및/또는 다중 특이적

ABP가 칼레이트에 접촉하게 되더라도 생물 활성 분자에 ABP가 결합하게 된다. 이러한 부위가 사용된 이후에 조합적 단계(예비 표적화 기술)가 수행될 수 있으며, 또는 표적 조직은 칼레이트가 전달되기 이전에 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP에 결합될 수 있다. 다양한 표적화 부위에 커플링시키기에 적당한 칼레이트의 제조 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다[예를 들어, 미국 특허 제 6,190,923 호, 6,187,285, 동 제 6,183,721, 동 제 6,177,562, 동 제 6,159,445 호, 동 제 6,153,775 호, 동 제 6,149,890 호, 동 제 6,143,276 호, 동 제 6,143,274 호, 동 제 6,139,819 호, 동 제 6,132,764 호, 동 제 6,123,923 호, 동 제 6,123,921 호, 동 제 6,120,768 호, 동 제 6,120,751 호, 동 제 6,117,412 호, 동 제 6,106,866 호, 동 제 6,096,290 호, 동 제 6,093,382 호, 동 제 6,090,800 호, 동 제 6,090,408 호, 동 제 6,088,613 호, 동 제 6,077,499 호, 동 제 6,075,010 호, 동 제 6,071,494 호, 동 제 6,071,490 호, 동 제 6,060,040 호, 동 제 6,056,939 호, 동 제 6,051,207 호, 동 제 6,048,979 호, 동 제 6,045,821 호, 동 제 6,045,775 호, 동 제 6,030,840 호, 동 제 6,028,066 호, 동 제 6,022,966 호, 동 제 6,022,523 호, 동 제 6,022,522 호, 동 제 6,017,522 호, 동 제 6,015,897 호, 동 제 6,010,682 호, 동 제 6,004,533 호, 동 제 및 6,001,329].

[0161]

이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP 및/또는 생물 활성 분자 둘 다가 단일 사슬 단백질이고 비교적 길이가 짧은 경우(즉, 약 50 아미노산 미만인 경우), 이들은 표준 화학적 웨티드 합성 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 상기 양 성분이 비교적 짧은 경우, 키메라 부위는 단일의 인접 폴리펩티드로서 합성될 수 있다. 대안적으로, 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP 및 생물 활성 분자는 독립적으로 합성된 후, 하나의 분자의 아미노 말단과 다른 분자의 카르복시 말단을 축합함으로써 융합되며, 그 결과 웨티드 결합이 형성될 수 있다. 대안적으로, 이중특이적 및/또는 다중 특이적 ABP 및 생물 활성 분자는 각각 웨티드 스페이서 분자의 한쪽 말단과 축합되어 그 결과, 인접 융합 단백질을 형성할 수 있다.

[0162]

서열의 C-말단 아미노산이 불용성 지지체에 결합되어 있으며, 그 다음 서열내 잔류하는 아미노산을 연속적으로 부가하는 고상 합성법은 본 발명의 폴리펩티드의 화학적 합성법으로서 바람직한 방법이다. 고상 합성 기술에 관하여는 문헌[Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield 외 다수 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), 및 Stewart 외 다수, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, III. (1984)]에 기술되어 있다.

[0163]

"이중 작용성 중합체"란, 다른 부위(예를 들어, 아미노산 측기; 이에 한정되는 것은 아님)와 특이적으로 반응하여 공유 또는 비 공유 결합을 형성할 수 있는 2개의 분명한 작용기를 포함하는 중합체를 의미한다. 특정 생물 활성 성분상의 기와 반응하는 하나의 작용기와, 제 2의 생물 성분상의 기와 반응하는 또 다른 작용기를 보유하는 이중 작용성 링커는 제1 생물 활성 성분, 이중 작용성 링커 및 제2 생물 활성 성분을 포함하는 커뮤게이트를 형성하는데 사용될 수 있다. 다양한 화합물의 웨티드로의 결합을 위한 다수의 방법 및 링커 분자는 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[유럽 특허 출원 제 188,256 호; 미국 특허 제 4,671,958 호, 동 제 4,659,839 호, 동 제 4,414,148 호, 동 제 4,699,784 호; 동 제 4,680,338 호; 동 제 4,569,789 호; 및 동 제 4,589,071 호]을 참조하시오. "이중 작용성 중합체"란, 다른 부위(예를 들어, 아미노산 측기; 이에 한정되는 것은 아님)와 특이적으로 반응하여, 공유 또는 비 공유 결합을 형성할 수 있는 2 이상의 분명한 작용기를 포함하는 중합체를 의미한다. 이중 작용성 중합체 또는 이중 작용성 중합체는 임의의 바람직한 분자 길이 또는 분자량을 가질 수 있으며, ABP에 결합되어 있는 분자들 상호 간의 형태 또는 바람직한 공간을 형성하도록 선택될 수 있다.

[0164]

치환기가 그것의 통상적인 화학식에 의하여 특정(좌→우로 기재)되는 경우, 이 치환기는 구조를 우→좌로 기재한 화학적으로 동일한 치환기(예를 들어, 구조식 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 는 구조식 $-\text{OCH}_2-$ 와 균등한 것임)를 포함한다.

[0165]

"치환기"란 용어는 "방해하지 않는 치환기(non-interfering substituent)"를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "방해하지 않는 치환기"란, 안정한 화합물을 생성하는 기이다. 방해하지 않는 치환기 또는 라디칼로서 적당한 것은 할로, C_1-C_{10} 알킬, C_2-C_{10} 알케닐, C_2-C_{10} 알키닐, C_1-C_{10} 알콕시, C_1-C_{12} 아릴킬, C_1-C_{12} 알카릴, C_3-C_{12} 시클로알킬, C_3-C_{12} 시클로알케닐, 페닐, 치환 페닐, 톨루오일, 자일레닐, 비페닐, C_2-C_{12} 알콕시알킬, C_2-C_{12} 알콕시아릴, C_7-C_{12} 아릴옥시알킬, C_7-C_{12} 옥시아릴, C_1-C_6 알킬설피닐, C_1-C_{10} 알킬설포닐, $-(\text{CH}_2)_m-0--(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ 알킬) [식중, m 은 1~8임], 아릴, 치환 아릴, 치환 알콕시, 플루오로알킬, 복소환 라디칼, 치환 복소환 라디칼, 니트로알킬, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NRC(O)}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ 알킬), $-\text{C(O)}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ 알킬), C_2-C_{10} 알킬 티오알킬, $-\text{C(O)}\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ 알킬), $-\text{OH}$, $-\text{SO}_2$, $=\text{S}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NR}_2$, 카보닐, $-\text{C(O)}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ 알킬)- CF_3 , $-\text{C(O)}-\text{CF}_3$, $-\text{C(O)}\text{NR}_2$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})\text{S}-$

(C₆-C₁₀ 아릴), -C(O)-(C₁-C₁₀ 아릴), -(CH₂)_m-O-(-(CH₂)_m-O-(C₁-C₁₀ 알킬) [식중, 각각의 m은 1~8임], -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, 이들의 염 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 사용된 각각의 R은 H, 알킬 또는 치환 알킬, 아릴 또는 치환 아릴, 아랄킬 또는 알카릴이다.

[0166] "할로겐"이란 용어에는 플루오르, 염소, 요드 및 브롬을 포함한다.

[0167] 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서 사용된 "알킬"이란 용어는 달리 언급이 없는 한, 직쇄 또는 분지쇄, 또는 고리형 탄화 수소 라디칼, 또는 이들의 조합체를 의미하는 것으로서, 이는 완전 포화, 단일 불포화 또는 고도 불포화될 수 있으며, 지정된 수의 탄소 원자(즉, C₁-C₁₀이란, 1~10개의 탄소를 의미함)를 보유하는 이가 및 다가 라디칼을 포함할 수 있다. 포화 탄화 수소 라디칼의 예로서는 기 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 예를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 상동체 및 이성체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 불포화 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 보유하는 기이다. 불포화 알킬기의 예로서는, 비닐, 2-프로페닐, 크로тил, 2-이소펜틸, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 상동체 및 이성체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 언급이 없는 한, "알킬"이란 용어는, 이하에 보다 상세히 정의되어 있는 알킬의 유도체 예를 들어, "헤테로알킬"을 포함하는 의미이다. 탄화 수소기에 한정된 알킬기를 "호모알킬"이라 칭한다.

[0168] 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서 사용된 "알킬렌"이란 용어는, 알칸(예를 들어, 구조식 -CH₂CH₂- 및 -CH₂CH₂CH₂CH₂-; 이에 한정되는 것은 아님)으로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하며, 추가로는 이하에 "헤테로알킬렌"이라 기술된 라디칼을 포함한다. 통상적으로, 알킬(또는 알킬렌)기는 1~24개의 탄소 원자를 보유하며, 본 발명에 있어서는 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 것이 바람직할 것이다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는, 보다 짧은 사슬의 알킬 또는 알킬렌 기이다.

[0169] "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)라는 용어는 통상적인 의미로 사용되는 것으로서, 각각 산소 원자, 아미노기 또는 황 원자를 통하여 분자의 나머지 부분에 결합된 알킬기를 의미한다.

[0170] 단독으로 또는 다른 용어와 함께 사용된 "헤테로알킬"이란 용어는 달리 언급이 없는 한, 안정한 직쇄 또는 분지쇄, 또는 고리형 탄화수소 라디칼, 또는 이들의 조합체를 의미하며, 특정 수의 탄소 원자와 O, N, Si 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이종 원자로 이루어져 있으며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 이종 원자는 임의로 사분화(quaternized)될 수도 있다. 이종 원자 O, N 및 S 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치 또는 알킬기가 분자의 나머지 부분에 부착되어 있는 위치에 존재할 수 있다. 그 예로서는 -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂, -S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, 및 -CH=CH-N(CH₃)-CH₃를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 2개 이하의 이종 원자는 연속으로 존재할 수 있는데, -CH₂-NH-OCH₃ 및 -CH₂-O-Si(CH₃)₃가 그 예이다. 이와 유사하게, 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "헤테로알킬렌"이란 용어는, 헤테로알킬로부터 유래된 이가 라디칼을 의미하는 것으로서, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- 및 -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-가 그 예이다(이에 한정되는 것은 아님). 헤테로알킬렌기에 있어서, 동일하거나 상이한 이종 원자는 또한 사슬 말단의 어느 한쪽 또는 양쪽 모두에 존재할 수도 있다(예를 들어, 알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 아미노옥시알킬렌 등; 이에 한정되는 것은 아님). 뿐만 아니라, 알킬렌과 헤테로알킬렌 결합기에 있어서, 상기 결합기의 방향은 결합기의 화학식에 기재된 방향에 의하여 추론될 수 없다. 예를 들어, 화학식 -C(O)₂R'-는 -C(O)₂R'-와 -R'C(O)₂- 모두를 나타내는 것이다.

[0171] 단독으로 또는 다른 용어와 함께 사용된 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"이란 용어는, 달리 언급이 없는 한, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 고리형 형태를 나타내는 것이다. 그러므로, 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬에는 포화 및 불포화 고리 결합을 포함한다. 뿐만 아니라, 헤테로시클로알킬에 있어서, 이종 원자는 복소환 이 분자의 나머지 부분에 결합되어 있는 위치에 존재할 수 있다. 시클로알킬의 예로서는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 헤테로시클로알킬의 예로서는 1-(1,2,5,6-테트라하이드로페리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모폴리닐, 3-모폴리닐, 테트라하이드로푸란-2-일, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가로, 상기 용어는 이환 및 삼환 고리

구조를 포함한다. 이와 유사하게, 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "헵테로시클로알킬렌"이라는 용어는, 헵테로시클로알킬로부터 유래된 이가 라디칼을 의미하며, 단독으로 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "시클로알킬렌"이라는 용어는 시클로알킬로부터 유래된 이가 라디칼을 의미한다.

[0172] 본원에 사용된 바와 같이, "수용성 중합체"란 용어는 수성 용매 중에서 가용성인 임의의 중합체를 의미한다. 수용성 중합체가 ABP에 결합함으로써 변화 예를 들어, 변형되지 않은 형태의 것보다 증가 또는 조절된 혈청 반감기, 또는 증가 또는 조절된 치료 반감기, 조절된 면역원성, 조절된 물리적 결합 특성 예를 들어, 응집 및 다양체 형성, 변형된 수용체 결합 및 변형된 수용체의 이량체화 또는 다량체화를 얻을 수 있다. 상기 수용성 중합체는 그 자체의 생물 활성을 보유할 수 있거나 또는 보유할 수 없으며, 다른 물질 예를 들어, 하나 이상의 ABP, 또는 하나 이상의 생물 활성 분자(이에 한정되는 것은 아님)에 ABP를 결합시키는 령커로서 사용될 수 있다. 적당한 중합체로서는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 모노 C1-C10 알콕시 또는 이의 아릴옥시 유도체(미국 특허 제 5,252,714 호; 본원에 참고용으로 인용됨), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말산 무수물, N-(2-히드록시프로필)-메타크릴아미드, 엑스트란, 엑스트란 유도체 예를 들어, 황산 엑스트란, 폴리프로필렌 글리콜, 산화폴리프로필렌/산화에틸렌 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 다당류, 올리고당, 글리칸, 셀룰로즈 및 셀룰로즈 유도체 예를 들어, 메타셀룰로즈 및 카르복시메틸 셀룰로즈, 전분 및 전분 유도체, 폴리펩티드, 폴리알킬렌 글리콜 및 이의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜 및 이의 유도체의 공중합체, 폴리비닐 에틸 에테르, 및 알파-베타-폴리[(2-히드록시에틸)-DL-아스파타미드 등과 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 수용성 중합체의 예로서는 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0173] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리알킬렌 글리콜" 또는 "폴리(알킬렌 글리콜)"이란 용어는 폴리에틸렌 글리콜(폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜 및 이의 유도체를 의미한다. "폴리알킬렌 글리콜"이란 용어는, 직쇄 및 분지형 중합체 둘 다를 포함하며 이의 평균 분자량은 0.1~100 kDa이다. 기타의 대표적인 구체예로서는 예를 들어, 상업적 공급자의 카탈로그 예를 들어, 쉐어워터 코포레이션의 카탈로그 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications(2001)"에 나열되어 있는 것들이 있다.

[0174] 달리 언급이 없는 한, "아릴"이란 용어는, 공유적으로 결합되거나 또는 융합된 단일 고리 또는 다수 고리(바람직하게는 1~3개의 고리)일 수 있는 고도 불포화 방향족 탄화수소 치환기를 의미한다. "헵테로아릴"이란 용어는, N, O 및 S로부터 선택된 1~4개의 이종 원자를 함유하는 아릴기(또는 아릴 고리)를 의미하며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 임의로 산화되며, 상기 질소 원자(들)는 임의로 사분화된다. 헵테로아릴기는 이종 원자를 통하여 분자의 나머지 부분에 결합될 수 있다. 아릴 및 헵테로아릴의 비제한적인 예로서는, 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-페롤릴, 2-페롤릴, 3-페롤릴, 3-페라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 퍼라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-페리딜, 3-페리딜, 4-페리딜, 2-페리미딜, 4-페리미딜, 5-벤조티아졸릴, 푸리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 상기 나열된 아릴 및 헵테로아릴 고리계 각각에 대한 치환기는 이하 기술된 적당한 치환기 군으로부터 선택되는 것이다.

[0175] 간단하게, "아릴"이라는 용어는, 다른 용어와 함께 사용될 경우(예를 들어, 아릴옥시, 아릴알킬; 이에 한정되는 것은 아님), 전술한 바와 같은 아릴 및 헵테로아릴 고리 둘 다를 포함한다. 그러므로, "아릴알킬"이라는 용어는 아릴기가 알킬기(예를 들어, 벤질, 펜에틸, 퍼리딜메틸 등)에 결합되어 있는 라디칼들을 포함하는 의미로서, 탄소 원자(예를 들어, 메틸렌기의 탄소 원자; 이에 한정되는 것은 아님)가 예를 들어, 산소 원자로 치환된 알킬기를 포함한다[예를 들어, 페녹시메틸, 2-페리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등; 이에 한정되는 것은 아님].

[0176] 상기 용어들(예를 들어, "알킬", "헵테로알킬", "아릴" 및 "헵테로아릴")은 각각 동일한 라디칼의 치환 및 비치환 형태를 포함하는 의미이다. 라디칼의 각 유형에 대한 대표적인 치환기를 이하에 제공하였다.

[0177] 알킬 및 헵테로알킬 라디칼에 대한 치환기(예를 들어, 종종 알킬렌, 알케닐, 헵테로알킬렌, 헵테로알케닐, 알카닐, 시클로알킬, 헵테로시클로알킬, 시클로알케닐 및 헵테로시클로알케닐이라고 칭하여 지는 기들)는 -OR', =O, =NR', =N-OR', =NR'R', -SR', - 할로겐, -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 및 -NO₂로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 다양한 기[그 수는 0 ~ (2^m'

+ 1)로서, 여기서 m'는 상기 라디칼 내 탄소 원자의 총수임]일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. R', R'', R''' 및 R'''' 는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴 예를 들어, 1~3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 의미한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들어, R기는 각각 독립적으로 하나 이상의 기들이 존재할 때 각각의 R', R'', R''' 및 R'''' 기에서와 같이 선택된다. R' 및 R''가 동일한 질소 원자에 결합할 때, 이것들은 질소 원자와 결합하여 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성한다. 예를 들어, -NR'R''는 1-페롤리디닐 및 4-모폴리닐을 포함하는(이에 한정되는 것은 아님) 의미이다. 전술한 치환기에 관한 설명으로부터, 당 업자는 "알킬"이란 용어가 수소 기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기 예를 들어, 할로알킬(예를 들어, -CF₃ 및 -CH₂CF₃)(이에 한정되는 것은 아님) 및 아실(예를 들어, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등)(이에 한정되는 것은 아님)을 포함하는 기를 의미하는 것이라고 이해할 것이다.

[0178]

알킬 라디칼에 대하여 기술된 치환기와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴 기에 대한 치환기도 다양하며, 다음과 같은 것들 즉, 할로겐, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -할로겐, -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', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, 플루오로(C₁-C₄)알콕시, 및 플루오로(C₁-C₄)알킬, [그 수는 0~방향족 고리계의 개방 원자가의 총수임]로부터 선택되고(이에 한정되는 것은 아님); 여기서 R', R'', R''' 및 R''''는 독립적으로 수소, 알킬, 헤�테로알킬, 아릴 및 헤�테로아릴로부터 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들어, 각각의 R기는, 하나 이상의 R', R'', R''' 및 R'''' 기가 존재하는 각각의 경우에서와 같이 독립적으로 선택된다.

[0179]

본원에 사용된 "조절된 혈청 반감기"란, 변형된 ABP의 혈류내 반감기가 변형되지 않은 ABP의 경우보다 증가 또는 감소 변화되는 경우를 의미한다. 혈청 반감기는 ABP를 투여한 이후의 다양한 시점에서 혈액 시료를 채취하여, 이 분자의 각 시료내 농도를 측정함으로써 측정된다. 혈청 농도와 시간과의 상관성을 통하여 혈청 반감기를 계산할 수 있다. 혈청 반감기는 약 2배 이상 증가하는 것이 바람직하나, 예를 들어, 투여 방식을 만족스럽게 만들 수 있고 독성 효과를 없앨 수 있다면 2배보다 적게 증가하는 경우도 바람직하다. 몇몇 구체예에서, 반감기의 증가 정도는 약 3배 이상, 약 5배 이상 또는 약 10배 이상이다.

[0180]

본원에 사용된 "조절된 치료 반감기"란 용어는, 치료학적 유효량만큼의 ABP 또는 변형된 생물 활성 분자를 포함하는 ABP의 반감기가, 변형되지 않은 ABP의 경우보다 증가 또는 감소 변화되는 경우를 의미한다. 치료 반감기는 투여 이후 여러 시점에서 분자의 약물 동력학적 및/또는 약물 동태학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 치료 반감기는 특정의 투여 방식, 특정의 총 투여량이 유리하고, 원하지 않는 효과를 피할 수 있다면 증가된 경우가 바람직하다. 몇몇 구체예에서, 치료 반감기의 증가는 효능의 증가, 변형 분자와 표적의 결합의 증가 또는 감소, 또는 다른 매개 변수 또는 기타 변형되지 않은 분자의 작용 기작의 증가 또는 감소에 기인한다.

[0181]

핵산 또는 단백질에 적용될 경우 "분리된"이란 용어는, 핵산 또는 단백질이 천연의 상태에서 결합되어 있던 다른 세포 성분으로부터 실질적으로 유리된 상태를 의미한다. 이는 동질의 상태일 수 있다. 분리된 물질은 건조 또는 반건조 상태이거나, 또는 용액 예를 들어, 수용액(이에 한정되는 것은 아님)일 수 있다. 순도 및 균질성은 통상적으로 분석 화학 기술 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 측정된다. 제제 중에 우세하게 존재하는 화학 종인 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 특히, 분리된 유전자는 이 유전자에 측정하여 있고 목적 유전자 이외에 단백질을 코딩하는 개방 해독틀로부터 분리된 것이다. "정제된"이란 용어는, 핵산 또는 단백질이 전기 영동 겔 상에 실질적으로 하나의 밴드를 나타내는 경우를 의미한다. 특히, 이는 핵산 또는 단백질의 순도가 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상인 경우를 의미한다.

[0182]

"핵산"이란 용어는 데옥시리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오티드 및 이들의 단일 사슬형 또는 이중 사슬형인 중합체를 의미한다. 특별히 제한하지 않는 한, 상기 용어는 참고 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 물질 대시되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 특별히 제한하지 않는 한, 상기 용어는 또한 PNA(펩티드핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA의 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 유사체를 의미한다. 달리 지정하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 함축적으로는 이의 보존적으로 변형된(예를 들어, 축퇴 코돈 치환) 변이체와 상보성 서열 및 명백히 제시한 서열을 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈 중 세 번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 발생할 수 있다[Batzer 외 다수, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka 외 다수, J.

Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Cassol외 다수 (1992); Rossolini외 다수, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].

[0183] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이란 용어는 본원에서 호환적으로 사용되는 것으로서, 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 즉, 폴리펩티드에 관한 설명은 펩티드 및 단백질에 관한 설명에도 동일하게 적용된다(그 역에도 해당됨). 상기 용어들은 천연 발생 아미노산 중합체 및 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-천연적으로 코딩된 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어는 임의의 길이를 갖는 아미노산 사슬 예를 들어, 전장 단백질(즉, 항원)을 포함하며, 이때 상기 아미노산 잔기는 공유 펩티드 결합에 의하여 결합된다.

[0184] "아미노산"이란 용어는, 천연 발생 아미노산 및 천연 발생되지 않는 아미노산, 그리고 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모의체를 의미한다. 천연 코딩 아미노산으로서는 20개의 공통 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린)과 피롤리신 및 셀레노시스테인이 있다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 기본적인 화학 구조가 동일한 아미노산 즉, 수소, 카르복시기, 아미노기 및 R기에 결합하는 α 탄소를 보유하는 화합물 예를 들어, 호모세린, 노르루신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설포늄을 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R기(예를 들어, 노르루신) 또는 변형된 펩티드 골격을 보유하지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다.

[0185] 본원에 있어서, 아미노산은 통상적으로 공지된 3 문자 표시(three letter symbol) 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에 의해 추천되는 1 문자 표시(one-letter symbol)에 의해 명명될 수 있다. 이와 유사하게, 뉴클레오티드도 통상적으로 받아들여지고 있는 단일-문자 암호(single-letter code)에 의해 명명될 수 있다.

[0186] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산과 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열에 있어서, "보존적으로 변형된 변이체"는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 의미하며, 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우에는 본질적으로 동일한 서열을 의미한다. 유전자 암호의 축퇴성으로 인하여, 다수의 기능적으로 동일한 핵산은 임의의 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 알라닌 아미노산을 코딩한다. 그러므로, 알라닌이 코돈에 의하여 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변형시키지 않고, 기술된 해당 코돈 중 임의의 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이가 "침묵 변이"인데, 이는 보존적으로 변형된 변이의 일종이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 가능한 침묵 변이 모두를 설명한다. 숙련자는 핵산 내에 존재하는 각 코돈(메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG와, 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)을 변형하여 기능적으로 동일한 분자를 얻을 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 기술된 각각의 서열에 잠재되어 있다.

[0187] 아미노산 서열에 있어서, 숙련자는 코딩된 서열 내에 존재하는 소수의 아미노산 또는 단일 아미노산을 변형, 침가 또는 결실시키는, 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열로의 치환, 결실 또는 침가는, 변형으로 인해 아미노산과 화학적으로 유사한 아미노산이 치환되는 경우 각각 "보존적으로 변형된 변이체"임을 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당 업계에 널리 공지되어 있다. 이와 같이 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 종간 상동체 및 대립 유전자에 부가적인 것으로서 이것들을 배제하는 것은 아니다.

[0188] 다음 8개의 군들은 각각 서로 보존적으로 치환되는 아미노산을 포함한다:

[0189] 1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0190] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0191] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0192] 4) 아르기닌 (R), 리신 (K);

[0193] 5) 이소루신 (I), 루신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);

[0194] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);

[0195] 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및

[0196] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M)

- [0197] [예를 들어, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993) 참조]
- [0198] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열에 있어서 "동일한" 또는 "상동성 %"라는 용어는, 동일한 2 이상의 서열 또는 종속 서열을 의미한다. 다음의 서열 비교 알고리즘 중 어느 하나를 사용하여 측정하거나 또는 수동식으로 정렬한 다음 눈으로 관찰하여 측정하는 경우와 같이, 비교 윈도우 또는 지정된 부위에 대하여 최대한으로 상응하도록 정렬 및 비교될 때, 만일 서열이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 비율을 보유하면(즉, 특정 부위에 대하여 약 60% 상동성, 임의로는 약 65% 상동성, 약 70% 상동성, 약 75% 상동성, 약 80% 상동성, 약 85% 상동성, 약 90% 상동성 또는 약 95% 상동성을 보유하면), 서열은 "실질적으로 동일한" 것이다. 이러한 정의는 또한 시험 서열의 상보체에도 적용된다. 상동성은 길이 면에서 약 50 아미노산 또는 뉴클레오티드 이상인 부위, 또는 75~100 아미노산 또는 뉴클레오티드인 부위에 걸쳐 존재할 수 있거나, 또는 특정되지 않을 경우에는 전체 서열이나 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 걸쳐 존재할 수 있다.
- [0199] 서열 비교에 있어서, 통상적으로 하나의 서열은 시험 서열과 비교되는 참고 서열(reference sequence)로서의 역할을 갖는다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 서열 및 참고 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요할 경우에는 종속 서열 좌표를 지정하며, 서열 알고리즘 프로그램 매개 변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 매개 변수가 사용될 수 있으며, 또는 대안적 매개 변수가 지정될 수 있다. 이후 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개 변수를 바탕으로 하여 참고 서열과 관련된 시험 서열에 대해 서열 상동성 %를 계산한다.
- [0200] 본원에 사용된 "비교 윈도우(comparison window)"는, 20~600개, 일반적으로 약 50~약 200개, 더욱 일반적으로 약 100~약 150개로 이루어진 군으로부터 선택된 인접 위치의 번호 중 임의의 하나의 절편에 대한 범위를 포함하는데, 여기서 서열은 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 인접 위치의 동일한 번호의 참고 서열과 비교될 수 있다. 비교용 서열 정렬 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 비교용 서열의 최적 정렬은 예를 들어, 국소 상동성 알고리즘[Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c], 상동성 정렬 알고리즘[Needleman and Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48:443], 유사성 검색 방법[Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444], 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)의 컴퓨터에 의한 실행, 또는 수동식 정렬 및 시각적 관찰[예를 들어, Ausubel의 다수, Current Protocols in Molecular Biology (1995) 추록]에 따라서 수행될 수 있다.
- [0201] 서열 % 상동성 및 서열 유사성을 측정하는데 적당한 알고리즘의 일례로서는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있다[각각, Altschul의 다수 (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 및 Altschul의 다수 (1990) J Mol. Biol. 215:403-410에 기술]. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통하여 공중이 이용 가능하다. BLAST 알고리즘 매개 변수인 W, T 및 X는 정렬의 정확성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열용)은 단어 길이(W) = 11, 기대치(E) = 10, M = 5, N = -4, 그리고 양 서열의 비교치를 디폴트값으로서 사용한다. 아미노산 서열에 있어서, BLASTP 프로그램은 단어 길이(W) = 3, 기대치(E) = 10을 디폴트값으로서 사용하며, BLOSUM62 스코어링 매트릭스[Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Scl USA 89:10915]는 정렬값(B) = 50, 기대치(E) = 10, M = 5, N = -4, 그리고 양 서열의 비교치를 디폴트값으로서 사용한다. BLAST 알고리즘은 통상적으로 턴 오프된(turned off) "저 복잡도(low complexity)" 필터로써 수행된다.
- [0202] 상기 BLAST 알고리즘은 또한 양 서열 간 유사성의 통계적 분석을 수행한다[예를 들어, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787]. BLAST 알고리즘에 의하여 제공된 유사성에 대한 하나의 척도는 최소 확률의 총합(P(N))으로서, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 상호 간 우연히 매치될 확률의 지표를 제공해 준다. 예를 들어, 참고 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에 있어서 최소 확률의 총합이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이면, 핵산은 참고 서열과 유사한 것으로 간주된다. "...에 선택적으로(또는 특이적으로) 혼성화되다"라는 어구는, 서열이 복잡한 혼합물(예를 들어, 전 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA; 이에 한정되는 것은 아님) 중에 존재할 때 염격한 혼성화 조건하에서 문자가 특정 뉴클레오티드 서열에만 결합하거나, 이 서열과 이중체를 형성하거나 또는 혼성화하는 것을 의미한다.
- [0203] "엄격한 혼성화 조건"이란 어구는, 당 업계에 공지된 바와 같이, 낮은 이온 세기와 고온인 조건을 의미한다. 통상적으로, 염격한 조건하에서 프로브는 복잡한 핵산 혼합물(예를 들어, 전 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA; 이에 한정되는 것은 아님) 중에 존재하는 상기 프로브의 표적 서열에 혼성화 될 것이지만, 복잡한 혼합물 중에 존재하는 다른 서열과는 혼성화되지 않을 것이다. 염격한 조건은 서열에 따라서 달라지며, 또한 상이한 환경에

서도 달라질 것이다. 보다 긴 서열은 고온에서 특이적으로 혼성화한다. 핵산의 혼성화에 관한 자세한 지침은 문헌[Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에서 살펴볼 수 있다. 일반적으로, 염격한 조건은 특정의 이온 세기와 pH에서 특이 서열에 대한 용융점 온도(T_m)보다 약 5~10°C 낮게 선택된다. 상기 T_m 은 (특정의 이온 세기, pH 및 핵산 농도 하에서) 표적에 상보성이 프로브의 50%가 평형인 표적 서열에 혼성화하는 온도이다[즉, 표적 서열이 T_m 에서 과량 존재할 때, 프로브의 50%가 평형 상태로 점유]. 염격한 조건이란, 염 농도가 약 1.0 M 나트륨 이온 미만, 통상적으로는 약 0.01~1.0 M 나트륨 이온 (또는 기타 염) 미만이고, pH가 7.0~8.3이며, 온도가 약 30°C 이상(길이가 짧은 프로브 예를 들어, 10~50 뉴클레오티드)인 프로브이고, 온도가 약 60°C 이상(길이가 긴 프로브 예를 들어, 50 뉴클레오티드 이상인 프로브)인 조건일 수 있다. 염격한 조건은 또한 탈 안정화 제제(destabilizing agent) 예를 들어, 포름아미드를 첨가함으로써 이를 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화에 있어서, 양성 시그널은 최소한 백그라운드의 2배 이상, 임의로는 백그라운드 혼성화의 10배일 수 있다. 대표적인 염격한 혼성화 조건은 다음과 같을 수 있다: 50% 포름아미드, 5X SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 항온 처리, 또는 5X SSC, 1% SDS, 65°C에서 항온 처리, 0.2 X SSC에서 세척, 그리고 0.1% SDS, 65°C. 이때, 세척은 5, 15, 30, 60 또는 120 분 이상 동안 수행될 수 있다.

[0204] 본원에 사용된 바와 같은, "진핵 생물"이란 용어는 계통 발생 영역 중 진핵 생물(Eucarya) 예를 들어, 동물(예를 들어, 포유 동물, 곤충, 과충류, 새 등), 섬모충, 식물(예를 들어, 외떡잎 식물, 쌍떡잎 식물, 조류 등), 곰팡이, 효모, 편모충류, 마이크로스포리디아(microsporidia), 원생 생물 등에 속하는 유기체를 의미한다.

[0205] 본원에 사용된 바와 같은, "비 진핵 생물(non-eukaryote)"이란 용어는, 비 진핵 생물 유기체를 의미한다. 예를 들어, 비 진핵 생물 유기체는 진정 박테리아[예를 들어, 에스케리챠 콜라이(*Escherichia coli*), 서머스 서모필러스(*Thermus thermophilus*), 바실러스 스테아로서모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 애어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등] 계통 발생 영역 또는 고세균[예를 들어, 메타노코커스 재너쉬(*Methanococcus jannaschii*), 메타노박테리움 서모오토토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 할로박테리움(*Halobacterium*) 예를 들어, 할로페렉스 볼카니(*Haloflexax volcanii*) 및 할로박테리움 종(*Halobacterium species*) NRC-1, 아키오글로버스 풀기두스(*Archaeoglobus fulgidus*), 피로코커스 퓨리오수스(*Pyrococcus furiosus*), 피로코커스 호리코시(*Pyrococcus horikoshii*), 오로파룸 페르닉스(*Aeuropyrum pernix*) 등] 계통 발생 영역에 속할 수 있다.

[0206] 본원에 사용된 바와 같은 "개체"란 용어는, 치료, 관찰 또는 실험의 대상인동물, 바람직하게는 포유 동물, 가장 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0207] 본원에 사용된 "유효량"이란 용어는, 치료될 질환, 병태(condition) 또는 이상의 증상 중 하나 이상이 어느 정도 완화될, (변형된) 비 천연 아미노산 폴리펩티드의 투여량을 의미한다. 본원에 기술된 (변형된) 비 천연 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 예방, 강화 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.

[0208] "강화하다" 또는 "강화"란 용어는, 원하는 효과의 효능 또는 지속 기간을 증가 또는 연장시키는 것을 의미한다. 그러므로, 치료제의 효과를 강화시키는 것에 있어서, "강화"란 용어는, 효능 또는 지속 기간, 시스템상에서 기타 치료제의 효과를 증가 또는 연장시키는 능력을 의미한다. 본원에 사용되는 "강화 유효량(enhaning-effective amount)"이란, 원하는 시스템 내에서 기타 치료제의 효과를 강화시키는데에 적당한 양을 의미한다. 환자에게 사용될 경우, 이러한 용도로서 유효한 양은 질환, 이상 또는 병태, 치료 경력, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응성, 그리고 치료의의 판단에 따라서 달라질 것이다.

[0209] 본원에 사용된 "변형된"이란 용어는, 폴리펩티드 상에 번역 후 변형이 가하여진 경우를 의미한다. "(변형된)"과 같은 형태의 용어는, 논의되고 있는 폴리펩티드가 임의적으로 변형되는 경우 즉, 논의되고 있는 폴리펩티드가 변형되거나 또는 변형되지 않을 수 있는 경우를 의미한다.

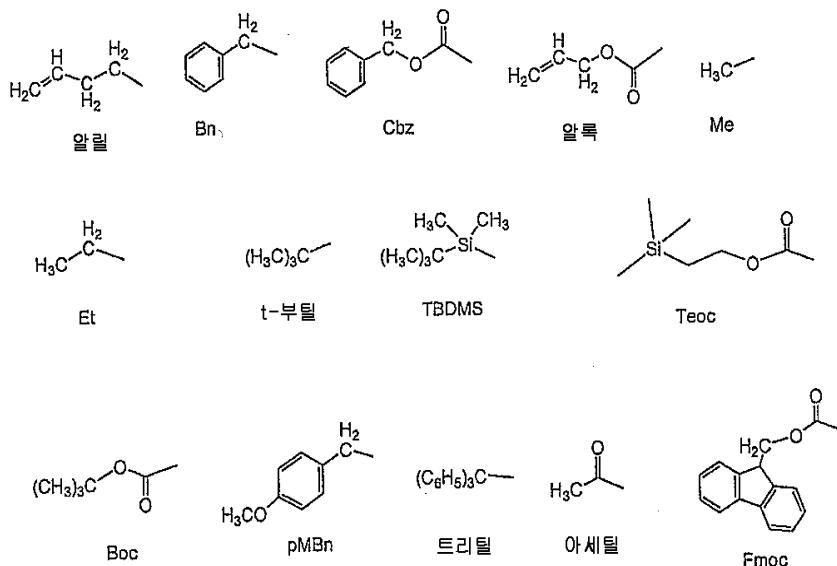
[0210] "번역 후 변형된" 및 "변형된"이란 용어는, 아미노산이 폴리펩티드 사슬에 삽입된 이후에 아미노산에서 발생되는 천연 또는 비 천연 아미노산의 임의의 변형을 의미한다. 상기 용어에는 생체 내 공동 번역 변형, 생체 내 번역 후 변형, 및 시험관 내 번역 후 변형을 포함한다.

[0211] 예방 분야에 있어서, (변형된) 비 천연 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 특정 질환, 이상 또는 병태에 영향받기 쉽거나 또는 발생 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양을 "예방학적 유효량"이라 정의한다. 이 경우, 정확한 양은 또한 환자의 건강 상태, 체중 등에 따라 달라진다. 당 업자에게 이러한 예방학적 유효량은

통상의 실험을 통해 결정된다는 사실은 널리 인식되어 있다[투여량 증가 임상 실험(dose escalation clinical test)].

[0212] "보호된"이란 용어는, "보호기" 또는 임의의 반응 조건하에서 화학적으로 반응성인 작용기의 반응을 막아주는 부위가 존재하는 경우를 의미한다. 보호기는 화학적으로 반응성인 기(보호되는 기)의 종류에 따라서 다양할 것이다. 예를 들어, 화학적으로 반응성인 기가 아민 또는 히드라지드이면, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 기로부터 선택될 수 있다. 만일 화학적으로 반응성인 기가 티올이면, 보호기는 오르토파리딜디설파이드일 수 있다. 만일 화학적으로 반응성인 기가 카르복시산 예를 들어, 부타논산 또는 프로피온산, 또는 히드록실 기이면, 보호기는 벤질 또는 알킬 기 예를 들어, 메틸, 에틸, 또는 tert-부틸일 수 있다. 당 업계에 공지된 기타 보호기는 또한 본원에 기술된 방법 및 조성물 중에 포함되거나 또는 이와 함께 사용될 수 있다.

[0213] 예시용으로서, 차단/보호 기들은 다음과 같은 것들로부터 선택될 수 있다:



[0214]

[0215] 기타 보호기에 관하여는 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999]에 기술되어 있다.

[0216]

치료시, (변형된) 비 천연 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 이미 질환, 병태 또는 이상을 나타내고 있는 환자에게 질환, 이상 또는 병태의 증상을 최소한 부분적으로나마 지연시키거나 또는 치료하는데 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양을 "치료학적 유효량"이라고 정의하며, 이는 질환, 이상 또는 병태의 심각성 및 진행 과정, 치료 경력, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응성, 그리고 치료의의 판단에 따라서 달라질 것이다. 이러한 치료학적 유효량은 통상의 실험에 의하여 결정할 수 있다는 사실은 당업자에게 널리 인식되어 있다[예를 들어, 투여량 증가 임상 실험].

[0217]

"치료"란 용어는, 예방학적 및/또는 치료적 처치법을 의미하는 것으로 사용된다.

[0218]

달리 특정하지 않는다면, 당 업자에게 널리 알려진 종래의 질량 분석법, NMR, HPLC, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학적 방법이 사용된다.

[0219]

상세한 설명

[0220]

I. 도입

[0221]

본 발명은 하나 이상의 비 천연 아미노산을 포함하는 ABP 분자를 제공한다. 본 발명의 임의의 구체예에서, 하나 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 ABP는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 하나의 구체예에서, 하나 이상의 번역 후 변형은 문자 예를 들어, 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광 가교제, 세포 독성 화합물, 방사성 핵종, 약물, 친화성 표지, 광친화성 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 퀄레이트화제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 수용성 덴드리머, 시클로텍스트린, 억제 리보핵산, 생체 적합 물질, 나노 입자, 스피드 표지, 형광 표지 염료, 금속 함유 부위, 방사성 부위, 신규 작용기, 기

타 분자들과 공유적으로 또는 비공유적으로 상호 작용을 하는 기, 포토케이지 부위(photocaged moiety), 광이성화 부위, 바이오팁, 바이오팁 유도체, 바이오팁 유사체, 중원자 삽입 부위, 화학적으로 절단 가능한 기, 광 절단기, 연장된 측쇄, 탄소 결합 당, 산화 환원 활성제, 아미노 티오산, 독성 부위, 동위 원소 표지화된 부위, 생물 물리학적 프로브, 인광기, 화학 발광기, 전자 치밀기, 자성 기, 삽입기, 발색단, 에너지 전이제, 생물 활성 제제, 검출 가능한 표지, 소분자의 결합을 포함하거나, 또는 상기 분자들을 임의로 조합하여 결합하는 것, 또는 상기 분자들과, 화학적 방법을 이용하여 당 업자에게 특정 반응기로서 적합하다고 널리 공지되어 있는 제 1의 반응기를 포함하는 하나 이상의 인공적 아미노산에 대한 제 2의 반응기를 포함하는 임의의 기타 바람직한 화합물 또는 물질을 조합하여 결합하는 것을 포함한다. 예를 들어, 제1 반응기는 알키닐 부위[예를 들어, 인공적 아미노산 *p*-프로파길옥시페닐알라닌(여기서 상기 프로파길 기는 또한 아세틸렌 부위라고도 칭하여짐)]이고, 제2의 반응기는 아지도 부위이며, [3 + 2] 고리화 첨가 화학 방법이 사용된다. 다른 예에서, 제 1 반응기는 아지도 부위(예를 들어, 인공적 아미노산 *p*-아지도-L-페닐알라닌)이고 제2 반응기는 알키닐 부위이다. 본 발명의 변형된 ABP 폴리펩티드에 대한 임의의 구체예에서, 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는 하나 이상의 인공적 아미노산(예를 들어, 케토 작용기를 포함하는 비 천연 아미노산)은 하나 이상의 번역 후 변형이 당류 부위를 포함하는 경우에 사용된다. 임의의 구체예에서, 번역 후 변형은 전핵 생물 세포 또는 비 전핵 생물 세포 내와 같이 생체 내에서 가하여 진다.

[0222]

임의의 구체예에서, 단백질은 하나의 숙주 세포에 의하여 생체 내에서 일어나는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하며, 여기서, 상기 번역 후 변형은 보통 다른 숙주 세포에 의해서는 일어나지 않는 것이다. 임의의 구체예에서, 단백질은 전핵 생물 세포에 의하여 생체 내에서 일어나는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서 상기 번역 후 변형은 보통 비 전핵 생물 세포에 의해서는 일어나지 않는다. 번역 후 변형의 예로서는, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질-결합 변형 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나의 구체예에서, 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합(예를 들어, 올리고당이 (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc 등을 포함하는 경우)에 의해 아스파라긴에 올리고당을 결합시키는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 번역 후 변형은 GalNAc-세린, GalNAc-트레오닌, GlcNAc-세린, 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의하여 세린 또는 트레오닌에 올리고당(예를 들어, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc 등)을 결합시키는 것을 포함한다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 분비 및 국소화 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합체 등을 포함할 수 있다. 분비 시그널 서열의 예로서는, 원핵 생물 분비 시그널 서열, 전핵 생물 분비 시그널 서열, 박테리아 발현을 위해 5' 말단이 최적화된 전핵 생물 분비 시그널 서열, 신규의 분비 시그널 서열, 펩테이트 리아제 분비 시그널 서열, Omp A 분비 시그널 서열 및 파지 분비 시그널 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 분비 시그널 서열에 대한 예로서는, STII (전핵 생물), Fd GIII 및 M13 (파지), Bg12 (효모), 및 트랜스포손으로부터 유래된 시그널 서열 bla를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0223]

비 천연 아미노산을 포함하는 항원 결합 폴리펩티드는 생물 활성 분자 예를 들어, 소분자, 웹티드 및 올리고뉴클레오티드의 치료적 반감기, 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는데 사용될 수 있다. 이러한 소분자, 웹티드 및 올리고뉴클레오티드는, 표적 분자 또는 세포 유형의 결합 및/또는 인지, 항종양, 항 맥관 형성, 항바이러스 및 세포 사멸 활성을 포함하는(이에 한정되는 것은 아님) 생물 활성을 보유할 수 있다. 뿐만 아니라, 비 천연 아미노산을 포함하는 항원 결합 폴리펩티드는 목적으로 하는 활성 예를 들어, 효과기 기능 예를 들어, ADCC, 식균 작용, 또는 보체-의존성 세포 독성, 전구 약물의 활성화, 효소 활성, 촉매 활성, 단백질-단백질 상호 작용의 차단, 목적으로 하는 항원에의 결합 및 소분자의 목적 위치로의 표적화를 제공할 수 있다. ABP의 단백질-단백질 상호 작용을 차단함으로써 결합된 생물 활성 분자의 하나 이상의 활성을 조절할 수 있다. 소 분자는 기타 단백질 또는 분자의 결합 활성을 방해하는 길항제으로서 사용될 수 있다.

[0224]

항원-결합 폴리펩티드 및 소 분자는 링커, 중합체 또는 공유 결합에 의하여 상호 결합될 수 있다. 상기 링커, 중합체 또는 소 분자 자체는 20개의 공통 아미노산에 미 반응성이 작용기를 포함할 수 있다. 상기 링커 또는 중합체는 이중 작용성일 수 있다. 링커, 중합체 또는 공유 결합을 통하여 생물 활성 분자에 항원-결합 폴리펩티드가 결합할 때 관여하는 하나 이상의 결합은 의도로 하는 조건하에서 비가역적, 가역적 또는 불안정할 수 있다. 링커, 중합체 또는 공유 결합을 통하여 분자에 항원-결합 폴리펩티드가 결합할 때 관여하는 하나 이상의 결합은 항원-결합 폴리펩티드 또는 기타 분자를 조절 방출 가능하도록 할 수 있다. 다양한 소 분자는 당 업자에 의해 화학적 방법, 천연 생성물의 분리 또는 기타 방법으로 얻어질 수 있다.

[0225]

본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Rader 외 다수, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5396-400]에는, 소 합성 분자와 일반적인 항체 분자를 반응시킴으로써 소 합성 분자에 효과기 기능을 제공하고 혈청

반감기를 연장시키는 방법에 관하여 기술되어 있다. 여기에 개시된 복합체는 mAb 38C2, 천연 알돌라제 효소를 모의하는 촉매 항체, 및 항체상에 존재하는 반응성 리신 잔기를 통하여 Arg-Gly-Asp 웨티도모의체를 표적화하는 인테그린의 디케톤 유도체 사이의 가역적 공유 결합에 의하여 생성된다. 웨티도모의체의 혈청 반감기가 증가하게 될 뿐만 아니라, 상기 복합체는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$ 발현 세포의 표면에 항체를 선택적으로 재 표적화시키는 것으로 파악된다.

[0226] 목적으로 하는 단백질 또는 폴리펩티드는 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 10개 이상의 비 천연 아미노산을 함유할 수 있다. 이러한 인공적 아미노산은 동일하거나 또는 상이할 수 있는데, 예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 단백질 내에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 상이한 위치가 존재할 수 있다. 임의의 구체예에서, 하나 이상, 그러나, 천연 발생 단백질 내에 존재하는 특정 아미노산 모두 보다는 적은, 아미노산은 인공적 아미노산으로 치환된다.

[0227] 본 발명은 항원-결합 폴리펩티드인 ABP에 바탕을 둔 방법 및 조성물(하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산 포함)을 제공한다. 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 ABP에 도입시키면, 예를 들어, 공통적으로 생성되는 20개의 아미노산과 반응하는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산과의 특이적 화학 반응을 포함하는 화학적 컨쥬게이트화 방법을 수행할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 상기 ABP는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄를 통하여 수용성 중합체 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 결합한다. 본 발명은 PEG 유도체로 단백질을 선택적으로 변형시키는 매우 효과적인 방법을 제공하며, 이 방법은 비 유전적 코딩 아미노산 예를 들어, 20개의 천연 삽입 아미노산에서는 발견되지 않는 작용기 또는 치환기 예를 들어, 케톤, 아지드 또는 아세틸렌 부위를 함유하는 아미노산을 선택자 코돈에 대응하여 단백질에 선택적으로 삽입하는 단계 및 이 아미노산을 적당히 반응성인 PEG 유도체로 변형시키는 후속 단계를 포함한다. 일단 삽입되면, 아미노산 측쇄는 이후 당 업자에게 천연 코딩 아미노산에 존재하는 특정 작용기 또는 치환기로서 적당하다고 알려진 화학적 방법을 사용하여 변형될 수 있다. 다수의 공지된 화학적 방법들은 본 발명에서 단백질에 수용성 중합체를 삽입시키는데에 이용하기 적당하다. 이러한 방법으로서는, 각각 아세틸렌 또는 아지드 유도체를 사용하는, 휘스겐 [3 + 2] 고리 침가 반응(예를 들어, Padwa, A., Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p.1069-1109; 및 휘스겐 R.의 저서 (1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry(1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176)에 개시된 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0228] 휘스겐 [3 + 2] 고리 침가 방법은 친핵성 치환 반응보다는 고리 침가 반응이 관여하기 때문에, 단백질은 극도의 선택적 변형을 일으킬 수 있다. 이 반응은 실온 및 수성 조건에서 촉매량의 Cu(I) 염을 반응 혼합물에 침가함으로써 위치 선택적으로($1,4 > 1,5$) 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tornoe와 다수, (2002) Org. Chem. 67:3057-3064; 및 Rostovtsev와 다수, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; 및 WO 03/101972]을 참조하시오. [3 + 2] 고리 침가 반응을 통하여 본 발명의 단백질에 침가될 수 있는 분자는 실질적으로 적당한 작용기 또는 치환기를 보유하는 임의의 분자 예를 들어, 아지드 또는 아세틸렌 유도체를 포함한다. 이러한 분자들은 아세틸렌기 예를 들어, p-프로파길옥시페닐알라닌, 또는 아지도기 예를 들어, p-아지도페닐알라닌을 보유하는 인공적 아미노산에 침가될 수 있다.

[0229] 휘스겐 [3 + 2] 고리 침가 반응으로부터 생성된 5원 고리는 일반적으로 환원적 환경에서 가역적이지 않으며, 장기간 동안 수성 환경에서 가수 분해에 안정하다. 결과적으로, 다양한 물질의 물리적 특성 및 화학적 특성은 까다로운 수성 조건하에서 본 발명의 활성 PEG 유도체로 변형될 수 있다. 더욱 중요한 사실은, 아지드 및 아세틸렌 부위가 상호 특이적이기 때문에(또한 예를 들어, 유전적으로 코딩되는 20개의 공통 아미노산 중 임의의 것과 반응하지 않기 때문에), 단백질은 하나 이상의 특이적 위치에서 매우 선택적으로 변형될 수 있다는 사실이다.

[0230] 본 발명은 또한 하나 이상의 아세틸렌 또는 아지드 부위를 보유하는 PEG 유도체 및 관련 친수성 중합체의 수용성이이고 가수 분해에 안정한 유도체를 제공한다. 아세틸렌 부위를 함유하는 PEG 유도 중합체는 선택자 코돈에 대응하여 선택적으로 단백질에 도입된 아지드 부위와의 커플링에 대하여 매우 선택적이다. 이와 유사하게, 아지드 부위를 함유하는 PEG 유도 중합체는 선택자 코돈에 대응하여 선택적으로 삽입된 아세틸렌 부위와의 커플링에 대하여 매우 선택적이다.

[0231] 더욱 구체적으로, 아지드 부위는 예를 들어, 알킬 아지드, 아릴 아지드 및 이들 아지드의 유도체를 포함한다. 상기 알킬 및 아릴아지드 유도체는 이의 아세틸렌 특이적 반응성이 유지되는 한, 기타 치환기를 포함할 수 있다. 아세틸렌 부위는 알킬 및 아릴 아세틸렌과 각각의 유도체를 포함한다. 상기 알킬 및 아릴 아세틸렌 유도

체는 이의 아지드 특이적 반응성이 유지되는 한, 기타 치환기를 포함할 수 있다.

[0232] 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP는 항체의 특이성을 이용하는 검정법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ABP 분자들은 잠재적 항원 군집을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0233] 본 발명은 다양한 작용기, 치환기 또는 부위를 갖는 물질과 기타 물질 예를 들어, 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광 가교제; 세포 독성 화합물; 방사성 핵종; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금 속 키레이트화제; 보조 인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 수용성 텐드리며; 시클로덱스트린; 억제 리보핵산; 생체 적합 물질; 나노 입자; 스판 표지; 형광 표지 염료; 금속 함유 부위; 방사성 부위; 신규 작용기; 기타 분자들과 공유적으로 또는 비공유적으로 상호 작용을 하는 기; 포토케이지 부위; 광이성화 부위; 바이오틴; 바이오틴 유도체; 바이오틴 유사체; 중원자 삽입 부위; 화학적으로 절단 가능한 기; 광 절단기; 연장된 측쇄; 탄소 결합 당; 산화 환원 활성체; 아미노 티오산; 독성 부위; 동위 원소 표지화된 부위; 생물 물리학적 프로브; 인광기; 화학 발광기; 전자 치밀기; 자성 기; 삽입기; 발색단; 에너지 전이제; 생물 활성 제제; 검출가능한 표지; 소분자; 또는 상기 물질의 임의의 조합, 또는 목적으로 하는 화합물 또는 물질의 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명은 또한 아지드 또는 아세틸렌 부위를 보유하는 물질과 상응하는 아세틸렌 또는 아지드 부위를 보유하는 PEG 유도 중합체와의 컨쥬게이트를 포함한다. 예를 들어, 아지드 부위를 포함하는 PEG 중합체는 비 유전적 코딩 아미노산과 아세틸렌 작용기를 함유하는 단백질 내 임의의 위치에서 생물 활성 분자에 커플링 될 수 있다. PEG와 생물 활성 분자의 커플링에 의한 결합으로서는 예를 들어, 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응 생성물을 포함한다.

[0234] PEG가 생체 적합 물질의 표면을 변형시키는데에 사용될 수 있다는 사실은 당 업계에 널리 확립되어 있다[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,610,281 호; Mehvar, R., J. Pharmaceut. Sci., 3(1):125-136 (2000) 참조]. 본 발명은 또한 하나 이상의 반응성 아지드 또는 아세틸렌 위치와 본 발명의 하나 이상의 아지드- 또는 아세틸렌-함유 중합체가 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 결합을 통하여 커플링되어 있는 표면을 포함하는 생체 적합 물질을 포함한다. 생체 적합 물질 및 기타 물질은 또한 아지드 또는 아세틸렌 결합 이외의 결합 예를 들어, 카르복시산, 아민, 알콜 또는 티올 부위를 포함하는 결합을 통하여 아지드- 또는 아세틸렌-활성화 유도 중합체에 커플링 되어, 후속 반응에 적합한 아지드 또는 아세틸렌 부위를 해리시킬 수도 있다.

[0235] 본 발명은 본 발명의 아지드- 및 아세틸렌-함유 중합체를 합성하는 방법을 포함한다. 아지드-함유 PEG 유도체의 경우, 아지드는 중합체의 탄소 원자에 직접적으로 결합될 수 있다. 대안적으로, 상기 아지드-함유 PEG 유도체는 아지드 부위를 한쪽 말단부에 보유하는 결합제를 종래의 활성화 중합체에 결합시켜, 그 결과로 생성된 중합체가 그의 말단에 아지드 부위를 보유하게 만들도록 제조될 수 있다. 아세틸렌-함유 PEG 유도체의 경우, 아세틸렌은 중합체의 탄소 원자에 직접적으로 결합될 수 있다. 대안적으로, 아세틸렌-함유 PEG 유도체는 한쪽 말단에 아세틸렌 부위를 보유하는 결합제를 종래의 활성화 중합체에 결합시켜, 그 결과로 생성된 중합체가 그의 말단에 아세틸렌 부위를 보유하게 만들도록 제조될 수 있다.

[0236] 더욱 구체적으로, 아지드-함유 PEG 유도체의 경우, 하나 이상의 활성 히드록실 부위를 보유하는 수용성 중합체는 반응을 수행하여, 보다 반응성인 부위 예를 들어, 메실레이트, 트레실레이트, 토클레이트 또는 할로겐 이탈기를 보유하는 치환 중합체를 생산한다. 설포닐 산 할로겐화물, 할로겐 원자 및 기타 이탈기를 함유하는 PEG 유도체의 제조 및 사용은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 이후 결과로 생성된 치환 중합체는 중합체의 말단에서 보다 반응성인 부위를 아지드 부위로 치환하는 반응을 수행한다. 대안적으로, 하나 이상의 활성 친핵성 또는 친전자성 부위를 보유하는 수용성 중합체는 한쪽 말단에 아지드를 보유하는 결합제와의 반응을 수행하여, 그 결과 PEG 중합체와 결합제 사이에 공유 결합이 형성되며, 아지드 부위는 중합체의 말단부에 위치하게 된다. 친핵성 및 친전자성 부위 예를 들어, 아민, 티올, 히드라지드, 히드라진, 알콜, 카복실레이트, 알데하이드, 케톤, 티오에스테르 등은 당 업자에게 널리 공지되어 있다.

[0237] 더욱 구체적으로, 아세틸렌-함유 PEG 유도체의 경우, 하나 이상의 활성 히드록실 부위를 보유하는 수용성 중합체는 할로겐 또는 기타 활성화된 이탈기와 아세틸렌 부위를 포함하는 전구체를 치환하는 반응을 수행한다. 대안적으로, 하나 이상의 활성 친핵성 또는 친전자성 부위를 보유하는 수용성 중합체는 한쪽 말단에 아세틸렌을 보유하는 결합제와의 반응을 수행하여, 그 결과 PEG 중합체와 결합제 사이에 공유 결합을 형성하고, 아세틸렌 부위는 중합체의 말단부에 위치하게 된다. 유기 합성법 및 제조법에서 할로겐 부위, 활성화 이탈기, 친핵성 및 친전자성 부위를 사용하고, PEG 유도체를 사용하는 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다.

[0238] 본 발명은 또한 변형된 단백질에 기타의 물질 예를 들어, 수용성 중합체 예를 들어, PEG 및 아지드 또는 아세틸

렌 기를 포함하는 PEG 유도체를 부가하는 단백질의 선택적 변형 방법을 제공한다. 상기 아지드- 및 아세틸렌-함유 PEG 유도체는, 생체 적합성, 안정성, 가용성 및 면역원성 소멸이 중요한 경우, 표면 및 분자 특성을 변형시키는데에 사용될 수 있으며, 또한 단백질에 PEG 유도체를 결합시키는, 이전에 당 업계에 공지된 경우보다 선택적인 수단을 제공한다.

[0239] II. 항원-결합 폴리펩티드

ABP로서는 다양한 것이 있다. ABP는 다양한 항원에 특이적이다. 뿐만 아니라, 항원-특이적인 다양한 ABP 단편이 다수 존재한다. 그러므로 ABP는 표적 분자 또는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 나타내는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 임의의 공지된 항체 또는 항체 단편은 ABP이다.

본 발명의 ABP는 Fc 부분 또는 Fc-유사 부분을 포함할 수 있다. 상기 Fc 영역은 효과기 작용 예를 들어, 보체 또는 식균 세포에 대하여 결합을 제공한다. 면역 글로불린의 Fc 부분은 혈장 반감기가 긴 반면에, Fab은 수명이 짧다[Capon 외 다수 (1989), *Nature*, 337:525-531]. 치료적 단백질이 함께 구성되면, Fc 영역은 보다 긴 반감기를 제공할 수 있거나, 또는 Fc 수용체 결합, 단백질 A 결합, 보체 고정화 및 심지어 태반 이동에 이르기까지 여러 기능을 삽입할 수 있다. 예를 들어, IgG1 항체의 Fc부는 CD30-L 즉, 호지킨병 종양 세포, 미분화 림프종 세포, T-세포 백혈병 세포 및 기타 악성 세포형 상에서 발현되는 CD30 수용체에 결합하는 분자의 N-말단부에 융합된다[미국 특허 제 5,480,981 호]. IL-10, 소염제 및 거부반응 억제제는 시토킨의 짧은 혈류 내 반감기를 증가시키기 위하여 쥐의 Fc γ 2a에 융합된다. 문헌[Zheng, X. 외 다수 (1995), *The Journal of Immunology*, 154: 5590-5600]을 참조하시오. 연구에 따르면, 인간 IgG1의 Fc 단백질에 결합된 종양 괴사 인자 수용체를 사용하면 패혈성 쇼크 환자를 치료할 수 있는 것으로 밝혀진 바 있다. 문헌[Fisher, C. 외 다수, *N. Engl. J. Med.*, 334: 1697-1702 (1996); Van Zee, K. 외 다수, *The Journal of Immunology*, 156: 2221-2230 (1996) 및 *rheumatoid arthritis* (Moreland 외 다수 (1997), *N. Engl. J. Med.*, 337(3): 141-147]을 참조하시오. Fc는 또한 CD4 수용체와 융합되어 AIDS 치료용 치료 단백질을 생산한다[Capon 외 다수 (1989), *Nature*, 337:525-531]. 뿐만 아니라, 인터루킨 2의 N-말단은 또한 IgG1 또는 IgG3의 Fc부에 융합되어 인터루킨 2의 짧은 반감기와 이의 전신 독성으로 인한 문제점을 극복하게 된다[Harvill 외 다수 (1995), *Immunotechnology*, 1: 95-105].

항체의 Fc부는 이황화 결합 또는 비 공유 화합에 의하여 이량체 또는 다량체 형태로 결합될 수 있는 단량체 폴리펩티드 절편으로 이루어져 있다는 사실은 널리 공지되어 있다. 원래 Fc 분자의 단량체 서브유닛 사이에 존재하는 분자간 이황화 결합의 수는 관련 항체의 종류(예를 들어, IgG, IgA, IgE) 또는 아류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2)에 따라서 1~4개이다. 본원에 사용된 "Fc"란 용어는, 단량체, 이량체 및 다량체 형태인 Fc 분자에 일반적으로 사용되는 용어이다. Fc 단량체는 이황화 결합 형성을 통하여 이량체화되는 것을 막아주는 특정한 조건이 존재하지 않으면, 적당한 Cys 잔기가 존재할 때 자발적으로 이량체화될 것이라는 사실에 주목해야 한다. 심지어 정상적으로 Fc 이량체 내에 이황화 결합을 형성하는 Cys 잔기가 다른 잔기에 의하여 제거 또는 치환되면, 일반적으로 단량체 사슬은 비 공유 상호 작용에 의해 이량체화 될 것이다. 본원에 있어서 "Fc"란 용어는, 다음과 같은 형태들 중 임의의 것을 의미하는 것으로 사용된다: 원래 단량체, (이황화 결합된) 원래 이량체, (이황화 및/또는 비 공유 결합된) 변형된 이량체, 및 변형된 단량체(즉, 유도체).

Fc 부분의 변이체, 유사체 또는 유도체는 예를 들어, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 잔기 또는 서열을 다양하게 치환시켜 구성될 수 있다. 변이체(또는 유사체) 폴리펩티드는 삽입 변이체를 포함하는데, 여기서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 Fc 아미노산 서열을 보충한다. 삽입은 단백질의 어느 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 위치할 수 있거나, 또는 Fc 아미노산 서열의 내부 영역내에 위치할 수 있다. 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 부가 잔기를 보유하는 삽입 변이체는 예를 들어, 융합 단백질 및 아미노산 태그 또는 표지를 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 분자는 특히 이 분자가 박테리아 세포 예를 들어, 이.콜라이 내에서 재조합 발현될 때 N-말단 Met를 함유할 수도 있다. Fc 결실 변이체에 있어서는, Fc 폴리펩티드 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되어 있다. 결실은 Fc 폴리펩티드의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 발생할 수 있거나, 또는 Fc 아미노산 서열 내의 하나 이상의 잔기가 제거되어 발생할 수 있다. 그러므로, 결실 변이체는 Fc 폴리펩티드 서열의 모든 단편을 포함한다. Fc 치환 변이체에 있어서, Fc 폴리펩티드 중 하나 이상의 아미노산 잔기는 제거되어 다른 잔기로 치환되어 있다. 하나의 측면에서, 치환은 천연에서 보존적이지만, 본 발명은 비 보존적이기도 한 치환을 포함한다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 결실되거나 또는 다른 아미노산으로 치환되어, Fc 서열의 이황화 가교의 일부 또는 전부의 형성을 억제한다. 단백질은 하나 이상의 시스테인 잔기를 보유할 수 있고, 이 시스테인 잔기 각각을 제거할 수 있거나 또는 하나 이상의 시스테인 잔기를 기타 아미노산 예를 들어, Ala 또는 Ser, 또는 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환할 수 있다. 다른 실시예로서, 변형은 또한 (1) Fc 수용체 결합 위치를 제거하고; (2) 보체(C1q) 결합 위치를 제거하며/제거하거나; (3) 항체 의존성 세포 매개 세포 독성

(ADCC) 위치를 제거하는 아미노산 치환을 도입하도록 가하여질 수 있다. 이러한 위치는 당 업계에 공지되어 있으며, 임의의 공지된 치환은 본원에 사용된 Fc의 범위 내에 있다. 예를 들어, IgG1내 ADCC 위치에 관한 문헌 [Molecular Immunology, Vol. 29, No. 5, 633-639 (1992)]을 참조하시오. 이와 유사하게, 하나 이상의 티로신 잔기는 또한 페닐알라닌 잔기로 치환될 수 있다. 뿐만 아니라, 기타 변이체 아미노산 삽입, 결실(예를 들어, 1 ~25개 아미노산) 및/또는 치환도 고려할 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 일반적으로 보존적 아미노산 치환이 바람직할 것이다. 더욱이, 변형은 변형된 아미노산 예를 들어, 웨티도모의체 또는 D-아미노산의 형태로 존재할 수 있다.

[0244] 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환 이외의 변형을 포함하는 Fc 서열도 또한 유도체화 될 수 있다. 바람직하게, 상기 변형은 천연에서 공유 결합되어 있으며, 예를 들어, 중합체, 지질, 기타 유기 부위 및 무기 부위와의 화학 결합을 포함한다. 본 발명의 유도체는 혈류 내 반감기를 증가시키도록 제조될 수 있거나, 또는 폴리펩티드를 목적으로 하는 세포, 조직 또는 기관에 표적화시키는 능력을 개선시키도록 고안될 수 있다. 또한, 문헌[WO 96/32478, 발명의 명칭: "Altered Polypeptides with Increased Half-Life"]에 기술되어 있는 바와 같이, 원상태의 Fc 분자의 구조 수용체 결합 영역을 본 발명의 화합물의 Fc 부분으로서 사용할 수도 있다. 본원에서 Fc로서 지정된 문자 군의 부가적 일원들에 관하여는 문헌[WO 97/34631, 발명의 명칭:"Immunoglobulin-Like Domains with Increased Half- Lives"]에 기술되어 있다. 본 단락에 인용된 공개 PCT 출원들은 둘 다 본원에 참고용으로 인용되어 있다.

[0245] 이와 유사하게, 앞으로도 ABP가 추가로 발견될 것이다. 신규의 ABP는 예상 단백질 서열의 컴퓨터-원조 2차 및 3 차 구조 분석법을 통하여, 그리고 특정 표적에 결합하는 분자를 확인하도록 고안된 선택 기술에 의하여 확인될 수 있다.

[0246] 그러므로, ABP에 관한 설명은 예시적 목적으로 제공된 것으로서, 단지 예를 든 것이지 본원에 기술된 방법, 조성물, 방안 및 기술의 범위를 한정하는 것은 아니다. 뿐만 아니라, 본 출원의 ABP에 관한 용어는 임의의 ABP의 예로서 일반적으로 사용되는 용어이다. 그러므로, 특이적 항원-결합 폴리펩티드 또는 단백질과 관련하여 본원에 기술된 변형 방법 및 화학적 방법은, 본원에 구체적으로 언급된 임의의 항원-결합 폴리펩티드에 동일하게 적용될 수 있다.

III. 본 발명에 사용하기 위한 일반적 혼산 재조합 방법

[0248] 본 발명의 다수의 구체예에서, 목적 ABP를 코딩하는 핵산은 분리, 클로닝될 것이며, 종종 재조합 방법을 통하여 변형되기도 할 것이다. 이러한 구체예는 예를 들어, 단백질 발현에 사용되거나 또는 변이체, 유도체, 발현 카세트 또는 항원-결합 폴리펩티드로부터 유래된 기타 서열의 생산에 사용된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 이종 프로모터에 작동 가능하도록 결합되어 있다.

[0249] 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 근원 폴리펩티드의 아미노산 서열을 바탕으로 하여 합성된 후 뉴클레오티드 서열을 변형시켜, 관련 아미노산 잔기(들)를 도입(즉, 삽입 또는 치환) 또는 제거(즉, 결실 또는 치환) 할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 종래의 방법에 따라서 위치-배향 돌연변이 유발법에 의하여 편리하게 변형될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 서열은 화학적 합성법 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 합성제를 사용하는 방법에 의해, 그리고 바람직하게는 재조합 폴리펩티드가 합성될 숙주 세포 내에 선호적으로 존재하는 코돈을 선택함으로써 제조될 수 있는데, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 바탕으로 하여 고안된다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 일부를 코딩하는 몇몇 소 올리고뉴클레오티드는 합성되어, PCR, 결찰 또는 결찰 연쇄 반응에 의해 조립된다. 예를 들어, 본원에 참고용으로서 인용되어 있는 문헌[예를 들어, Barany와 다수, Proc. Natl. Acad. Sci 88: 189-193 (1991); 미국 특허 제 6,521,427 호]을 참조하시오.

[0250] 본 발명은 재조합 유전학 분야에 속하는 통상의 기술을 이용한다. 본 발명에 사용된 일반적인 방법이 개시되어 있는 문헌으로서는 다음과 같은 문헌들을 포함한다: Sambrook와 다수, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel와 다수, eds., 1994)).

[0251] 분자 생물학적 기술을 개시하고 있는 일반적인 문헌으로서는 다음의 것들을 포함한다: Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook와 다수, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") 및 Current Protocols in

Molecular Biology, F.M. Ausubel 외 다수, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. 및 John Wiley & Sons, Inc., (1999년 증보판) ("Ausubel"). 상기 문헌들에는 돌연변이 유발법, 벡터, 프로모터의 사용 및, 예를 들어, 인공적 아미노산, 직교 tRNA, 직교 합성효소 및 이들의 쌍을 포함하는 단백질 생산용 선택자 코돈을 포함하는 유전자의 제조와 관련된 다수의 기타 관련 주제에 관하여 개시되어 있다.

[0252] 예를 들어, tRNA 라이브러리의 제조, 합성효소 라이브러리의 제조, 선택자 코돈의 제조, 목적 단백질 또는 폴리펩티드 내에 인공적 아미노산을 코딩하는 선택자 코돈의 삽입과 같이, 여러 가지 목적으로서 다양한 유형의 돌연변이 유발법이 본 발명에 사용된다. 이와 같은 돌연변이 유발법으로서는 예를 들어, 위치-배향성, 랜덤 점 돌연변이 유발법, 상동 재조합법, DNA 셔플링 또는 기타 반복적 돌연변이 유발법, 키메라의 구성, 우라실 함유 주형을 사용하는 돌연변이 유발법, 올리고뉴클레오티드-배향 돌연변이 유발법, 포스포로티오에이트-변형 DNA 돌연변이 유발법, 캡 형성 이중체 DNA를 사용하는 돌연변이 유발법, 또는 이들 방법의 임의의 병용법을 포함한다. 추가의 적당한 방법으로서는 점 미스매치 수선법, 수선-결실 숙주 변종을 사용하는 돌연변이 유발법, 제한-선택법 및 제한-정제법, 결실 돌연변이 유발법, 전체 유전자 합성에 의한 돌연변이 유발법 및 이중 사슬 파괴 수선법을 포함한다. 예를 들어, 키메라 구조물이 관여하는 돌연변이 유발법도 또한 본 발명에 포함된다. 하나의 구체예에서, 돌연변이 유발법은 천연 발생 분자 또는 변형되었거나 돌연변이된 천연 생성 분자에 대한 공지의 정보 예를 들어, 서열, 서열 비교, 물리적 특성, 2차, 3차 또는 4차 구조, 결정 구조 등에 의하여 유도될 수 있다.

[0253] 본원에서 살펴볼 수 있는 문헌 및 실시예는 이러한 방법에 관하여 기술하고 있다. 추가의 정보는 다음과 같은 문헌 및 이에 인용되어 있는 참고 문헌에 기술되어 있다: Ling 외 다수, *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, *Anal. Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale 외 다수, *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, *In vitro mutagenesis*, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, *Site-directed mutagenesis*, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel 외 다수, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass 외 다수, *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, *Science* 242:240-245 (1988); *Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor 외 다수, *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor 외 다수, *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (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 외 다수, *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers 외 다수, *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 외 다수, *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 외 다수, *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz 외 다수, *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer 외 다수, *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); Carter와 다수, 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); Eghezade & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Wells와 다수, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Nambiar와 다수, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Wells와 다수, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Grundstrom와 다수, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Mandelkow, 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); Sieber와 다수, Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); 및 I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995). 상기 방법에 관한 부가 설명은 문헌[Methods in Enzymology Volume 154]에서 살펴볼 수 있으며, 이 문헌에는 다양한 돌연변이 유발법으로 인한 문제점을 해결하는데 유용한 조절법에 관하여 개시되어 있다.*

[0254]

본 발명은 또한 오르토고날 tRNA/RS 쌍을 통하여 인공적 아미노산을 생체 내 삽입시키기 위한 진핵 숙주 세포, 비 진핵 숙주 세포 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 구조물을 예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 예를 들어, 본 발명의 벡터로 유전자 조작(예를 들어, 형질 전환, 형질 도입 또는 형질 감염)된다. 예를 들어, 상기 벡터는 플라스미드, 박테리아, 바이러스, 노출 폴리뉴클레오티드(naked polynucleotide) 또는 컨쥬케이트화된 폴리뉴클레오티드의 형태일 수 있다. 상기 벡터는 표준적인 방법 예를 들어, 전기 천공법[From와 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824(1985)], 바이러스 벡터에 의한 감염, 작은 비드 또는 입자의 매트릭스 내부 또는 그 표면상에 핵산을 보유하는 소립자에 의한 고속 탄도 침투법(high velocity ballistic penetration)[Klein와 다수, Nature 327, 70-73 (1987)]에 의하여 세포 및/또는 미생물에 도입된다.

[0255]

조작된 숙주 세포는 임의의 작업 예를 들어, 스크리닝 단계, 프로모터 활성화 단계 또는 형질 전환체 선택 단계에 적당하도록 개질된 통상의 영양 배지 중에서 배양될 수 있다. 이러한 세포는 트랜스게닉 유기체 내에서 배양될 수도 있다. 예를 들어, 세포 분리 및 배양(예를 들어, 후속 핵산 분리)에 관한 기타 유용한 참고 문헌으로서는 다음의 문헌들을 포함한다: Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York 및 여기에 인용된 참고 문헌들; Payne와 다수 (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) 및 Atlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

[0256]

표적 핵산을 세포 내에 도입시키는 널리 공지된 몇몇 방법은 본 발명에서 사용될 수 있는 임의의 방법으로서 적합하다. 이러한 방법으로서는 다음과 같은 것들을 포함한다: DNA를 함유하는 박테리아 원형질과 수용성 세포의 융합법, 전기 천공법투사 충격법 및 바이러스 벡터 감염법(이하 상세히 설명함) 등. 박테리아 세포는 본 발명의 DNA 구조물을 함유하는 플라스미드의 수를 증폭시키는데에 사용될 수 있다. 박테리아는 대수기까지 성장하게 되며, 박테리아 내 플라스미드는 당 업계에 공지된 다수의 방법에 의하여 분리될 수 있다[예를 들어, Sambrook 참조]. 뿐만 아니라, 박테리아로부터 플라스미드를 정제하는데 사용되는 다수의 키트가 시판중에 있다[예를 들어, Pharmacia Biotech사의 EasyPrep(상표명), FlexiPrep(상표명); Stratagene사의 StrataClean(상표명) ; 및 Qiagen사의 QIAprep(상표명)]. 이후 분리 및 정제된 플라스미드는 추가로 조작되어, 세포를 형질 감염시키는데 사용되는 기타 플라스미드를 제조하거나, 또는 관련 벡터에 삽입되어 유기체를 감염시키게 된다. 통상의 벡터는 전사 및 번역 종결자, 전사 및 번역 개시 서열, 그리고 특정 표적 핵산의 발현을 조절하는데 유용한 프로모터를 포함한다. 상기 벡터는 하나 이상의 독립적 종결 서열, 진핵 생물 또는 원핵 생물 또는 둘 다에서 카세트를 복제시킬 수 있는 서열(예를 들어, 서틀 벡터), 그리고 원핵계 및 진핵계 모두에 대한 선별 마커를 함유하는 일반적인 발현 카세트를 포함한다. 벡터는 원핵 생물, 진핵 생물, 또는 이 둘 다에서 복제 및 삽입화되는데 적당하

다. 예를 들어, 문헌[Giliman & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts와 다수, *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, B.와 다수, *Protein Expr. Purif.* 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (상동)]을 참조하시오. 클로닝에 적합한 박테리아 및 박테리오파지의 카타로그는 예를 들어, ATCC[예를 들어, ATCC에 의해 발행된 "The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage"(1992) Gherna와 다수 (eds)]에 의해 제공된다. 서열 결정, 클로닝 및 분자 생물학에 관한 기타 관점에 대한 추가의 기초적인 방법과 여기에 내재된 이론에 관하여는 또한 문헌[Watson와 다수 (1992) *Recombinant DNA Second Edition* Scientific American Books, NY]에 기술되어 있다. 뿐만 아니라, 본질적으로 임의의 핵산(및 실질적으로 표지화된 임의의 표준적 또는 비표준적 핵산)은 예를 들어, 미들랜드 서티파이드 리에이전트 컴퍼니(Midland Certified Reagent Company ; Midland, TX; www.mcrc.com), 더 그레이트 아메리칸 진 컴퍼니(The Great American Gene Company; Ramona, CA ; www.genco.com), 익스프레스젠 인코포레이티드(ExpressGen Inc.; Chicago, IL; www.expressgen.com), 오페론 테크놀로지(tm) 인코포레이티드(Operon Technologies Inc.; Alameda, CA) 등과 같은 다수의 상업적 공급원 중 임의의 공급원으로부터 주문 생산되거나 또는 통상적으로 주문될 수 있다.

[0257] 선택자 코돈(selector codon)

본 발명의 선택자 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 구조들을 확장시킨다. 예를 들어, 선택자 코돈은 예를 들어, 특이한 3염기 코돈, 넌센스 코돈 예를 들어, 종결 코돈 예를 들어, 앰버 코돈(UAG) 또는 오페론 코돈(UGA), 인공적 코돈, 4개 이상의 염기 코돈, 희귀 코돈 등을 포함한다. 원하는 유전자에 도입될 수 있는 선택자 코돈의 수는 광범위하다는 사실 예를 들어, 최소한 ABP의 일부를 코딩하는 단일의 폴리뉴클레오티드 내에 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상이라는 사실을 당업자는 용이하게 파악하게 된다.

하나의 구체예에서, 본 발명의 방법은 진핵 생물 세포 내 즉, 생체 내에서 인공적 아미노산을 삽입시키기 위하여, 종결 코돈인 선택자 코돈을 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, O-tRNA는 종결 코돈 예를 들어, UAG를 인지하도록 제조되어, 목적으로 하는 인공적 아미노산과 함께 O-RS에 의해 아미노 아실화된다. 이러한 O-tRNA는 숙주의 천연 발생 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 인지되지 않는다. 종래의 위치-배향 돌연변이 유발법은 종결 코돈 예를 들어, TAG를 목적 폴리펩티드의 목적 위치에 도입시키는데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sayers, J.R.와 다수 (1988), 5',3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, 791-802]을 참조하시오. O-RS, O-tRNA 및 목적 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 생체 내에서 합체되면, 인공적 아미노산은 UAG 코돈에 따라서 삽입되어 특정 위치에 인공적 아미노산을 함유하는 폴리펩티드가 생성된다.

생체 내 비 천연 아미노산의 삽입은 진핵 숙주 세포를 거의 동요시키지 않고 수행될 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효능은 O-tRNA 예를 들어, 앰버 억제 tRNA 와, 진핵 생물 세포 방출 인자(예를 들어, eRF)(종결 코돈에 결합하여, 성장중인 웨პ티드를 리보솜으로부터 방출시키기 시작하는 인자) 사이에서의 경쟁에 따라서 달라지기 때문에, 억제 효능은 예를 들어, O-tRNA, 및/또는 억제 tRNA의 발현 수준을 높힘으로써 조절될 수 있다.

선택자 코돈은 또한 연장된 코돈 예를 들어, 하나 이상의 염기 코돈 예를 들어, 4개, 5개 또는 6개 이상의 염기 코돈을 포함한다. 4 염기 코돈의 예로서는 AGGA, CUAG, UAGA 및 CCCU 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 5 염기 코돈의 예로서는 AGGAC, CCCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 특징은 구조를 억제를 바탕으로 하여 연장된 코돈을 이용하는 것을 포함한다. 4개 이상의 염기 코돈은 예를 들어, 하나 또는 다수개의 인공적 아미노산을 동일한 단백질에 삽입할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이된 O-tRNA 예를 들어, 안티코돈 루프, 8~10 nt 이상의 안티코돈 루프가 존재하는, 특정 구조를 억제 tRNA가 존재하면, 4개 이상의 염기로 된 코돈은 단일 아미노산인 것으로 해독된다. 다른 구체예에서, 안티코돈 루프는 예를 들어, 4개 이상의 염기로 된 코돈, 5개 이상의 염기로 된 코돈, 또는 6개 이상의 염기로 된 코돈을 복호(decode)시킬 수 있다. 256개의 가능한 4 염기 코돈이 존재하므로, 다수의 인공적 아미노산은 4개 이상의 염기 코돈을 사용하여 동일한 세포 내에서 코딩될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Anderson와 다수, (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]을 참조하시오.

예를 들어, 4 염기 코돈은 시험관 내 생합성법을 이용하여 인공적 아미노산을 단백질에 삽입시키는데에 사용된

다. 예를 들어, 문헌[예를 들어, Ma와 다수, (1993) *Biochemistry*, 32:7939; 및 Hohsaka와 다수, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:34]을 참조하시오. CGGG 및 AGGU는 시험관 내에서 2개의 화학적으로 아실화된 구조를 억제 tRNA와 함께 2-나프틸알라닌 및 리신의 NBD 유도체를 스트렙타비딘에 동시 삽입시키는데 사용된다. 예를 들어, 문헌[Hohsaka와 다수, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194]을 참조하시오. 생체 내 연구에 있어서, Moore와 다수는 NCUA 안티코돈을 보유하는 tRNALeu 유도체가 UAGN 코돈(여기서, N은 U, A, G, 또는 C일 수 있음)을 억제하는 능력에 관하여 조사한 바 있으며, 또한 4개 한 세트인 UAGA는 UCUA 안티코돈을 보유하는 tRNALeu에 의해 0 또는 -1 해독률 내에서 거의 복호화되지 않도록 13~26%의 효율로 복호화될 수 있다는 사실을 알아냈다. 문헌[Moore와 다수, (2000) *J. Mol. Biol.*, 298:195]을 참조하시오. 하나의 구체예에서, 희귀 코돈 또는 넌센스 코돈을 바탕으로 한 연장 코돈이 본 발명에 사용될 수 있으며, 이 코돈으로 인하여 기타의 원치 않는 위치에서 미스센스 통독(missense readthrough) 및 구조를 억제를 감소시킬 수 있게 된다.

[0263] 소정의 시스템에 있어서, 내인성 시스템이 천연의 염기 코돈을 사용하지 않는 경우(또는 드물게 사용하는 경우), 선택자 코돈은 또한 천연의 3 염기 코돈 중 하나를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 이 시스템은 천연 3 염기 코돈을 인지하는 tRNA가 흡결된 시스템 및/또는 3 염기 코돈이 희귀 코돈인 시스템을 포함한다.

[0264] 선택자 코돈은 인공적 염기쌍을 포함할 수도 있다. 이러한 인공적 염기쌍은 현존하는 유전자 알파벳을 추가로 늘릴 수도 있다. 하나의 잉여 염기쌍은 3중 코돈의 수를 64개에서 125개로 늘린다. 세 번째 염기쌍의 특성으로서는, 안정하고 선택적인 염기쌍의 형성, 높은 신뢰도로 중합 효소에 의하여 DNA에 효율적으로 효소 삽입시키는 것, 그리고 초기의 인공적 염기쌍 합성 후 프라이머를 효율적으로 계속 연장시키는 것을 포함한다. 방법 및 조성물에 적용될 수 있는 인공적 염기쌍에 관한 설명은 예를 들어, 문헌[Hirao와 다수, (2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, *Nature Biotechnology*, 20:177-182]에 기술되어 있다. 기타 관련 공보는 이하에 나열하였다.

[0265] 생체 내 사용에 있어서, 인공적 뉴클레오시드는 막 투과성으로서, 인산화되어 해당하는 트리포스페이트를 형성 한다. 뿐만 아니라, 증가된 유전 정보는 안정하여 세포 효소에 의하여 파괴되지 않는다. Benner와 다수에 의한 이전의 연구에서는 정규의 왓슨-크릭 쌍에서와는 상이한 수소 결합 패턴을 활용하였으며, 가장 대표적인 예는 이소-C:이소-G 쌍이다. 예를 들어, 문헌[Switzer와 다수, (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; 및 Piccirilli 와 다수, (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602]을 참조하시오. 일반적으로 염기들은 어느 정도 천연 발생 염기와 잘못 쌍을 이루어 효소에 의해 복제될 수 없는 경우가 있을 수 있다. Kool 및 공동 연구자들은 염기들 간 소수성 짹킹 상호 작용은 수소 결합을 치환시켜 염기쌍을 형성시킬 수 있다는 사실을 입증하였다. 문헌[Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602; 및 Guckian and Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825]을 참조하시오. 전술한 모든 조건을 만족시키는 인공적 염기쌍을 개발 하려는 노력에 있어서, Schultz, Romesberg 및 공동 연구자들은 일련의 인공적 소수성 염기를 체계적으로 합성하여 연구하였다. PICS:PICS 자가-쌍은 천연 염기쌍보다 더 안정한 것으로 밝혀졌으며, 이는 에스케리챠 콜라이의 DNA 중합 효소 I의 Klenow 단편(KF)에 의해 DNA에 효과적으로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 문헌[McMinn와 다수, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11586; 및 Ogawa와 다수, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274]을 참조하시오. 3MN:3MN 자가-쌍은 생물학적 기능에 충분한 효능과 선택성을 가지고 KF로 합성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ogawa와 다수, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803]을 참조하시오. 그러나, 상기 염기 둘 다는 추가의 복제를 위한 사슬 종결자로서 작용을 한다. 최근 들어, 돌연변이 DNA 중합 효소는 PICS 자가 쌍을 복제하는데 사용될 수 있도록 진화되었다. 뿐만 아니라, 7AI 자가쌍은 복제될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tae와 다수, (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439]을 참조하시오. 신규의 금속 염기쌍(metallobase pair)인, Dipic:Py도 또한 개발되었는데, 이는 Cu(II)와 결합할 때 안정한 쌍을 형성한다. 문헌[Meggers와 다수, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714]을 참조하시오. 연장된 코돈 및 인공적 코돈이 본질적으로 천연 코돈에 대하여 오르토고날이기 때문에, 본 발명의 방법은 오르토고날 tRNA를 생성하는 특성을 이용할 수 있다.

[0266] 번역 통과 시스템(translation bypassing system)은 또한 인공적 아미노산을 목적 폴리펩티드에 삽입시키는데 사용될 수 있다. 번역 통과 시스템에서, 큰 서열은 유전자에 삽입되지만, 단백질로 번역되지는 않는다. 이 서열은 리보좀이 서열을 건너뛰도록 유도하고 삽입부 하류에서 번역을 재개하는 신호로서의 역할을 하는 구조를 포함한다.

[0267] 임의의 구체예에서, 본 발명의 방법 및/또는 조성물에 사용되는 목적 단백질 또는 폴리펩티드(또는 이의 일부)는 핵산에 의하여 코딩된다. 통상적으로, 핵산은 하나 이상의 선택자 코돈, 2개 이상의 선택자 코돈, 3개 이상의 선택자 코돈, 4개 이상의 선택자 코돈, 5개 이상의 선택자 코돈, 6개 이상의 선택자 코돈, 7개 이상의 선택

자 코돈, 8개 이상의 선택자 코돈, 9개 이상의 선택자 코돈, 10개 이상의 선택자 코돈을 포함한다.

[0268] 목적 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 당 업자에게 널리 공지되어 있고 본원에도 기술되어 있는 방법을 사용하여 돌연변이가 유발되어, 예를 들어, 인공적 아미노산을 삽입하기 위한 하나 이상의 선택자 코돈을 포함할 수 있다. 예를 들어, 목적 단백질에 대한 핵산은 돌연변이 유발되어, 하나 이상의 인공적 아미노산을 삽입시키기 위해 제공되는 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하게 된다. 본 발명은 이와 같은 임의의 변이체 예를 들어, 돌연변이체, 예를 들어, 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 임의의 단백질을 포함한다. 이와 유사하게, 본 발명은 또한 해당 핵산 즉, 하나 이상의 인공적 아미노산을 코딩하는 하나 이상의 선택자 코돈을 보유하는 임의의 핵산을 포함한다.

[0269] 목적 단백질 예를 들어, ABP를 코딩하는 핵산 분자는 용이하게 돌연변이되어 폴리펩티드 중 임의의 목적 위치에 시스테인을 도입할 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 중합체, 단백질 또는 다양한 기타 분자들을 목적 단백질 상에 도입시키는데에 널리 사용된다. 시스테인을 항원-결합 폴리펩티드의 목적 위치에 삽입시키기에 적당한 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 그 예로서는, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,608,183 호의 방법 및 표준적인 돌연변이 유발 기술이 있다.

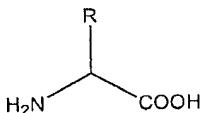
IV. 비-천연적으로 코딩된 아미노산

[0271] 다양한 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 본 발명에 사용하기에 적당하다. 임의의 수의 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 ABP에 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 실질적으로 20개의 공통 아미노산인, 유전적으로 코딩된 아미노산(즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린)에 대하여 화학적으로 비활성이다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 공통 아미노산에서 발견되지 않는 작용기(예를 들어, 아지도, 케톤, 알데히드 및 아미노옥시 기)와 효과적이고 선택적으로 반응하여 안정한 컨쥬게이트를 형성하는 측쇄 작용기를 포함한다. 예를 들어, 아지도 작용기를 함유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 중합체(예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜)), 또는 알킬 부위를 함유하는 제2 폴리펩티드와 반응하여, 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응 생성물을 생성하는 아지도 및 알킨 작용기의 선택적 반응을 통하여 생성되는 안정한 컨쥬게이트를 형성할 수 있다.

[0272] 알파-아미노산의 일반적인 화학식은 다음과 같다(화학식 I).

[화학식 I]

I



[0274]

[0275] 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 통상적으로 상기 화학식(식 중, R기는 20개의 천연 아미노산에 사용되는 치환기 이외의 임의의 치환기임)을 보유하는 임의의 구조를 가지며, 이는 본 발명에 사용하기 적당하다. 본 발명의 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 통상적으로 측쇄 구조 내에만 존재하는 천연 아미노산과 상이하기 때문에, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 천연 발생된 폴리펩티드 내에 형성되는 아미노산과 동일한 방식으로 다른 아미노산 예를 들어, 천연 또는 비-천연적으로 코딩된 아미노산과 아미드 결합을 형성한다. 그러나, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 천연 아미노산과 구별되는 측쇄를 갖는다. 예를 들어, R은 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 히드록실-, 히드라진, 시아노-, 할로-, 히드라지드, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 설포닐-, 봉산염, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 복소환, 에논, 이민, 알데히드, 에스테르, 티오산, 히드록실아민, 아미노기 등 또는 이들을 조합하여 포함할 수도 있다. 목적으로 하는 기타의 비 천연 발생 아미노산이 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는데, 그 예로서는 광활성화 가교제 포함 아미노산, 스플 표지 아미노산, 형광 아미노산, 금속 결합 아미노산, 금속 함유 아미노산, 방사성 아미노산, 신규의 작용기를 보유하는 아미노산, 기타 분자와 공유적 또는 비공유적으로 상호 작용하는 아미노산, 포토케이지화 및/또는 광이성화 아미노산, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 포함하는 아미노산, 당화 아미노산 예를 들어, 당 치환 세린, 기타 탄수화물 변형 아미노산, 케토-함유 아미노산, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르 포함 아미노산, 중원자 치환된 아미노산, 화학 절단 및/또는 광 절단 아미노산, 천연 아미노산에 비하여 측쇄가 연장된 아미노산 예를 들어, 폴리에테르 또는 장쇄 탄화수소 예를 들어, 약 5개 이상 또는 약 10개 이상의 탄소를 보유하는 탄소-결합

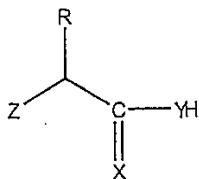
당 함유 아미노산, 산화 환원-활성 아미노산, 아미노산을 함유하는 아미노 티오산, 및 하나 이상의 독성 부위를 포함하는 아미노산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0276] 본 발명에 사용하기에 적당할 수 있으며 수용성 중합체와의 반응에 유용한 대표적 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로서는, 카보닐, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드, 세미카바지드, 아지드 및 알킨 반응기를 보유하는 아미노산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 당 부위를 포함한다. 이러한 아미노산의 예로서는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린을 포함한다. 이러한 아미노산의 예로서는 또한 아미노산과 당 사이에 천연 발생 N-결합 또는 O-결합이 천연에서는 일반적으로 발견되지 않는 공유 결합[예를 들어, 알켄, 옥심, 티오에테르, 아미드등]에 의하여 치환되는 경우의 것을 포함한다. 이러한 아미노산의 예로서는 천연 발생 단백질에서는 일반적으로 발견되지 않는 당 예를 들어, 2-데옥시-글루코즈, 2-데옥시갈락토즈 등을 포함한다.

[0277] 본원에 제공되어 있는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 대다수가 시판중에 있는데, 그 판매원의 예로서는, 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA), 노바바이오켐(EMD 바이오사이언시스의 지사)(Darmstadt, Germany) 또는 웹테크(Burlington, MA, USA)가 있다. 시판중이지 않은 아미노산들은 본원에 제시된 바와 같이, 또는 당 업자에게 공지되어 있는 표준 방법을 사용하여 합성될 수도 있다. 유기 합성 기술에 관하여는 문헌[예를 들어, *Organic Chemistry* by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 *Advanced Organic Chemistry* by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조하시오. 또한, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575 및 2003/0108885를 참조하시오. 신규의 측쇄를 함유하는 인공적 아미노산에 더하여, 본 발명에 사용하기에 적당할 수 있는 인공적 아미노산은 또한 변형된 골격 구조 예를 들어, 다음의 화학식 II 및 III의 구조를 포함할 수도 있다.

[0278] [화학식 II]

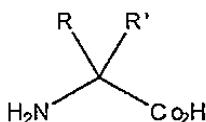
II



[0279]

[0280] [화학식 III]

III



[0281]

[0282] [상기 식 중, Z는 통상적으로 OH, NH₂, SH, NH-R', 또는 S-R'를 포함하고; 동일하거나 또는 상이할 수 있는 X 및 Y는 통상적으로 S 또는 O를 포함하며, 동일하거나 또는 상이할 수 있는 R 및 R'는 통상적으로 인공적 아미노산에 대하여 전술한 R기(화학식 I)의 성분에 관하여 나열된 것과 동일한 것 및 수소로부터 선택됨]

[0283] 예를 들어, 본 발명의 인공적 아미노산은 임의로는 화학식 II 및 화학식 III에 의하여 나타내어지는 아미노기 또는 카르복시기가 치환된 것을 포함한다. 이러한 유형의 인공적 아미노산으로서는, 예를 들어, 20개의 공통 천연 아미노산 또는 인공적 측쇄에 해당하는 측쇄를 보유하는, 예를 들어, α-히드록시산, α-티오산, α-아미노티오카복실레이트를 포함한다. 뿐만 아니라, α-탄소에서의 치환은 임의로는 L, D 또는 α-α-이치환 아미노산 예를 들어, D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-티로신, 아미노부티르산 등을 포함하나, 이에 한정되는 것

은 아니다. 기타 구조적 대체 아미노산으로서는 고리형 아미노산 예를 들어, 프롤린 유사체와, 3, 4, 6, 7, 8 및 9원 고리형 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산 예를 들어, 치환된 β -알라닌 및 γ -아미노 부티르산을 포함한다.

[0284] 다수의 인공적 아미노산은 천연 아미노산 예를 들어, 티로신, 글루타민, 페닐알라닌 등을 바탕으로 하며, 이는 본 발명에 사용하기에 적합하다. 티로신 유사체로서는 파라-치환 티로신, 오르토-치환 티로신, 그리고 메타 치환 티로신을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 여기서 상기 치환 티로신은 케토기(예를 들어, 아세틸기), 벤조일기, 아미노기, 히드라진, 히드록시아민, 티올기, 카르복시기, 이소프로필기, 메틸기, C_6 ~ C_{20} 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, 0-메틸기, 폴리에테르기, 니트로기, 알키닐기 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 뿐만 아니라, 다중 치환된 아릴 고리도 고려된다. 본 발명에 사용하기에 적당할 수 있는 글루타민 유사체로서는 α -히드록시 유도체, γ -치환 유도체, 고리형 유도체 및 아미드 치환 글루타민 유도체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적당할 수 있는 대표적인 페닐알라닌 유사체로서는 파라-치환 페닐알라닌, 오르토-치환 페닐알라닌 및 메타-치환 페닐알라닌을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 여기서 상기 치환기는 히드록시기, 메톡시기, 메틸기, 알릴기, 알데히드, 아지도, 요도, 브로모, 케토기(예를 들어, 아세틸기), 벤조일, 알키닐 기 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적당할 수 있는 인공적 아미노산의 구체예로서는, p-아세틸-L-페닐알라닌, 0-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, 0-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAc β -세린, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-요도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌 및 p-프로파길옥시-페닐알라닌 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 다양한 인공적 아미노산의 구조에 관한 예는 예를 들어, WO2002/085923(발명의 명칭:"In vivo incorporation of unnatural amino acids.")에 개시되어 있다. 또한 부가 메티오닌 유사체에 관하여는 문헌[Kiick의 다수, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24]를 참조하시오.

[0285] 하나의 구체예에서, 인공적 아미노산[예를 들어, p-(프로파길옥시)-페닐알라닌]을 포함하는 ABP의 조성물이 제공된다. p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 및 예를 들어, 단백질 및/또는 세포를 포함하는 다양한 조성물도 제공된다. 하나의 측면에서, p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 인공 아미노산을 포함하는 조성물은 추가로 오르토고날 tRNA를 포함한다. 인공적 아미노산은 상기 오르토고날 tRNA에 결합(예를 들어, 공유적으로 결합)될 수 있는데, 예를 들어, 아미노-아실 결합을 통하여 오르토고날 tRNA에 공유적으로 결합할 수 있거나, 또는 오르토고날 tRNA의 말단 리보즈 당의 3'OH 또는 2'OH에 공유적으로 결합할 수 있다.

[0286] 단백질에 삽입될 수 있는 인공적 아미노산을 통한 화학 부위는 다양한 이점을 부여하도록 단백질을 조작한다. 예를 들어, 케토 작용기의 독특한 반응성은 시험관 내 및 생체 내에서 다수의 히드라진- 또는 히드록실아민-함유 시약 중 임의의 것으로 단백질을 선택적으로 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 중원자 인공 아미노산은 X-선 구조 데이터를 추적하는데 유용할 수 있다. 인공 아미노산을 이용하는 중원자의 위치-특이적 도입법은 또한 중원자에 대한 위치를 선택함에 있어서 선택성과 유연성을 제공한다. 예를 들어, 광 반응성 인공 아미노산(예를 들어, 벤조페논 및 아릴아제드(예를 들어, 페닐아제드) 측쇄를 보유하는 아미노산은 단백질의 시험관 내 및 생체 내 광 가교 작용을 효율적으로 만든다. 광 반응성 인공 아미노산의 예로서는, p-아지도-페닐알라닌 및 p-벤조일-페닐알라닌을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이후 광 반응성 인공 아미노산을 보유하는 단백질은 광 반응기(일시적 제어를 제공함)를 여기 시킴으로써 의도하는 바에 따라서 가교 될 수 있다. 하나의 구체예에서, 인공 아미노산의 메틸기는, 예를 들어, 핵 자기 공명 및 진동 분광법을 이용하여 국소 구조 및 에너지에 대한 프로브인 예를 들어, 동위 원소 표지된 메틸기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 알키닐 또는 아지도 작용기는 [3 + 2] 고리 첨가 반응을 통하여 문자로써 단백질을 선택적으로 변형시킬 수 있다.

[0287] 폴리펩ти드의 아미노 말단에 삽입된 비 천연 아미노산은 20개의 천연 아미노산 및 α -아미노산(화학식 I)에 일반적으로 존재하는 NH₂기와 상이한 제2 반응기에 사용된 치환기 이외의 임의의 치환기인 R기를 포함할 수 있다. 유사한 비 천연 아미노산은 카르복시 말단에 α -아미노산(화학식 I)에 일반적으로 존재하는 COOH기와 상이한 제2 반응기가 삽입될 수 있다.

인공적 아미노산의 화학 합성

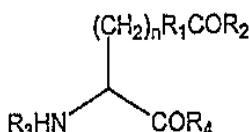
[0289] 본 발명에 사용하기에 적당한 다수의 인공적 아미노산은 예를 들어, 시그나(USA) 또는 알드리치(Milwaukee, WI, USA)로부터 시판되고 있다. 시판되고 있지 않은 아미노산은 임의로는 본원에 제공된 바와 같이, 또는 다수의 문

현에 제시된 바와 같이, 또는 당 업자에게 공지된 표준적인 방법을 사용하여 합성된다. 유기 합성 기술에 관하여는 문헌[예를 들어, *Organic Chemistry* by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 *Advanced Organic Chemistry* by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조하시오. 인공적 아미노산의 합성에 관하여 기술되어 있는 추가의 문헌으로서는, 문헌[예를 들어, WO 2002/085923(발명의 명칭:"In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids); Matsoukas 외 다수, (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) *A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) *Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J. C. 외 다수 (1988) *Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl] amino] quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) *Glutamine analogues as Potential Antimalarials. Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) *Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) *Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem.* 1989:1859-1866; Barton 외 다수, (1987) *Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron Lett.* 43:4297- 4308; 및 Subasinghe 외 다수, (1992) *Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem.* 35:4602-7]을 포함한다. 또한, 특허 출원[발명의 명칭:"Protein Arrays,"(2003년 12월 22일 출원, 출원 번호 제 10/744,899 호; 및 2002년 12월 22일 출원, 출원 번호 제 60/435,821 호]을 참조하시오.

[0290] A. 카보닐 반응기

[0291] 카보닐 반응기를 보유하는 아미노산은 다양한 반응에서 친핵성 부가 반응 또는 알돌 축합 반응을 통하여 분자 (예를 들어, PEG 또는 기타 수용성 분자)를 결합시킬 수 있다.

[0292] 대표적인 카보닐-함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0293]

[0294] [식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환 알킬 또는 치환 아릴이며; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환 알킬 및 치환 아릴이고; R₃는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이며; R₄는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0295] 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, R₂는 간단한 알킬(즉, 메틸, 에틸 또는 프로필)이고, 케톤 부위는 알킬 측쇄에 대하여 파라 위치에 위치한다. 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, R₂는 간단한 알킬(즉, 메틸, 에틸 또는 프로필)이고, 케톤 부위는 알킬 측쇄에 대하여 메타 위치에 위치한다.

[0296] p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성법은 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌 [Zhang, Z. 외 다수, *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003)]에 기술되어 있다. 기타 카보닐-함유 아미노산은 당 업자에 의하여 유사하게 제조될 수 있다.

[0297] 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 화학적으로 변형되어 반응성 카보닐 작용기를 생성한다. 예를 들어, 컨쥬게이트화 반응에 유용한 알데히드 작용기는 인접한 아미노 및 히드록실 기를 보유하는 작용기로부터 생성될 수 있다. 예를 들어, 생물 활성 분자기 폴리펩티드인 경우, N-말단 세린 또는 트레오닌(정상적으로 존재할 수 있거나, 또는 화학적 또는 효소적 절단에 의하여 노출될 수 있음)은 온화한 산화 절단 조건하에서 과요드산염을 사용하여 알데히드 작용기를 생성시키는데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문

현[Gaertner 외 다수, *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner 외 다수, *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994)]을 참조하시오. 그러나, 당 업계에 공지된 방법은 웨프티드 또는 단백질의 N-말단에 있는 아미노산에 제한된다.

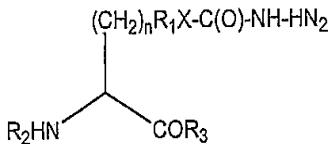
[0298] 본 발명에 있어서, 인접 히드록실 및 아미노 기를 보유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 폴리펩티드에 "마스킹된" 알데히드 작용기로서 삽입될 수 있다. 예를 들어, 5-히드록시리신은 앱실론 아민에 인접하여 히드록실 기를 보유한다. 알데히드를 생성하는 반응 조건은 온화한 조건하에서 몰 과량의 소듐 메타페리오데이트를 첨가하여 폴리펩티드 내 다른 위치에서의 산화를 방지하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 통상적으로 pH 약 7.0이다. 통상의 반응은 약 1.5 몰과량의 소듐 메타 페리오데이트를 폴리펩티드의 완충 용액에 가한 후, 이를 암실에서 약 10 분 동안 항온 처리하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,423,685 호를 참조하시오.

[0299] 카보닐 작용기는 온화한 조건하에 수용액 중에서 히드라진-, 히드라지드-, 히드록실아민- 또는 세미카바지드-함유 시약과 선택적으로 반응하여, 생리적 조건하에서 안정한 상응하는 히드라존, 옥심 또는 세미카바준 결합을 각각 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)]을 참조하시오. 뿐만 아니라, 카보닐기의 독특한 반응성으로 인하여 기타 아미노산 측 쇄의 존재하에 선택적 변형이 가능하다. 예를 들어, 문헌[Cornish, V. W. 외 다수, *Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K. dhl 다수, *Science* 276:1125-1128 (1997)을 참조하시오.

B. 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 반응기

[0301] 친핵기 예를 들어, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드를 함유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다수의 친 전자기와 함께 반응하여 컨쥬게이트(예를 들어, PEG 또는 기타 수용성 중합체와의 컨쥬게이트)를 형성할 수 있다.

[0302] 대표적인 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드-함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0303]

[상기 식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이거나, 또는 존재하지 않으며; X는 O, N 또는 S이거나, 또는 존재하지 않고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드이거나, 또는 아미노 말단 변형 기이며; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카보닐 말단 변형 기임]

[0305] 몇몇 구체예에서, n은 4이고, R₁은 존재하지 않으며, X는 N이다. 몇몇 구체예에서, n은 2이고, R₁은 존재하지 않으며, X도 존재하지 않는다. 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, 산소 원자는 아릴 고리상의 지방족 기에 대하여 파라 위치에 위치한다.

[0306] 히드라지드-, 히드라진- 및 세미카바지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 시판되고 있다. 예를 들어, L-글루타메이트-γ-히드라지드는 시그마 케미칼(St. Louis, MO)로부터 시판되고 있다. 시판되고 있지 않은 기타 아미노산은 당 업자에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,281,211 호를 참조하시오.

[0307] 히드라지드, 히드라진 또는 세미카바지드 작용기를 보유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 폴리펩티드는 알데히드 또는 유사한 화학 반응성을 갖는 기타 작용기를 함유하는 다양한 분자들과 효과적이고 선택적으로 반응할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Shao, J. and Tarn, J., *J. Am. Chern. Soc.* 117:3893-3899(1995)]을 참조하시오. 히드라지드, 히드라진 및 세미카바지드 작용기의 독특한 반응성을 이들 작용기가 20개의 공통 아미노산에 존재하는 친핵성 기(예를 들어, 세린 또는 트레오닌의 히드록실기, 또는 리신 및 N-말단의 아미노기)에 비하여 알데히드, 케톤 및 기타 친 전자기에 대해 보다 반응성이 되도록 만든다.

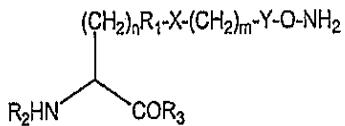
C. 아미노옥시-함유 아미노산

[0309] 아미노옥시기(히드록실아민이라고도 칭함)를 함유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다양한 친 전자성 기와

반응하여 컨쥬게이트(예를 들어, PEG 또는 기타 수용성 중합체와의 컨쥬게이트)를 형성할 수 있다. 히드라진, 히드라지드 및 세미카바지드와 유사하게, 아미노옥시기의 강화된 친핵성은 이 아미노옥시기가 알데히드 또는 유사한 화학 반응성을 갖는 기타 작용기를 함유하는 다양한 분자와 효과적이고 선택적으로 반응할 수 있게 만든다. 예를 들어, 문헌[Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001)]을 참조하시오. 반면에, 히드라진기와 반응하면 히드라존이 생성되지만, 옥심은 일반적으로 아미노옥시기와 카보닐-함유기 예를 들어, 케톤의 반응으로부터 생성된다.

[0310]

아미노옥시기를 함유하는 대표적인 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0311]

[상기 식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환 알킬 또는 치환 아릴이거나, 또는 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나 존재하지 않고; m은 0~10이며; Y는 C(0)이거나 존재하지 않고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이며, R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0313]

몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, m은 1이며, Y는 존재한다. 몇몇 구체예에서, n은 2이고, R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이고, Y는 존재하지 않는다.

[0314]

아미노옥시-함유 아미노산은 용이하게 사용가능한 아미노산 전구체(호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003)]을 참조하시오. 임의의 아미노옥시-함유 아미노산 예를 들어, L-2-아미노-4-(아미노옥시)부티르산은 천연 공급원으로부터 분리되었다[Rosenthal, G. 외 다수, *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997)]. 기타 아미노옥시-함유 아미노산은 당 업자에 의하여 제조될 수 있다.

[0315]

D. 아지드 및 알킨 반응기

[0316]

아지드 및 알킨 작용기의 독특한 반응성은 이 작용기들이 폴리펩티드 및 기타 생물 분자의 선택적 변형에 매우 유용하도록 만든다. 유기 아지드, 구체적으로 알파 아지드 및 알킨은 일반적으로 공통의 반응성 화학 조건에 대하여 안정하다. 특히, 아지드 및 알킨 작용기 둘 다는 천연 발생 폴리펩티드에서 발견되는 20개의 공통 아미노산의 측쇄(즉, R기)에 대하여 비활성이다. 그러나, 이들이 서로 가까이 존재하면, 아지드 및 알킨 기의 "스프링-로딩(spring-loading)" 특성이 나타나며, 이 기들은 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응을 통해 선택적이고 효과적으로 반응하여 해당 트리아졸을 형성한다. 예를 들어, 문헌[Chin, J. 외 다수, *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002)]을 참조하시오.

[0317]

휘스겐 고리 첨가 반응이 친핵성 치환보다는 선택적 고리 첨가 반응을 포함하므로[예를 들어, Padwa, A., COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R., 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176], 아지드 및 알킨-함유 측쇄를 보유하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 삽입되며, 결과물인 폴리펩티드는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형될 수 있게 된다. 아지드 또는 알킨-함유 ABP가 관여하는 고리 첨가 반응은 실온 및 수성 조건하에서, Cu(II)를 Cu(I)로 시험관 내 환원시키는 환원제의 존재하에, Cu(II)(예를 들어, 촉매량의 CuSO₄ 형태)를 촉매량 첨가함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Wang, Q. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W. 외 다수, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev 외 다수, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002)]을 참조하시오. 대표적인 환원제로서는, 전위가 인가된, 아스코르브산염, 금속 구리, 퀴닌, 히드로퀴논, 비타민 K, 글루타치온, 시스테인, Fe²⁺ 및 Co²⁺를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

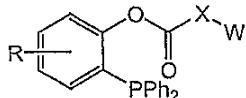
[0318]

몇몇 경우에 있어서, 아지드 및 알킨 사이의 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응이 바람직한 경우, 항원-결합 폴리펩티드는 알킨 부위를 포함하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하며, 이 아미노산에 결합되어 있는 수용성 중합체는 아지드 부위를 포함한다. 대안적으로, 통상의 반응(즉, 아미노산 상의 아지드 부위와 수용성 중합

체 상에 존재하는 알킨 부위와의 반응)도 또한 수행될 수 있다.

[0319] 아지드 작용기는 또한 아릴 에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응할 수 있으며, 또한 아릴 포스핀 부위로 적당하게 작용화되어 아미드 결합을 형성한다. 아릴 포스핀기는 아지드를 시험관 내에서 환원하며, 결과로 생성된 아민은 이후 인접한 에스테르 결합과 효과적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 예를 들어, 문헌[E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)]을 참조하시오. 아지드-함유 아미노산은 알킬 아지드(예를 들어, 2-아미노-6-아지도-1-헥사논산) 또는 아릴 아지드(p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

[0320] 아릴 에스테르 및 포스핀 부위를 함유하는 대표적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

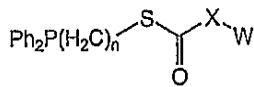


[0321]

[상기 식 중, X는 O, N, S일 수 있거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이며, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기일 수 있음]

[0323] 대표적인 R기로서는 $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, -할로겐, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ 및 $-\text{NO}_2$ 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. R' , R'' , R''' 및 R'''' 은 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴 예를 들어, 1~3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 의미한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들어, 각각의 R기는 하나 이상 존재할 때 독립적으로 각각 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기에서와 같이 선택된다. R' 및 R'' 가 동일한 질소 원자에 결합될 때, 이들은 질소 원자와 결합하여 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-\text{NR}'\text{R}''$ 는 예를 들어, 1-피롤리디닐 및 4-모폴리닐을 의미한다. 치환기에 관하여 전술한 바로부터, 당 업자는 "알킬"이란 용어는 수소기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기 예를 들어, 할로알킬(예를 들어, $-\text{CF}_3$ 및 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) 및 아실(예를 들어, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 등)을 포함하는 의미라는 사실을 이해할 것이다.

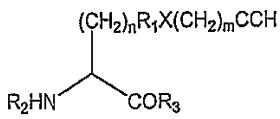
[0324] 아지드 작용기는 또한 티오에스테르를 함유하고 아릴 포스핀 부위로 적당히 작용화된 수용성 중합체와 선택적으로 반응하여 아미드 결합을 형성할 수도 있다. 아릴 포스핀기는 아지드를 시험관 내에서 환원시키고, 이후 생성된 아민은 티오에스테르 결합과 효과적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 티오에스테르 및 포스핀 부위를 함유하는 대표적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0325]

[식 중, n은 1~10이고; X는 O, N, S일 수 있거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체임]

[0327] 대표적인 알킨-함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0328]

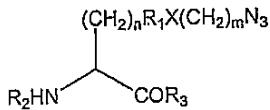
[식 중, n은 0~10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환 알킬 또는 치환 아릴이거나, 또는 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않으며; m은 0~10이고, R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0330] 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R_1 은 페닐이며, X는 존재하지 않고, m은 0이며 아세틸렌 부위는 알킬 측쇄에 대하여 파라 위치에 위치한다. 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R_1 은 페닐이며, X는 O이고, m은 1이며 프로파길옥시

기는 알킬 측쇄에 대하여 파라 위치에 위치한다(즉, O-프로파길-티로신). 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이다(즉, 프로파길글리신).

[0331] 알킨-함유 아미노산은 시판되고 있다. 예를 들어, 프로파길글리신은 웨테크(Burlington, MA)로부터 시판되고 있다. 대안적으로, 알킨-함유 아미노산은 표준적인 방법에 따라서 제조될 수 있다. 예를 들어, p-프로파길옥시페닐알라닌은 예를 들어, 문헌[Deiters, A. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003)]에 기술된 바와 같이 합성될 수 있으며, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 문헌[Kayser, B. 외 다수, *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997)]에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 기타 알킨-함유 아미노산은 당 업자에 의하여 제조될 수 있다.

[0332] 대표적인 아지드-함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다.



[0333] [식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재하지 않으며; X는 O, N, S 이거나 또는 존재하지 않고; m은 0~1이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기가고, R₃는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0335] 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 존재하지 않고, m은 0이며 아지드 부위는 알킬 측쇄에 대하여 파라 위치에 위치한다. 몇몇 구체예에서, n은 0~4이고 R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이다. 몇몇 구체예에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 0이고, m은 2이며 β-아지도에톡시 부위는 알킬 측쇄에 대하여 파라 위치에 위치한다.

[0336] 아지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 시판되고 있다. 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌은 캠-임팩스 인터내셔널, 인코포레이션(Wood Dale, IL)로부터 구할 수 있다. 시판되고 있지 않은 아지드-함유 아미노산에 있어서, 아지드기는 당 업자에게 공지된 표준적인 방법 예를 들어, 적당한 이탈기(예를 들어, 할로겐화물, 메실레이트, 토실레이트)의 치환법을 이용하거나 또는 적당히 보호된 락톤을 개환함으로써 비교적 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조하시오.

E. 아미노티울 반응기

[0337] 베타-치환된 아미노티울 작용기의 독특한 반응성은 티아졸리딘의 형성을 통하여 이 기가 알데히드기를 함유하는 폴리펩티드 및 기타 생물 분자의 선택적 변형에 매우 유용하도록 만든다. 예를 들어, 문헌[J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899]을 참조하시오. 몇몇 구체예에서, 베타-치환된 아미노티울 아미노산은 ABP 폴리펩티드에 삽입되어, 알데히드 작용기를 포함하는 수용성 중합체와 반응할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 수용성 중합체, 약물 컨쥬게이트 또는 기타 페이로드는 티아졸리딘의 형성을 통하여 베타-치환된 아미노티울 아미노산을 포함하는 ABP 폴리펩티드와 커플링 될 수 있다.

인공적 아미노산의 세포 흡수

[0339] 진핵 생물 세포에 의한 인공적 아미노산의 흡수 여부는 예를 들어, 단백질로의 삽입을 위하여 인공적 아미노산을 고안 및 선택할 때에 통상적으로 고려되는 이슈가 된다. 예를 들어, α-아미노산의 고 전하 밀도는 이 화합물들이 세포 투과성이 아닐 것이라는 것을 시사한다. 천연 아미노산은 단백질계 운반 시스템의 수집을 통하여 진핵 생물 세포 내에 취하여진다. 인공적 아미노산이 존재한다면, 어느 인공적 아미노산이 세포에 의하여 취하여지는지를 평가하는 급속 스크리닝이 행하여질 수 있다. 예를 들어, 2003년 12월 22일 출원된 특허 출원 번호 제 10/744,899 호, 및 2002년 12월 22일 출원된 특허 출원 번호 제 60/435,821 호의 출원(발명의 명칭:"Protein Arrays")에 개시된 독성 검정법; 그리고 문헌[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]을 참조하시오. 비록 흡수 여부는 다양한 검정법에 의해 용이하게 분석되지만, 세포 흡수 경로에 순응하는 인공적 아미노산을 고안하는 대안적 방법은 생체 내 아미노산을 생성하는 생합성 경로를 제공하는 것이다.

인공적 아미노산의 생합성

[0342]

아미노산 및 기타 화합물을 생산하는 다수의 생합성 경로는 이미 세포 내에 존재한다. 특정의 인공적 아미노산의 생합성 방법은 천연 예를 들어, 진핵 생물 세포에 존재할 수 없지만, 본 발명은 그러한 방법을 제공한다. 예를 들어, 인공적 아미노산의 생합성 경로는 신규의 효소를 첨가하거나 또는 현존하는 숙주 세포 경로를 수정함으로써 숙주 세포 내에서 진행될 수도 있다. 부가적인 신규의 효소는 임의로는 천연 발생 효소이거나, 또는 인공적으로 진화된 효소이다. 예를 들어, p-아미노페닐알라닌[WO 2002/085923(발명의 명칭:"In vivo incorporation of unnatural amino acids")]의 생합성은 기타 유기체로부터 유래된 공지의 효소들을 조합하여 첨가하는 것에 좌우된다. 이를 효소의 유전자는 진핵 생물 세포를 이 유전자를 함유하는 플라스미드로 형질 전환시킴으로써 진핵 생물 세포 내에 도입될 수 있다. 상기 유전자는 세포 내에서 발현될 때 목적 화합물을 합성하는 효소 경로를 제공한다. 임의적으로 가하여지는 효소의 종류는 이하 실시예에 제공되어 있다. 부가 효소 서열은 예를 들어, GenBank에서 찾을 수 있다. 인공적으로 진화된 효소는 또한 동일한 방식으로 세포 내에 임의로 가하여진다. 이러한 방식으로, 세포 기작 및 세포 공급원은 조작되어 인공적 아미노산을 생산하게 된다.

[0343]

생합성 경로에 사용하기 위하거나 또는 현존하는 경로를 진행시키기 위한 신규 효소를 생산하는데에 다수의 방법들을 활용 가능하다. 예를 들어, 맥시겐 인코포레이션(Maxygen, Inc.)에 의하여 개발된 반복 재조합법(www.maxygen.com를 통하여 파악 가능함)은 신규의 효소 및 경로를 개발하는데 사용되기도 한다. 예를 들어, 문헌[Stemmer (1994), *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, *Nature* 370(4):389-391; 및 Stemmer, (1994), *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:10747-10751]을 참조하시오. 이와 유사하게, 제넨코(Genencor)에 의하여 개발된 DesignPath(상표명)(www.genencor.com를 통하여 구할 수 있음)은 예를 들어, 세포 내에서 O-메틸-L-티로신을 생성하는 경로를 조작하는 대사 경로 조작법에 사용될 수도 있다. 이 기술은 예를 들어, 기능 유전체학과, 분자 진화 및 고안을 통하여 동정된 신규의 유전자를 조합 사용함으로써 숙주 유기체 내에 현존하는 경로를 재구성한다. 다이버사 코포레이션(Diversa Corporation)(www.diversa.com)은 또한 유전자 라이브러리 및 유전자 경로를 신속하게 스크리닝하여 예를 들어, 신규의 경로를 형성하는 기술을 제공한다.

[0344]

통상적으로, 본 발명의 조작된 생합성 경로로써 생성된 인공적 아미노산은 단백질을 효율적으로 생합성 하기에 충분한 농도(예를 들어, 천연 세포량 만큼이되, 기타 아미노산의 농도에 영향을 미치거나 또는 세포 공급원을 소진시키지는 않을 정도)로 생산된다. 이러한 방식으로 생체 내에서 생산되는 통상의 농도는 약 10~약 0.05 mM이다. 일단 세포가 특정 경로에 바람직한 효소를 생산하는데 사용되는 유전자를 포함하는 플라스미드로 형질 전환되고 인공적 아미노산이 생성되면, 생체 내 선택은 임의로는 리보솜 단백질 합성 및 세포 성장에 대한 인공적 아미노산의 생산을 더욱 최적화시키는데에 사용된다.

[0345]

인공적 아미노산을 보유하는 폴리펩티드

[0346]

인공적 아미노산의 삽입은 다양한 목적 예를 들어, 단백질 구조 및/또는 기능 변화의 조정, 크기 변화, 산성도, 친핵성, 수소 결합, 소수성, 프로테아제 표적 위치의 접근 가능성, 일정 부위로의 표적화(예를 들어, 단백질 어레이용), 생물 활성 분자의 첨가, 중합체의 결합, 방사성 핵종의 결합, 혈청 반감기의 조절, 조직 투과성의 조절(예를 들어, 종양), 활성 운반체의 조절, 조직, 세포 또는 기관 특이성의 조절, 면역원성의 조절, 프로테아제 내성의 조절 등의 목적으로 수행될 수 있다. 인공적 아미노산을 포함하는 단백질은 전혀 새로운 촉매적 또는 생리적 특성이 강화될 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 특성을 즉, 독성, 생분포, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매능, 반감기(예를 들어, 혈청 반감기), 기타 분자들과의 공유적 또는 비공유적 반응 능력은 임의로는 인공적 아미노산을 단백질에 포유시킴으로써 변형된다. 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 단백질을 함유하는 조성물은 예를 들어, 신규의 치료제, 진단약, 촉매 효소, 산업 효소, 결합 단백질(예를 들어, 항체)로서 유용하며, 예를 들어, 단백질 구조 및 기능 연구에도 유용하다. 예를 들어, 문헌[Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652]을 참조하시오.

[0347]

본 발명의 하나의 측면에서, 조성물은 하나 이상 예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 10개 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 인공적 아미노산은 동일하거나 또는 상이할 수 있는데, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 단백질 내에는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 상이한 위치가 있을 수 있다. 다른 측면에서, 조성물은 단백질 내 존재하는 특정 아미노산을 하나 이상(다만, 모두는 아님)보유하는 단백질을 포함하며, 여기서 이 특정 아미노산은 인공적 아미노산으로 치환될 수 있다. 하나 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 조성의 단백질에 있어서, 인공적 아미노산은 동일하거나 또는 상이할 수 있다[예를 들어, 단백질은 2 이상의 상이한 유형의 인공적 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 동일한 인공적 아미노산을

2개 포함할 수 있다]. 2 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 소정의 단백질에 있어서, 인공적 아미노산은 동일하거나, 상이하거나 또는 동일한 종류의 인공적 아미노산 복수개와 하나의 상이한 인공적 아미노산의 조합체일 수 있다.

하나 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 목적 ABP는 본 발명의 특징을 이룬다. 본 발명은 또한 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 생산된 하나 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 부형제(예를 들어, 약학적으로 허용가능한 부형제)는 또한 단백질과 함께 존재할 수도 있다.

진핵 생물 세포 내에서 하나 이상의 인공적 아미노산을 보유하는 목적 단백질 또는 폴리펩티드를 생산함으로써, 단백질 또는 폴리펩티드는 통상적으로 진핵 생물내 번역 후 변형을 포함할 것이다. 임의의 구체예에서, 단백질은 하나 이상의 인공적 아미노산과 진핵 생물 세포에 의해 생체 내에서 가하여진 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서, 상기 번역 후 변형은 원핵 세포에 의해서는 가하여지지 않는다. 예를 들어, 번역 후 변형으로서는, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질-결합 변형, 당질화 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나의 측면에서, 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합에 의하여 올리고당[예를 들어, $(\text{GlcNAc-Man})_2\text{-Man-GlcNAc-GlcNAc}$]을 아스파라긴에 결합시키는 것을 포함한다. 진핵 단백질의 N-결합 올리고당의 몇몇 예를 나열한 이하 표 1을 참조하시오[부가 잔기(도시하지 않음)가 존재할 수도 있음]. 다른 측면에서, 번역 후 변형은 GaINAc-세린 또는 GaINAc-트레오닌 결합, 또는 GlcNAc-세린 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의하여 올리고당(예를 들어, Gal-GaINAc, Gal-GlcNAc 등)을 세린 또는 트레오닌에 결합하는 것을 포함한다.

五 1

표 1 : GlcNAc-결합을 통한 올리고당의 예

종류	염기 구조
고급 만노스	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \longrightarrow \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \longrightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
하이브리드	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \longrightarrow \text{Man}\alpha 1-3 \longrightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
결합체	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \longrightarrow \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \longrightarrow \text{Man}\alpha 1-3 \longrightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
자일로스	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \longrightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $

또 다른 측면에서, 번역 후 변형은 전구체(예를 들어, 칼시토닌 전구체, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드 전구체, 프리프로부갑상선 호르몬, 프리프로인슐린, 프로인슐린, 프리프로오피오멜라노코르틴, 프로오피오멜라노코르틴 등)의 단백 분해 과정, 다중 서브유닛 단백질 또는 거대 분자 조립체로의 조립, 세포 내 다른 위치로의 번역(예를 들어, 기관, 예를 들어, 소포체, 골지 기관, 핵, 리소좀, 페옥시좀, 미토콘드리아, 염록체, 액포 등으로의 번역, 또는 분비 경로를 통한 번역)을 포함한다. 임의의 구체예에서, 단백질은 분비 또는 국소화 서열, 애피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합체 등을 포함한다.

인공적 아미노산에 있어서 하나의 이점은 부가의 분자를 첨가하는데 사용될 수 있는 부가의 화학적 부위를 제시한다는 점이다. 이러한 변형은 진핵 생물 세포 또는 비 진핵 생물 세포 내에서와 같은 생체 내에서, 또는 시험관 내에서 가하여 질 수 있다. 그러므로, 임의의 구체예에서, 번역 후 변형은 인공적 아미노산을 통하여 가능하다. 예를 들어, 번역 후 변형은 친핵성-친전자성 반응을 통하여 가능하다. 단백질을 선택적으로 변형시키기 위하여 현재 사용되는 대부분의 반응 예를 들어, α -할로케톤과 히스티딘 또는 시스테인 측쇄의 반응은, 친핵성 및 친전자성 반응 파트너 사이에 공유 결합을 형성하는 것을 포함한다. 이러한 경우에 있어서의 선택성은 단백

질내 친핵성 잔기의 수와 접근 가능성에 의해 결정된다. 본 발명의 단백질에 있어서, 보다 선택적인 기타 반응은 예를 들어, 인공적 케토 아미노산과 히드라지드 또는 아미노옥시 화합물의 시험관 내 및 생체 내 반응에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cornish의 다수, (1996) *Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151; Mahal의 다수, (1997) *Science*, 276:1125-1128; Wang의 다수, (2001) *Science* 292:498-500; Chin의 다수, (2002) *Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027; Chin의 다수, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:11020-11024; Wang의 다수, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:56-61; Zhang의 다수, (2003) *Biochemistry*, 42:6735-6746; 및 Chin의 다수, (2003) *Science*, in press]을 참조하시오. 이로써 실질적으로 임의의 단백질을 다수의 시약 예를 들어, 형광단, 가교제, 당 유도체 및 세포 독성 분자로 선택적 표지화할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 제 10/686,944호(발명의 명칭:"Glycoprotein synthesis"; 2003년 10월 15일 출원)[2002년 10월 16일자 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/419,265 호, 2002년 10월 23일자 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/420,990 호 및 2003년 1월 16일자 출원된 미국 가명세서 특허 출원 제 60/441,450 호 기초]을 참조하시오. 예를 들어, 아지도 아미노산을 통한 번역 후 변형은 또한 스토딩거 결찰법(예를 들어, 트리아릴포스핀 시약을 사용하는 방법)으로 이루어질 수도 있다. 예를 들어, 문헌[Kiick의 다수, (2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, *PNAS* 99:19-24]을 참조하시오.

[0353]

본 발명은 단백질을 선택적으로 변형시키기 위한 고도로 효율적인 다른 방법을 제공하는데, 이 방법은 인공적 아미노산의 유전자 삽입 예를 들어, 선택자 코돈에 반응하여 아지도 또는 알카닐 부위를 함유하는 인공적 아미노산을 단백질에 삽입시키는 것을 포함한다. 이후 이러한 아미노산 측쇄는 예를 들어, 알카닐 또는 아지도 유도체와의 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응에 의하여 변형될 수 있다[예를 들어, Padwa, A., *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; 및 Huisgen, R., *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176]. 이 방법은 친핵성 치환보다는 고리 첨가 반응을 포함하므로, 단백질은 매우 고도의 선택성을 가지고 변형될 수 있다. 이 반응은 촉매량의 Cu(I) 염을 반응 혼합물에 첨가하여 실온 및 수성 조건하에서 뛰어난 위치 선택성($1,4 > 1,5$)을 가지고 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tornoe의 다수, (2002) *Org. Chem.* 67:3057-3064; 및 Rostovtsev의 다수, (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 :2596-2599]을 참조하시오. 사용될 수 있는 다른 방법은 이중 비소 화합물 상 테트라시스테인 모티브와의 리간드 교환법으로서, 예를 들어, 문헌[Griffin의 다수, (1998) *Science* 281 :269-272]을 참조하시오.

[0354]

[3 + 2] 고리 첨가 반응을 통하여 본 발명의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 실질적으로 아지도 또는 알카닐 유도체와 임의의 분자를 포함한다. 이러한 분자로서는 예를 들어, 염료, 형광단, 가교제, 당 유도체, 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체), 광가교제, 세포 독성 화합물, 친화성 표지, 바이오틴의 유도체, 수지, 비드, 제2 단백질 또는 폴리펩티드(또는 그 이상), 폴리뉴클레오티드(들)(예를 들어, DNA, RNA 등), 금속 킬레이트제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물 등을 포함한다. 이러한 분자는 각각 알카닐기 예를 들어, p-프로파길옥시페닐알라닌 또는 아지도 기 예를 들어, p-아지도-페닐알라닌과 함께 인공적 아미노산에 첨가될 수 있다.

[0355]

V. 비-유전적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP의 생체 내 생성

[0356]

본 발명의 항원-결합 폴리펩티드는 변형된 tRNA 및 tRNA 합성효소를 사용하여 천연 발생 시스템 내에서 코딩되지 않는 아미노산을 첨가하거나 또는 코딩되지 않는 아미노산으로 치환되도록 생체 내에서 생성될 수 있다.

[0357]

천연 발생 시스템 내에서 코딩되지 않는 아미노산을 사용하는, tRNA 및 tRNA 합성효소를 생성하는 방법에 관하여는 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575(출원 번호 제 10/126,927 호) 및 2003/0108885(출원 번호 제 10/126,931 호)에 기술되어 있다. 이러한 방법들은 번역 시스템에 내인성인 합성효소 및 tRNA의 독립적으로 작용하는 번역 기구를 형성하는 것을 포함한다[따라서, 종종 "오르토고날(orthogonal)"이라고 칭함]. 통상적으로, 번역 시스템은 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함한다. 통상적으로, 상기 O-RS는 바람직하게 O-tRNA를 번역 시스템내 하나 이상의 비 천연 발생 아미노산으로 아미노아실화시키고, 상기 O-tRNA는 시스템 내 기타 tRNA에 의하여 인지되지 않는 하나 이상의 선택자 코돈을 인지한다. 그러므로, 번역 시스템은 코딩 선택자 코돈에 따라서 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 시스템 내에서 생성되는 단백질 내로 삽입하여, 코딩된 폴리펩티드 내 소정의 위치에서 아미노산을 "치환"시킨다.

[0358]

다양한 오르토고날 tRNA 및 아미노아실 tRNA 합성효소에 관하여는, 폴리펩티드에 특정한 합성 아미노산을 삽입하는 것에 관한 업계에 공지되어 있으며, 일반적으로 이것은 본 발명에 사용하기에 적당하다. 예를 들어, 케토-

특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소는 문헌[Wang, L. 외 다수, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:56-61 (2003) 및 Zhang, Z. 외 다수, *Biochem.* 42(22):6735-6746 (2003)]에 기술되어 있다. 대표적인 O-RS 또는 이의 일부분은 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩되며, 미국 특허 출원 공보 2003/0082575 및 2003/0108885 [각각 참고용으로 인용됨]에 개시된 아미노산 서열을 포함한다. O-RS와 함께 사용되는 해당 O-tRNA 분자에 관하여는 또한 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575(출원 번호: 제 10/126,927 호) 및 2003/0108885(출원 번호: 제 10/126,931 호)에도 기술되어 있다.

[0359] 아지드-특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소계의 예에 관하여는 문헌[Chin, J. W. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002)]에 기술되어 있다. p-아지도-L-Phe에 대한 대표적인 O-RS 서열로서는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0108885(출원 번호: 제 10/126,931 호)에 개시되어 있는 바와 같은 뉴클레오티드 서열(서열 14~16 및 서열 29~32) 및 아미노산 서열(서열 46~48 및 서열 61~64)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적당한 대표적인 O-tRNA 서열로서는, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0108885(출원 번호: 제 10/126,931 호)에 개시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열(서열 1~3)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 특이적인 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍의 다른 예에 관하여는, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575(출원 번호: 제 10/126,927 호)에 개시되어 있다. 에스.세레비지애 내 케토- 및 아지드-함유 아미노산에 삽입된 O-RS 및 O-tRNA에 관하여는 문헌[Chin, J. W. 외 다수, *Science* 301:964-967 (2003)]에 개시되어 있다.

[0360] O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소의 사용에는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 코딩하는 특이 코돈을 선택하는 것을 포함한다. 임의의 코돈이 사용될 수는 있지만, 일반적으로 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소가 발현되는 세포 내에서 거의 사용되지 않거나 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 대표적인 코돈으로서는 넌센스 코돈 예를 들어, 종결 코돈(앰버, 오커 및 오펠), 4개 이상의 염기 코돈 및 거의 사용되지 않거나 또는 전혀 사용되지 않는 기타 천연의 3 염기 코돈을 포함한다.

[0361] 특이적 선택자 코돈(들)은 당 업계에 공지된 돌연변이 유발법(예를 들어, 위치-특이적 돌연변이 유발법, 카세트 돌연변이 유발법, 제한 선택 돌연변이 유발법 등)을 이용하여 ABP 폴리뉴클레오티드 코딩 서열 내의 적당한 위치에 도입될 수 있다.

[0362] 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 삽입시키는데에 사용될 수 있는 단백질 생합성 기작의 성분들 예를 들어, O-RS, O-tRNA 및 오르토고날 O-tRNA/O-RS 쌍을 제조하는 방법에 관하여는 문헌[Wang, L. 외 다수, *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J. W. 외 다수, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. 외 다수, *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003)]에 기술되어 있다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 생체 내 삽입 방법 및 조성물에 관하여는, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575(출원 번호: 제 10/126,927 호)에 기술되어 있다. 유기체의 생체 내 번역 시스템에 사용되는 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 선택하는 방법에 관하여는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 출원 공보 2003/0082575(출원 번호: 제 10/126,927 호) 및 2003/0108885(출원 번호: 제 10/126,931 호)에 기술되어 있다.

[0363] 하나 이상의 재조합 오르토고날 아미노아실-tRNA 합성효소(O-RS)를 제조하는 방법은 (a) 제1 유기체 예를 들어, 원핵 유기체 예를 들어, 메타노코커스 재너쉬(*Methanococcus jannaschii*), 메타노박테리움 서모오토토트로파슘(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 할로박테리아(*Halobacterium*), 에스케리자 콜라이(*Escherichia coli*), 에이.펄기두스(*A. fulgidus*), 퍼.퓨리오서스(*P. furiosus*), 퍼.호리코시(*P. horikoshii*), 에이.페르닉스(*A. pernix*), 티.서모필러스(*T. thermophilus*) 등, 또는 진핵 유기체로부터 유래된 하나 이상의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)로부터 유래된 RS(임의로는 돌연변이체) 라이브러리를 제조하는 단계 ; (b) 비-천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 오르토고날 tRNA(O-tRNA)를 아미노아실화시키는 일원에 대한 RS(임의로는 돌연변이 RS)의 라이브러리를 선택(및/또는 스크리닝)하여, 활성(임의로는 돌연변이체) RS의 풀을 제공하는 단계; 및/또는 (c) 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 부재하에 바람직하게 O-tRNA를 아미노아실화시키는 활성 RS(예를 들어, 돌연변이체 RS)에 대한 풀을 선택(임의로는 음성 선택(negative selection))하여, 하나 이상의 재조합 O-RS를 제공하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 하나 이상의 재조합 O-RS는 바람직하게 O-tRNA를 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 아미노아실화시킨다.

[0364] 하나의 구체예에서, RS는 불활성 RS이다. 상기 불활성 RS는 활성 RS를 돌연변이시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 불활성 RS는 상이한 아미노산(예를 들어, 알라닌)에 대하여 약 1개 이상, 약 2개 이상, 약 3개 이상, 약 4개 이상, 약 5개 이상, 약 6개 이상 또는 약 10개 이상의 아미노산을 돌연변이시킴으로써 생산될 수 있다.

- [0365] 돌연변이 RS의 라이브러리는 당 업계에 공지된 다양한 기술 예를 들어, 단백질 3차원 RS 구조를 바탕으로 한 합리적 고안법, 또는 RS 뉴클레오티드를 랜덤 또는 합리적 고안 기술에서 돌연변이 유발시키는 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이 RS는 위치-특이적 돌연변이법, 랜덤 돌연변이법, 다양성 형성 재조합 돌연변이법, 키메라 구조물, 합리적 고안 및 기타 본원 및 당 업계에 개시된 방법에 의하여 생산될 수 있다.
- [0366] 하나의 구체예에서, 활성인 예를 들어, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 오르토고날 tRNA(0-tRNA)를 아미노아실화시키는 일원에 대한 RS(또는 돌연변이 RS) 라이브러리의 선택(및/또는 스크리닝)은 다음의 단계들을 포함한다: 양성 선택(positive selection) 또는 스크리닝 마커 예를 들어, 항생제 내성 유전자 등과 RS(또는 돌연변이 RS) 라이브러리를 다수의 세포 내에 도입시키는 단계[여기서, 상기 양성 선택 및/또는 스크리닝 마커는 하나 이상의 선택자 코돈 예를 들어, 앰버, 오커 또는 오펠 코돈을 포함함]; 선택 제제의 존재하에 다수개의 세포를 성장시키는 단계; 선택 및/또는 스크리닝 제제의 존재하에 양성 선택 또는 스크리닝 마커 내 하나 이상의 선택 마커를 억제시킴으로써 생존하는(또는 특이적으로 반응하는) 세포를 동정하여, 활성(또는 돌연변이) RS의 풀을 함유하는 양성 선택된 세포의 하위 세트를 제공하는 단계. 임의적으로, 선택 및/또는 스크리닝 제제의 농도는 다양할 수 있다.
- [0367] 하나의 측면에서, 양성 선택 마커는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT) 유전자이고 선택자 코돈은 CAT 유전자 내에 있는 앰버 종결 코돈이다. 임의로, 상기 양성 선택 마커는 β -락타마제 유전자이고 선택자 코돈은 이 β -락타마제 유전자 내에 있는 앰버 종결 코돈이다. 다른 측면에서, 양성 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커이거나 또는 친화성계 스크리닝 마커(예를 들어, 세포 표면 마커)이다.
- [0368] 하나의 구체예에서, 바람직하게 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 부재하에 0-tRNA를 아미노아실화시키는 활성 RS(또는 돌연변이 RS)에 대한 풀을 음성 선택하거나 또는 스크리닝하는 방법은 다음의 단계들을 포함한다: 양성 선택 또는 스크리닝으로부터 얻은 활성(또는 돌연변이) RS의 풀과 함께 음성 선택 또는 스크리닝 마커를 다수개의 제2 유기체 세포에 도입시키는 단계[여기서, 상기 음성 선택 또는 스크리닝 마커는 하나 이상의 선택자 코돈(예를 들어, 항생제 내성 유전자 예를 들어, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT) 유전자)을 포함함]; 및 비-천연적으로 코딩된 아미노산 및 스크리닝 또는 선택 제제가 보강된 제1 배지 중에서는 생존하거나 또는 특이적 스크리닝 반응을 나타내지만, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 및 선택 또는 스크리닝 제제가 보강되지 않은 제2 배지 중에서는 생존하지 못하거나 또는 특이적 반응을 나타내지는 않는 세포를 동정하여, 생존 세포 또는 스크리닝된 세포에 하나 이상의 재조합 O-RS를 제공하는 단계. 예를 들어, CAT 동정 프로토콜은 적당한 O-RS 재조합체의 결정에 있어서 양성 선택 및/또는 음성 스크리닝 수단으로서도 작용할 수 있다. 예를 들어, 클론의 풀은 임의로는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 존재하거나 또는 존재하지 않는 CAT(하나 이상의 선택자 코돈 포함)을 함유하는 성장 평판 상에서 복제될 수도 있다. 그러므로, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 평판 상에서만 성장하는 콜로니들은 재조합 O-RS를 함유하는 것으로 간주된다. 하나의 측면에서, 선택(및/또는 스크리닝) 제제의 농도는 다양하다. 몇몇 측면에 있어서, 제1 유기체와 제2 유기체는 상이하다. 그러므로, 제1 및/또는 제2 유기체는 다음과 같은 것들을 포함할 수도 있다: 원핵 생물, 진핵 생물, 포유 동물, 에스케리차 콜라이, 곰팡이, 효모, 고세균, 진정 세균, 식물, 곤충, 원생 생물 등. 다른 구체예에 있어서, 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성 스크리닝 마커를 포함한다.
- [0369] 다른 구체예에서, 활성(또는 돌연변이) RS에 대한 풀을 스크리닝 또는 선택(예를 들어, 음성 선택)하는 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다: 양성 선택 단계(b)로부터 활성 돌연변이 RS 풀을 분리하는 단계; 음성 선택 또는 스크리닝 마커를 다수의 제2 유기체 세포에 도입시키는 단계[여기서, 상기 음성 선택 또는 스크리닝 마커는 하나 이상의 선택자 코돈(예를 들어, 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하는 독성 마커 유전자 예를 들어, 리보뉴클레아제 바나제 유전자) 및 활성(또는 돌연변이) RS 풀을 포함함]; 및 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 보강되지 않은 제1 배지 중에서는 생존하거나 또는 특이적 스크리닝 반응을 나타내지만, 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 보강된 제2 배지 중에서는 생존하지 못하거나 또는 특이적 스크리닝 반응을 나타내지 않는 세포를 동정하여, 생존하거나 또는 스크리닝된 세포에 하나 이상의 재조합 O-RS를 제공하는 단계[여기서, 상기 하나 이상의 재조합 O-RS는 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 특이적임]. 하나의 측면에서, 하나 이상의 선택자 코돈은 약 2 개 이상의 선택자 코돈을 포함한다. 이러한 구체예에서는, 하나 이상의 선택자 코돈은 2 이상의 선택자 코돈을 포함하고, 제1 및 제2 유기체는 상이할 수도 있다[예를 들어, 각각의 유기체는 원핵 생물, 진핵 생물, 포유 동물, 에스케리차 콜라이, 곰팡이, 효모, 고세균, 진정 세균, 식물, 곤충, 원생 생물 등일 수 있음]. 또한, 몇몇 측면에서 음성 선택 마커는 리보뉴클레아제 바나제 유전자(하나 이상의 선택자 코돈을 포함)를 포함한다. 다른 측면에서 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성계 스크리닝 마커를 포함할 수 있다. 본원의 구체예에 있어서, 스크리닝 및/또는 선택 단계는 스크리닝 방법 및/또는 다양한 선택 염중도를 포함할 수도

있다.

[0370] 하나의 구체예에서, 하나 이상의 재조합 오르토고날 아미노아실-tRNA 합성효소(O-RS)를 제조하는 방법은 추가로 다음의 단계들을 포함한다: (d) 하나 이상의 재조합 O-RS를 분리하는 단계; (e) 하나 이상의 재조합 O-RS로부터 유래된 O-RS(또는 돌연변이)의 제2 세트를 제조하는 단계; 및 (f) O-tRNA를 선호적으로 아미노아실화시키는 능력을 포함하는 돌연변이 O-RS가 얻어질 때까지 상기 단계 (b) 및 (c)를 반복 수행하는 단계. 임의적으로, 상기 단계 (d)~(f)는 약 2회 이상 반복 수행된다. 하나의 측면에서, 하나 이상의 재조합 O-RS로부터 유래된 돌연변이 O-RS의 제2 세트는 돌연변이 유발법 예를 들어, 랜덤 돌연변이 유발법, 위치-특이적 돌연변이 유발법, 재조합법과 돌연변이 유발법의 병행법으로 생산될 수 있다.

[0371] 전술한 방법에 있어서, 선택/스크리닝 단계 예를 들어, 양성 선택/스크리닝 단계 (b), 음성 선택/스크리닝 단계 (c) 또는 양 및 음성 선택/스크리닝 단계 (b) 및 (c)의 염중도는 여러가지의 선택/스크리닝 염중도를 포함할 수도 있다. 다른 구체예에서, 양성 선택/스크리닝 단계 (b), 음성 선택/스크리닝 단계 (c) 또는 양 및 음성 선택/스크리닝 단계 (b) 및 (c)는 리포터를 사용하는 것을 포함하는데, 여기서 상기 리포터는 형광성-활성화 세포 분류법(FACS)에 의해 검출되거나, 또는 상기 리포터는 발광에 의하여 검출된다. 임의적으로, 상기 리포터는 세포 표면, 파지 디스플레이 등에 디스플레이되어, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 또는 유사체가 관여하는 친화성 또는 촉매 활성을 바탕으로 하여 선택된다. 하나의 구체예에서, 돌연변이된 합성효소는 세포 표면, 파지 디스플레이 등에 디스플레이된다.

[0372] 재조합 오르토고날 tRNA(O-tRNA)를 생산하는 방법은 다음의 단계들을 포함한다: (a) 제1 유기체로부터 얻어진 하나 이상의 tRNA 예를 들어, 억제 tRNA로부터 유래된 돌연변이 tRNA 라이브러리를 생산하는 단계; (b) 제1 유기체로부터 얻어진 RS의 부재하에서 제2 유기체로부터 얻어진 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)에 의하여 아미노아실화된 (임의의 돌연변이) tRNA에 대한 라이브러리를 선택(예를 들어, 음성 선택) 또는 스크리닝하여, tRNA(또는 돌연변이체)의 풀을 제공하는 단계; 및 (c) 도입된 오르토고날 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 일원에 대하여 tRNA(또는 돌연변이체) 풀을 선택 또는 스크리닝하여, 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계[여기서, 상기 하나 이상의 재조합 O-tRNA는 선택자 코돈을 인지하고 제2 유기체로부터 얻어진 RS에 의하여 효과적으로 인지되지는 않으며, O-RS에 의하여 선호적으로 아미노아실화됨]. 몇몇 구체예에서, 하나 이상의 tRNA는 억제 tRNA이고/하거나 천연 및/또는 인공적 염기의 독특한 3 염기 코돈을 포함하거나, 또는 넌센스 코돈, 희귀 코돈, 인공적 코돈, 4개 이상의 염기를 포함하는 코돈, 앰버 코돈, 오키 코돈 또는 오펠 종결 코돈이다. 하나의 구체 예에서, 상기 재조합 O-tRNA는 직교성이 개선되었다. 몇몇 구체예에서, O-tRNA는 굳이 변형되지 않고 제2 유기체로부터 얻어진 제1 유기체 내에 운반되기도 한다. 다양한 구체예에서, 제1 및 제2 유기체는 동일하거나 또는 상이하며, 예를 들어, 원핵 생물[예를 들어, 메타노코커스 재너쉬, 메타노박테리움 서모오토토프리糗, 에스케리챠 콜라이, 할로박테리움 등], 진핵 생물, 포유 동물, 곰팡이, 효모, 고세균, 진정 세균, 식물, 곤충, 원생 생물 등으로부터 선택되기도 한다. 뿐만 아니라, 재조합 tRNA는 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 의하여 아미노아실화 될 수도 있는데, 여기서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 생체 내에서 천연적으로 또는 유전자 조작에 의하여 생합성된다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 최소한 제1 또는 제2 유기체에 대한 성장 배지에 가하여질 수도 있다.

[0373] 하나의 측면에서, 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 아미노아실화된 (임의로는 돌연변이) tRNA에 대한 라이브러리의 선택(예를 들어, 음성 선택) 또는 스크리닝(단계 (b))는 다음과 같은 단계들을 포함한다: 독성 마커 유전자 및 (임의로는 돌연변이) tRNA의 라이브러리를 제2 유기체로부터 얻어진 다수의 세포에 도입시키는 단계[여기서, 독성 마커 유전자는 선택자 코돈(또는 독성 또는 정균 제제 또는 유기체에 필수인 유전자를 생산하는 유전자)이고, 이러한 마커 유전자는 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하는 유전임]; 및 생존하는 세포를 선택하는 단계[여기서, 상기 생존하는 세포는 하나 이상의 오르토고날 tRNA 또는 비 작용성 tRNA를 포함하는 (임의로는 돌연변이) tRNA의 풀을 함유함]. 예를 들어, 생존하는 세포는 비교 비율 세포 밀도 검정법을 이용함으로써 선택될 수 있다.

[0374] 다른 측면에서, 독성 마커 유전자는 2 이상의 선택자 코돈을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법의 다른 구체예에서, 독성 마커 유전자는 리보뉴클레아제 바나제 유전자이다[여기서, 리보뉴클레아제 바나제 유전자는 하나 이상의 앰버 코돈을 포함]. 임의적으로 상기 리보뉴클레아제 바나제 유전자는 2개 이상의 앰버 코돈을 포함할 수 있다.

[0375] 하나의 구체예에서, 도입된 오르토고날 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 일원에 대한 (임의로는 돌연변이) tRNA의 풀을 선택 또는 스크리닝하는 방법은 다음의 단계들을 포함할 수 있다: 양성 선택 또는 스크리닝 마커 유전

자와, (임의로는 돌연변이) tRNA의 풀을 O-RS와 함께 제2 유기체로부터 유래된 다수의 세포에 도입시키는 단계 [여기서, 상기 양 마커 유전자는 약물 내성 유전자(예를 들어, 하나 이상의 선택자 코돈 예를 들어, 하나 이상의 앰비 종결 코돈을 포함하는 β -락타마제 유전자) 또는 유기체에 필수적인 유전자, 또는 독성 제제를 해독시키는 유전자를 포함함]; 및 선택 또는 스크리닝 제제 예를 들어, 항생제의 존재하에 성장하여 스크리닝된 세포 또는 생존하는 세포를 동정하여, 하나 이상의 재조합 tRNA를 보유하는 세포의 풀을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 하나 이상의 재조합 tRNA는 하나 이상의 선택자 코돈에 반응하여, O-RS에 의해 아미노아실화되고 양 마커 유전자에 의하여 코딩된 번역 생산물에 아미노산을 삽입한다. 다른 구체예에서, 선택 및/또는 스크리닝 제제의 농도는 다양하다.

[0376] 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍을 생성하는 방법이 제공된다. 이 방법은 (a) 제1 유기체로부터 얻어진 하나 이상의 tRNA에서 유래된 돌연변이 tRNA의 라이브러리를 제조하는 단계; (b) 제1 유기체로부터 얻어진 RS의 부재하에 제2 유기체로부터 얻어진 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)에 의하여 아미노아실화된 (임의로는 돌연변이) tRNA에 대하여 라이브러리를 음으로 선택 또는 스크리닝하여, (임의로는 돌연변이) tRNA의 풀을 제공하는 단계; (c) 도입된 오르토고날 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 일원에 대하여 (임의로는 돌연변이) tRNA의 풀을 선택 또는 스크리닝하여, 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 재조합 O-tRNA는 선택자 코돈을 인지하고, 제2 유기체로부터 유래된 RS에 의해 효과적으로 인지되지 않으며, O-RS에 의해 선호적으로 아미노아실화된다. 이 방법은 또한 (d) 제3 유기체로부터 얻어진 하나 이상의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)로부터 유래된 (임의로는 돌연변이) RS의 라이브러리를 생산하는 단계; (e) 비-천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 선호적으로 아미노아실화시키는 일원에 대한 돌연변이 RS의 라이브러리를 선택 또는 스크리닝하여, 활성(임의로는 돌연변이) RS의 풀을 제공하는 단계; 및 (f) 비 천연 코딩된 아미노산의 부재하에 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 선호적으로 아미노아실화시키는 활성(임의로는 돌연변이) RS에 대한 풀을 음으로 선택 또는 스크리닝하여, 하나 이상의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍을 제공하는 단계[여기서, 상기 하나 이상의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은 비 천연 코딩된 아미노산에 특이적인 재조합 O-RS 및 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 포함함]. 이 방법에 의하여 생산된 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍이 포함된다, 예를 들어, 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은 예를 들어, mutRNATyr-mutTyrRS 쌍 예를 들어, mutRNATyr-SS12TyrRS 쌍, mutRNALeu-mutLeuRS 쌍, mutRNAThr-mutThrRS 쌍, mutRNAGlu-mutGluRS 쌍 등을 포함할 수 있다. 부가적으로 이러한 방법에 있어서, 제1 및 제3 유기체는 동일하다(예를 들어, 메타노코커스 재너쉬).

[0377] 제2 유기체의 생체 내 번역 시스템에 사용하기 위한 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 선택하는 방법도 또한 본 발명에 포함된다. 본 발명의 방법은 제1 유기체로부터 분리 또는 유래된 마커 유전자, tRNA 및 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)를 제2 유기체로부터 유래된 세포의 제1 세트에 도입시키는 단계; 마커 유전자 및 tRNA를 제2 유기체로부터 얻어진 이중체 세포 세트에 도입시키는 단계; 및 이중체 세포 세트 내에서 생존하지 못하는 제1 세트 내의 생존 세포에 대하여 선택하거나, 또는 이중체 세포 세트 내에서 특이적 스크리닝 반응을 나타내지 못하는 세포에 대하여 스크리닝하는 단계[여기서, 상기 제1 세트 및 이중체 세포 세트는 선택 또는 스크리닝 제제의 존재하에 성장하고, 생존하거나 또는 스크리닝된 세포는 제2 유기체의 생체 내 번역 시스템 내에서 사용되는 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 포함함]를 포함한다. 하나의 구체예에서, 비교 및 선택 또는 스크리닝 단계는 생체 내 상보성 검정법을 포함한다. 상기 선택 또는 스크리닝 제제의 농도는 다양할 수 있다.

[0378] 본 발명의 유기체는 다양한 유기체 및 이의 다양한 조합을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 방법의 제1 및 제2 유기체는 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 하나의 구체예에서, 유기체는 원핵 생물 유기체 예를 들어, 메타노코커스 재너쉬, 메타노박테리움 서모오토티로피쿰, 할로박테리아, 에스케리챠 콜라이, 에이.펠기두스, 피.퓨리오서스, 피.호리코시, 에이.페르닉스, 티.서모필러스 등 일 수 있다. 대안적으로, 상기 유기체는 진핵 유기체 예를 들어, 식물(예를 들어, 복잡한 식물 예를 들어, 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물), 조류, 원생 생물, 곰팡이(예를 들어, 효모 등), 동물(예를 들어, 포유 동물, 곤충, 절지 동물 등) 등을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 제2 유기체는 원핵 유기체 예를 들어, 메타노코커스 재너쉬, 메타노박테리움 서모오토티로피쿰, 할로박테리아, 에스케리챠 콜라이, 에이.펠기두스, 할로박테리아, 피.퓨리오서스, 피.호리코시, 에이.페르닉스, 티.서모필러스 등일 수 있다. 대안적으로, 제2 유기체는 진핵 유기체 예를 들어, 효모, 동물 세포, 식물 세포, 곰팡이, 포유 동물 세포 등일 수 있다. 다양한 구체예에서, 제1 및 제2 유기체는 상이하다.

VI. 비 천연 발생 아미노산의 ABP내 위치

[0379] 본 발명은 하나 이상의 비 천연 발생 아미노산을 ABP에 삽입시키는 것에 관한 것이다. 하나 이상의 비 천연 발생 아미노산은 폴리펩티드의 활성을 파괴하지 않는 특정 위치에 삽입될 수 있다. 이는 "보존적" 치환 예를 들어, 소수성 아미노산과 소수성 아미노산의 치환, 용적이 큰 아미노산과 용적이 큰 아미노산의 치환, 친수성

아미노산과 친수성 아미노산의 치환을 가하고/가하거나 활성에 불필요한 위치에 비 천연 발생 아미노산을 삽입함으로써 이루어질 수 있다.

[0381] 다양한 생화학적 연구 및 구조적 접근 방법은 항원-결합 폴리펩티드 내에 존재하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환에 바람직한 위치를 선택하는데 사용된다. 폴리펩티드 사슬중 임의의 위치는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 삽입시키도록 선택하는데 적당하며, 선택은 합리적 고안을 바탕으로 할 수 있거나 또는 임의의 구체적인 목적을 가지거나 또는 구체적 목적도 없이 랜덤한 선택에 의할 수 있다는 사실은 당 업자에게 용이하게 이해된다. 목적 위치를 선택함으로써 임의의 목적 특성 또는 활성[예를 들어, 작동약, 초-작동약, 역 작동약, 길항제, 수용체 결합 조절제, 수용체 활성 조절제, 이량체 또는 다량체 형성, 원래의 분자에 비하여 변화가 없는 활성 또는 특성, 또는 폴리펩티드의 임의의 물리적 또는 화학적 특성 예를 들어, 가용성, 응집성 또는 안정성의 조작]을 보유하는 ABP 분자를 제조할 수 있다. 예를 들어, ABP의 생물 활성에 필요한 폴리펩티드 내 위치는 당 업계에 공지된 알라닌 스캐닝 또는 상동체 스캐닝 방법을 사용하여 동정될 수 있다. 알라닌 또는 상동체 스캐닝 돌연변이 유발법에 의하여 생물 활성에 중요한 것으로 확인된 잔기 이외의 잔기는, 폴리펩티드에 대하여 구하여진 목적 활성에 따라서 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환에 대한 훌륭한 후보가 될 수 있다. 대안적으로 생물 활성에 중요한 것으로 동정된 위치는 또한, 폴리펩티드에 대하여 구하여진 목적 활성에 따라서 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환에 대한 훌륭한 후보가 될 수도 있다. 다른 대안으로서는 간단히 폴리펩티드 사슬 상의 각각의 위치 내 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 연속적으로 치환하여 폴리펩티드의 활성에 대한 영향을 관찰하는 방법이 있다. 임의의 폴리펩티드에 있어서 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환에 대한 위치를 선택하는 임의의 수단, 기술 또는 방법이 본 발명에 사용하기에 적당하다는 사실은 당 업자에게 용이하게 이해된다.

[0382] 일단 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 허용하지 않는 것으로 보이는 잔기가 제거되면, 나머지 각각의 위치에 제시된 치환의 영향은 항원-결합 폴리펩티드와 이의 결합 파트너의 2차, 3차 또는 4차 구조 또는 3차원 결정 구조로부터 평가될 수 있다. 그러므로, 당 업자는 용이하게 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환될 수 있는 아미노산 위치를 동정할 수 있다.

[0383] 비-천연적으로 코딩된 아미노산 삽입에 있어서 대표적인 잔기로서는 잠재적 항원 결합 부위로부터 배제되는 잔기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 이를 잔기는 용매에 완전히 또는 부분적으로 노출될 수 있고, 인접한 잔기와 최소의 수소 결합 상호 작용을 나타내거나 또는 수소 결합 상호 작용을 나타내지 않으며, 인접한 반응성 잔기에 최소한으로 노출될 수 있고, ABP의 노출면 중 하나 이상에 존재할 수 있으며, 제2의 ABP와 병렬하여 존재하는 ABP의 위치(들), 또는 기타 분자 또는 이의 단편일 수 있고, ABP의 3차원, 2차, 3차 또는 4차 구조, 이의 항원에 결합되어 있는지 또는 결합되어 있지 않은지 여부, 또는 다른 ABP이나 기타 생물 활성 분자에 커플링되었는지 또는 커플링되지 않았는지 여부에 의해 예측되는 바와 같이 매우 유연하거나 또는 구조적으로 견고한 부위 내에 존재할 수 있거나, 또는 의도로 하는 바와 같이 완전한 구조의 유연성 또는 견고성에 변화를 주어 ABP 자체 또는 하나 이상의 ABP를 포함하는 이량체 또는 다량체의 형태를 조절할 수 있다. 비 천연 아미노산의 삽입을 위한 잔기는 절단 서열, 항체 단편 또는 ABP를 연결시키는 링커 서열, 항체-결합 영역(예를 들어, myc tag, FLAG 또는 poly-His) 또는 기타 친화성계 서열(예를 들어, FLAG, poly-His, GST 등)일 수 있다. 비 천연 아미노산의 삽입을 위한 잔기는 ABP의 N-말단 또는 C-말단 잔기 또는 ABP의 비 항원 결합 잔기일 수 있다.

[0384] 다양한 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 ABP 내 소정의 위치에서 치환될 수 있거나, 또는 이 위치에 삽입될 수 있다. 일반적으로, 특정 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 임의의 수단에 의해 측정된 ABP의 2차, 3차 또는 4차 구조, 또는 항원과 ABP의 3차원 결정 구조의 관찰 결과, 보존적 치환부[즉, 아릴계 비-천연적으로 코딩된 아미노산 예를 들어, p-아세틸페닐알라닌 또는 Phe, Tyr 또는 Trp에 대하여 치환되는 0-프로파길티로신]에 대한 선호도, 그리고 항원-결합 폴리펩티드로의 도입[예를 들어, 알킨 부위를 보유하는 수용성 중합체를 사용하여 휘스젠 [3 + 2] 고리 첨가 반응을 수행하기 원하는 경우, 또는 차례로 포스핀 부위를 삽입하는 아릴 에스테르 보유 수용성 중합체와의 아미드 결합 형성 반응을 수행하기 원하는 경우에는, 4-아지도페닐알라닌의 도입]을 의도로 하는 특이적 컨쥬게이트화 화학 반응을 바탕으로 하여 삽입 여부에 대해 선택된다.

[0385] 하나의 구체예에서, 본 방법은 추가로 단백질에 제1 반응기를 포함하는 인공적 아미노산을 삽입시키는 단계; 및 단백질과 제2의 반응기를 포함하는 분자(예를 들어, 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광 가교제, 방사성 핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화성 표지, 광 친화성 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이트화제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 수용성 텐드리머, 시클로텍스

트린, 억제 리보핵산, 생체 적합 물질, 나노 입자, 스픬 표지, 형광단, 금속-함유 부위, 방사성 부위, 신규의 작용기, 기타 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호 작용하는 기, 포토케이지 부위(photocaged moiety), 광이성화 부위, 바이오틴, 바이오틴 유도체, 바이오틴 유사체, 중원자 삽입 부위, 화학적으로 절단 가능한 기, 광 절단기, 연장된 측 쇄, 탄소 결합 당, 산화 환원 활성제, 아미노 티오산, 독성 부위, 동위 원소 표지화된 부위, 생물 물리학적 프로브, 인광기, 화학 발광기, 전자 치밀기, 자성 기, 삽입기, 발색단, 에너지 전이제, 생물 활성 제제, 검출가능한 표지, 소 분자를 접촉시키는 것을 포함하거나, 또는 상기 분자들을 임의로 조합하여 접촉시키는 것, 또는 임의의 기타 바람직한 화합물 또는 물질)를 접촉시키는 단계를 포함한다. 제1 반응기는 제2 반응기와 반응하여, [3 + 2] 고리 첨가 반응을 통해서 인공적 아미노산에 분자를 결합시킨다. 하나의 구체예에서, 제1 반응기는 알카닐 또는 아지도 부위이며, 제2 반응기는 아지도 또는 알카닐 부위이다. 예를 들어, 제1 반응기는 알카닐 부위(예를 들어, 인공적 아미노산 p-프로파길옥시페닐알라닌 내 알카닐 부위)이고, 제2 반응기는 아지도 부위이다. 다른 예에 있어서, 제1 반응기는 아지도 부위(예를 들어, 인공적 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌 내 아지도 부위)이고, 제2 반응기는 알카닐 부위이다.

[0386]

몇몇 경우에 있어서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 치환은 항원-결합 폴리펩티드 내에서 기타 첨가, 치환 또는 결실과 함께 발생하여, 기타 ABP의 생물학적 특성에 영향을 미칠 것이다. 몇몇 경우에 있어서, 기타 첨가, 치환 또는 결실은 ABP의 안정성(예를 들어, 단백 분해성 분해에 대한 내성)을 증가시키거나, 또는 ABP 수용체 또는 항원에 대한 ABP의 친화성을 증가시킬 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 다른 첨가, 치환 또는 결실은 항원-결합 폴리펩티드의 가용성(예를 들어, 이.콜라이 또는 기타 숙주 세포에서 발현되는 경우)을 증가시킬 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 첨가, 치환 또는 결실은 이.콜라이 또는 기타 재조합 숙주 세포 내에서의 발현 이후의 폴리펩티드 가용성을 증가시킬 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 이.콜라이 또는 기타 재조합 숙주 세포 내에서의 발현 이후의 폴리펩티드 가용성을 증가시키는 비 천연 아미노산의 삽입을 위한 다른 위치에 더하여, 위치들은 천연 코딩 또는 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환용으로서 선택된다. 몇몇 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는 ABP 수용체에 대한 친화성을 조절하거나, 수용체의 이량체화를 조절(예를 들어, 증가 또는 감소)하거나, 수용체의 이량체를 안정화시키거나, 혈류내 반감기를 조절하거나, 방출 또는 생체 적합성을 조절하거나, 정제를 촉진하거나, 또는 특정한 투여 경로를 개선시키거나 변경하는, 또 다른 첨가, 치환 또는 결실을 포함한다. 이와 유사하게, 항원-결합 폴리펩티드는 검출(예를 들어, GFP), 정제, 조직 또는 세포막을 통한 이동, 전구 약물의 방출 또는 활성화, ABP 크기 감소 또는 기타 폴리펩티드의 특성을 개선시키는, 화학 절단 서열 또는 효소 절단 서열, 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 항체-결합 영역(예를 들어, FLAG 또는 poly-His) 또는 기타 친화성계 서열(예를 들어, FLAG, poly-His, GST 등) 또는 결합된 분자(예를 들어, 바이오틴)를 포함할 수 있다.

[0387]

몇몇 구체예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 아미노산은 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 몇몇 경우에 있어서, ABP는 추가로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 치환 즉, 천연 발생 아미노산에 대한 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 치환을 추가로 포함한다. 몇몇 구체예에서, ABP의 후속 부위에 있는 2개 이상의 잔기는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 몇몇 경우에 있어서, 2 이상의 비 천연 코딩 잔기는 하나 이상의 저분자량 선형 또는 분지형 PEG(질량 약 5~20 kDa 이하인 PEG)에 결합되어, 단일의, 고 분자량 PEG에 결합된 화학 종에 대한 결합 친화성 및 상당한 혈청 반감기를 강화시킨다.

[0388]

몇몇 구체예에 있어서, 2개 이하의 항원-결합 폴리펩티드 잔기는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다.

[0389]

VII. 비 진핵 생물 및 진핵 생물에서의 발현

[0390]

클로닝된 ABP 폴리뉴클레오티드를 고도로 발현시키기 위하여, 통상적으로 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 전사를 유도하는 강력한 프로모터, 전사/번역 종결자를 함유하는 발현 벡터에 서브 클로닝시키고, 단백질을 코딩하는 핵산의 경우에는 번역 개시를 위한 리보좀 결합 위치를 추가로 포함하는 발현 벡터에 서브 클로닝시킨다. 적당한 박테리아 프로모터는 당 업계 및 문헌[예를 들어, Sambrook의 다수 및 Ausubel의 다수]에 널리 공지되어 있다.

[0391]

본 발명의 ABP 폴리펩티드를 발현시키기 위한 박테리아 발현 시스템은 예를 들어, 이.콜라이, 바실러스 속, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 애어루기노사, 슈도모나스 푸티다 및 살모넬라로부터 구할 수 있다[Palva와 다수, Gene 22:229-235 (1983); Mosbach의 다수, Nature 302:543-545 (1983)]. 이러한 발현 시스템용 키트는 시판중에 있다. 포유 동물 세포, 효모, 및 곤충 세포에 대한 진핵 생물 발현 시스템은 당 업계에 널리 공지되어

있으며, 또한 시판되고도 있다. 오르토고날 tRNA 및 아미노아실 tRNA 합성효소(전술함)가 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드를 발현시키는데에 사용될 경우, 발현용 숙주 세포는 이 숙주 세포가 오르토고날 성분을 사용하는 능력을 바탕으로 하여 선택된다. 대표적인 숙주 세포로서는 그램-양성 박테리아(예를 들어, 비.브레비스, 비.서브 틸리스 또는 스트렙토마이세스) 및 그램-음성 박테리아(이.콜라이, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 애어 루기노사, 슈도모나스 푸티다), 그리고 효모 및 기타 진핵 생물 세포를 포함한다. O-tRNA/O-RS 쌍을 포함하는 세포는 본원에 기술되어 있다.

[0392] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비 진핵 숙주 세포는 다량으로 유용한 인공적 아미노산을 포함하는 단백질을 합성하는 능력을 제공한다. 하나의 측면에서, 조성물은 예를 들어, 10 마이크로그램 이상, 50 마이크로그램 이상, 75 마이크로그램 이상, 100 마이크로그램 이상, 200 마이크로그램 이상, 250 마이크로그램 이상, 500 마이크로그램 이상, 1 밀리그램 이상, 10 밀리그램 이상, 100 밀리그램 이상, 1 그램 이상의 단백질(인공적 아미노산을 포함하는 단백질)을, 생체 내 단백질 생산 방법으로 얻을 수 있는 양만큼 포함할 수도 있다[제조합 단백질 생산 및 정제에 관하여는 본원에 제공됨]. 다른 측면에서, 단백질은 임의로는 조성물 내에 예를 들어, 1 리터당 10 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 50 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 75 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 100 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 200 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 250 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 500 마이크로그램 이상의 단백질, 1 리터당 1 밀리그램 이상의 단백질, 또는 1 리터당 10 밀리그램 이상의 단백질의 농도로 예를 들어, 세포 용해물, 완충액, 약학적 완충액 또는 기타 액체 혼탁액 내에 존재한다[예를 들어, 약 1 n l ~ 약 100 l 의 부피로 존재]. 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 진핵 생물 세포 내 단백질을 다량[예를 들어, 시험관 내 단백질 번역에 있어서 기타 방법에 의해 통상적으로 얻을 수 있는 양보다 다량] 생산하는 것은 본 발명의 특징을 이룬다.

[0393] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비 진핵 숙주 세포는 인공적 아미노산을 유효하게 다량 포함하는 단백질을 생합성하는 능력을 제공한다. 예를 들어, 인공적 아미노산을 포함하는 단백질은 세포 추출물, 세포 용해물, 배양 배지, 완충액 내에 예를 들어, 10 µg/l 이상, 50 µg/l 이상, 75 µg/l 이상, 100 µg/l 이상, 200 µg/l 이상, 250 µg/l 이상, 500 µg/l 이상, 1 mg/l 이상, 2 mg/l 이상, 3 mg/l 이상, 4 mg/l 이상, 5 mg/l 이상, 6 mg/l 이상, 7 mg/l 이상, 8 mg/l 이상, 9 mg/l 이상, 10 mg/l 이상, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/l 이상, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l 이상의 농도로 생산될 수 있다.

I. 발현 시스템, 배양 및 분리

[0395] ABP는 임의의 수의 적당한 발현 시스템 예를 들어, 효모, 곤충 세포, 포유 동물 세포 및 박테리아 내에서 발현될 수 있다. 대표적인 발현 시스템에 관한 설명은 이하에 나타내었다.

효모 : 본원에 사용된 "효모"란 용어는, ABP를 코딩하는 유전자를 발현시킬 수 있는 다양한 효모들 중 임의의 것을 포함한다. 이러한 효모로서는 자낭 훌씨 생산 효모(엔도마이세탈레스; *Endomycetales*), 담자 포자 효모 및 불완전 곰팡이(블라스토마이세즈; *Blastomycetes*) 군에 속하는 효모를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 자낭 훌씨 형성 효모는 2개의 군 즉, 스퍼모포토라세아(*Spermophthoraceae*) 및 사카로마이세타세아(*Saccharomycetaceae*)로 분류된다. 후자는 4개의 하위 군 즉, 쉬조사카로마이코이데아(*Schizosaccharomycoideae*)(예를 들어, 쉬조사카로아니세스 속(*Schizosaccharomyces*)), 나드소니외데아(*Nadsonioideae*), 리포마이코이데아(*Lipomycoideae*) 및 사카로마이코이데아(*Saccharomycoideae*)(예를 들어, 피치아(*Pichia*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*))으로 이루어져 있다. 담자 포자 효모는 류코스포리듐(*Leucosporidium*), 로도스포리듐(*Rhodosporidium*), 스포리디오볼루스(*Sporidiobolus*), 필로바시디움(*Filobasidium*) 및 필로바시디엘라(*Filobasidiella*) 속을 포함한다. 불완전 곰팡이(블라스토마이세즈; *Blastomycetes*) 군에 속하는 효모는 2개의 군, 즉, 스포로볼로마이세타세아(*Sporobolomycetaceae*)(예를 들어, 스포로볼로마이세스(*Sporobolomyces*) 및 불레라(*Bullera*) 속) 및 크립토코카세아(*Cryptococcaceae*)(예를 들어, 칸디다(*Candida*) 속)으로 분류된다.

[0397] 본 발명에 사용되는 종의 구체예로서는, 피치아, 클루이베로마이세스, 사카로마이세스, 쉬조사카로마이세스, 한세눌라(*Hansenula*), 토룰롭시스(*Torulopsis*) 및 칸디다(*Candida*) 예를 들어, 피.파스토리스(*P. pastoris*), 피.길레리몬디(*P. guillermondi*), 에스.세레비지애(*S. cerevisiae*), 에스.칼스버겐시스(*S. carlsbergensis*), 에스.디아스타티쿠스(*S. diastaticus*), 에스.도우글라시(*S. douglasii*), 에스.클루이베리(*S. kluveri*), 에스.노르벤시스(*S. norbensis*), 에스.오비포르미스(*S. oviformis*), 케이.락티스(*K. lactis*), 케이.프라길리스(*K. fragilis*), 씨.알비칸스(*C. albicans*), 씨.말토사(*C. maltosa*) 및 에이치.폴리몰파(*H. polymorpha*)를 포함

한다.

[0398] ABP의 발현에 적당한 효모를 선택하는 것은 당 업자의 통상의 기술로써 해결할 수 있다. 발현용 효모 숙주를 선택함에 있어서, 적당한 숙주는 예를 들어, 양호한 분비능, 저 단백 분해 활성, 양호한 분비능, 양호한 가용성 단백질 생산능, 및 전체적인 강건함을 보유하는 것을 포함할 수 있다. 효모는 일반적으로 다양한 공급원 예를 들어, 효모 유전자 스톡 센터(Yeast Genetic Stock Center), 생물 물리학 및 의학 물리부(Department of Biophysics and Medical Physics), 캘리포니아 대학(Berkeley, CA) 및 미국 모식균 배양 수집소(American Type Culture Collection ; ATCC)(Manassas, VA)로부터 얻을 수 있다.

[0399] "효모 숙주" 또는 "효모 숙주 세포"라는 용어는, 재조합 벡터 또는 기타 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용되는 효모를 포함한다. 상기 용어는 재조합 벡터 또는 기타 운반 DNA를 수용한 원래의 효모 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일의 균원 세포의 자손은, 우연하거나 또는 의도적인 돌연변이로 인하여, 형태 또는 기원 부모에 대한 계놈 DNA나 총 DNA 상보체와 완전히 동일할 필요는 없다는 사실을 이해할 수 있다. 관련 특성 예를 들어, ABP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재에 의하여 특성 규명될 균원과 충분히 유사한 균원 세포의 자손은 본 정의에 따른 자손에 포함된다.

[0400] 외부 염색체 레플리콘 또는 삽입 벡터를 포함하는, 발현 및 형질 전환 벡터가 예를 들어, 다수의 효모 숙주로의 형질 전환용으로 개발되었다. 예를 들어, 발현 벡터는 에스.세레비지애(*S. cerevisiae*) (Sikorski와 다수, GENETICS (1998) 112:19; Ito와 다수, J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen와 다수, PROC NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); 씨.알비칸스(*C. albicans*) (Kurtz와 다수, MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); 씨.말토사(*C. maltosa*) (Kunze와 다수, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 에이치.폴리모파(*H. polymorpha*) (Gleeson와 다수, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp와 다수, MOL. GEN. GENET. (1986) 202:302); 케이.플라길리스(*K. fragilis*) (Das와 다수, J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); 케이.락티스(*K. lactis*) (De Louvencourt와 다수, J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg와 다수, BIO/TECHNOLOGY (1990) 8:135); 피.길레리몬디(*P. guilliermondii*) (Kunze와 다수, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 피.파스토리스(*P. pastoris*) (미국 특허 제 5,324,639 호; 동 제 4,929,555 호; 및 동 제 4,837,148 호; Cregg와 다수, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); 쉬조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, NATURE (1981) 300:706); 및 와이.리폴리티카(*Y. lipolytica*) (Davidow와 다수, CURR. GENET. (1985) 10:380 (1985); Gaillardin와 다수, CURR. GENET. (1985) 10:49); 에이.니들란스(*A. nidulans*) (Ballance와 다수, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn와 다수, GENE (1983) 26:205-221; 및 Yelton와 다수, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); 에이.나이저(*A. niger*) (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475479); 티.리시아(*T. reesia*) (EP 0 244 234); 및 사상 곰팡이 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Toxopocladium*)(WO 91/00357)에 대하여 개발되었다[상기 문현들은 각각 본원에 참고용으로 인용되어 있음].

[0401] 효모 벡터용 조절 서열은 당 업자에게 널리 공지되어 있으며, 이로서는 유전자 예를 들어, 알콜 탈수소효소(ADH)(EP 0 284 044); 애놀라제; 글루코키나제; 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소; 글리세르알데히드-3-포스페이트-탈수소효소(GAP 또는 GAPDH); 헥소키나제; 포스포프록토키나제; 3-포스포글리서레이트 뮤타제; 및 피루베이트 키나제(PyK)(EP 0 329 203) 유전자로부터 유래된 프로모터 부위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 산 포스파타제를 코딩하는 효모 PH05 유전자는 또한 유용한 프로모터 서열을 제공할 수 있다[Myanohara와 다수, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1]. 효모 숙주와 함께 사용되기에 적당한 기타 프로모터 서열로서는 3-포스포글리서레이트 키나제(Hitzeman와 다수, J. BiOL. CHEM. (1980) 255:2073); 및 기타 당 분해 효소 예를 들어, 피루베이트 디카복실라제, 트리오스포스페이트 이성화 효소 및 포스포글루코즈 이성화 효소(Holland와 다수, BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess와 다수, J. ADV. ENZYME REG. (1968) 7:149)에 대한 프로모터를 포함할 수 있다. 성장 조건에 따라 제어되는 전사에 대한 부가의 이점을 보유하는 유도성 효모 프로모터는 알콜 탈수소효소 2; 이소시토크롬 C; 산 포스파타제; 메탈로티오네인; 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소 효소; 질소 대사와 관련된 분해성 효소; 및 말토즈와 갈락토즈 이용에 관여하는 효소에 대한 프로모터 부위를 포함할 수 있다. 효모 발현에 사용하기에 적당한 벡터 및 프로모터에 관하여는 추가로 EP 0 073 657에 기술되어 있다.

[0402] 효모 인핸서는 또한 효모 프로모터와 함께 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 합성 프로모터는 효모 프로모터로서 작용할 수도 있다. 예를 들어, 효모 프로모터의 상류 활성화 서열(UAS)은 다른 효모 프로모터의 전사 활성화 부위와 결합하여 합성 하이브리드 프로모터를 형성할 수도 있다. 이러한 하이브리드 프로모터의 예로서는, GAP 전사 활성화 부위에 결합된 ADH 조절 서열을 포함한다. 미국 특허 제 4,880,734 호 및 동 제 4,876,197 호(본원에 참고용으로 인용됨)를 참조하시오. 하이브리드 프로모터의 다른 예로서는 ADH2, GAL4, GAL10, 또는 PH05 유전자

의 조절 서열을 포함하며, 또한 상기 프로모터는 예를 들어, GAP 또는 PyK와 같은 당 분해 효소 유전자의 전사 활성화 부위와 결합되어 있다. EP 0 164 556 을 참조하시오. 더욱이, 효모 프로모터는 효모 RNA 중합 효소와 결합하여 전사를 개시하는 능력을 갖는 비 효모 기원의 천연 발생 프로모터를 포함할 수 있다.

[0403] 효모 발현 벡터의 일부를 포함할 수 있는 기타 조절 인자로서는 예를 들어, GAPDH 또는 에놀라제 유전자로부터 유래된 종결자를 포함한다[Holland와 다수, J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385]. 더욱이, 2 μ 플라스미드 기원으로부터 유래된 복제 기원은 효모에 적당하다. 효모에 사용하기에 적당한 선택 유전자는 효모 플라스미드 내에 존재하는 *trp1* 유전자이다. 문헌[Tschemper와 다수, GENE (1980) 10:157; Kingsman와 다수, GENE (1979) 7:141]을 참조하시오. 상기 *trp1* 유전자는 트립토판 중에서 성장하는 능력이 흡결된 효모의 돌연변이 변종에 대한 선택 마커를 제공한다. 이와 유사하게, *Leu2*-결핍 효모 변종(ATCC 20,622 또는 38,626)은 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지의 플라스미드에 의해 보강된다.

[0404] 외인성 DNA를 효모 숙주에 도입시키는 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있으며, 통상적으로는 알칼리 양이온 처리된 구상 원시 세포(spheroplast) 또는 원상태의 효모 숙주 세포의 형질 전환을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 효모의 형질 전환은 문헌[Hsiao와 다수, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 및 Van Solingen와 다수, J. BACT. (1977) 130:946]에 기술된 방법에 따라서 수행될 수 있다. 그러나, DNA를 예를 들어, 핵 주입, 전기 천공 또는 원형질체 융합에 의해 세포에 도입시키는 기타 방법은 또한 일반적으로 문헌[SAMBROOK와 다수, MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001)]에 기술된 바와 같이 사용될 수 있다. 이후 효모 숙주 세포는 당 업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여 배양된다.

[0405] 효모 숙주 세포 내에서 이종 단백질을 발현시키는 다른 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 미국 특허 공보 2002/0055169, 미국 특허 제 6,361,969 호; 동 제 6,312,923 호; 동 제 6,183,985 호; 동 제 6,083,723 호; 동 제 6,017,731 호; 동 제 5,674,706 호; 동 제 5,629,203 호; 동 제 5,602,034 호; 및 동 제 5,089,398 호; 미국 재심사 특허 제 RE37,343 및 RE35,749; PCT 특허 출원 공보 WO 99/078621; WO 98/37208; 및 WO 98/26080; 유럽 특허 출원 EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; EP 0 460 071; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; 및 EP 0 164 556를 참조하시오. 또한, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Gellissen와 다수, ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos와 다수, YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddele, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7]을 참조하시오.

[0406] 효모 숙주 변종은 당 업자에게 널리 공지된 표준 유가식 발효법을 사용하여 증식 단계 동안 발효기 내에서 성장 시킬 수 있다. 발효 방법은 특정 효모 숙주의 탄소 이용 경로 또는 발현 제어 방식에 대한 차이점이 설명되도록 조정할 수 있다. 예를 들어, 사카로마이세스 효모 숙주의 발효시에는 단일의 글루코즈 공급액, 복합 질소 공급원(예를 들어, 카세인 가수 분해물)이 필요하고 또한 복수회 비타민을 보충해 줄 필요가 있다. 이와는 반대로, 메탄올 자화 효모인 피.파스토리스는 글리세롤, 메탄올 및 미량 무기 공급물을 필요로 할 수 있으나, 최적의 성장 및 발현을 위해서는 단순 암모늄(질소) 염만을 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[미국 특허 제 5,324,639 호; Elliott와 다수, J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; 및 Fieschko와 다수, BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113]을 참조하시오.

[0407] 그러나, 이러한 발효 방법은 사용된 효모 숙주 변종과는 상관없이 임의의 공통된 특징을 가질 수 있다. 예를 들어, 성장 제한 영양소, 통상적으로 탄소는 증식 단계에 발효기에 첨가되어 숙주를 최대로 성장시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 발효 방법은 일반적으로 적당량의 탄소, 질소, 기초 염, 인 및 기타 미량 영양소(비타민, 미량 무기 물 및 염 등)를 함유하도록 고안된 발효 배지를 사용한다. 피치아와 함께 사용하기에 적당한 발효 배지의 예에 관하여는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 5,324,639 호 및 동 제 5,231,178 호에 기술되어 있다.

[0408] 바클로바이러스-감염된 곤충 세포: "곤충 숙주" 또는 "곤충 숙주 세포"라는 용어는 재조합 벡터 또는 기타 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용되는 곤충을 의미하는 것이다. 상기 용어는 형질 감염된 기원 곤충 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일의 근원 세포의 자손은 우연하거나 또는 의도된 돌연변이로 인하여, 형태, 또는 기원 부모에 대한 계놈 또는 총 DNA 상보체에 있어서 완전히 동일할 필요는 없다는 사실을 알 수 있다. 관련 특성 예를 들어, ABP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재에 의하여 특성 규명되는 근원 세포와 충분히 유사한 근원 세포의 자손은 본 정의에 의한 자손에 포함된다.

[0409] 적당한 곤충 세포의 ABP 발현에 대한 선택 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 몇몇 곤충 종은 당 업계에 널리 공지되어 있으며 시판되고 있다[예를 들어, 아에데스 애집티(*Aedes aegypti*), 봄비스 모리(*Bombyx mori*), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*), 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 및

트리코플러시아 니(*Trichoplusia ni*)]. 발현용 곤충 숙주를 선택함에 있어서, 적당한 숙주는 양호한 분비능, 저단백 분해 활성 및 전체적인 강건함을 보유하는 것을 포함할 수 있다. 곤충은 일반적으로 다양한 공급원 예를 들어, 곤충 유전자 스톡 센터(Insect Genetic Stock Center), 생물 물리학 및 의학 물리부, 캘리포니아 대학(Berkeley, CA) 및 미국 모식균 배양 수집소(ATCC)(Manassas, VA)로부터 얻을 수 있다.

[0410] 일반적으로, 바클로바이러스-감염된 곤충 발현 시스템의 성분은 운반 백터, 일반적으로 박테리아 플라스미드[바클로바이러스 게놈의 단편과 이종 유전자 삽입물이 발현되는 편리한 제한 위치 함유]; 운반 백터 내의 바클로바이러스-특이적 단편에 대하여 상동성인 서열을 보유하는 야생형 바클로바이러스[상기 운반 백터는 이종 유전자의 바클로바이러스 게놈으로의 상동성 재조합을 가능하게 함]; 및 적당한 곤충 숙주 세포 및 성장 배지를 포함한다. 백터 제조, 세포의 형질 감염, 플라크의 꾹킹(picking), 배양액 내 세포의 성장 등에 사용되는 재료, 방법 및 기술은 당 업계에 공지되어 있으며, 이에 관한 매뉴얼에는 이러한 기술에 관하여 상세히 설명되어 있다.

[0411] 이종 유전자를 운반 백터에 삽입한 후, 백터 및 야생형 바이러스 게놈은 백터와 바이러스 게놈이 재조합되어 있는 곤충 숙주 세포에 형질 감염된다. 꾹킹된 재조합 바이러스는 발현되고 재조합 플라크는 동정 및 정제된다. 바클로바이러스/곤충 세포 발현 시스템용 재료 및 방법은 키트의 형태로 예를 들어, 인비트로겐(Invitrogen Corp.)(Carlsbad, CA)으로부터 시판되고 있다. 이와 같은 기술에 관하여는 일반적으로 당 업자에게 공지되어 있으며, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN No. 1555 (1987)]에 상세히 기술되어 있다. 또한 문헌[RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL의 다수, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULO VIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); 및 O'REILLY의 다수, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]을 참조하시오.

[0412] 실제로, 바클로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 사용하여 다양한 이종 단백질을 생산하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 6,368,825 호; 동 제 6,342,216 호; 동 제 6,338,846 호; 동 제 6,261,805 호; 동 제 6,245,528 호, 동 제 6,225,060 호; 동 제 6,183,987 호; 동 제 6,168,932 호; 동 제 6,126,944 호; 동 제 6,096,304 호; 동 제 6,013,433 호; 동 제 5,965,393 호; 동 제 5,939,285 호; 동 제 5,891,676 호; 동 제 5,871,986 호; 동 제 5,861,279 호; 동 제 5,858,368 호; 동 제 5,843,733 호; 동 제 5,762,939 호; 동 제 5,753,220 호; 동 제 5,605,827 호; 동 제 5,583,023 호; 동 제 5,571,709 호; 동 제 5,516,657 호; 동 제 5,290,686 호; 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 92/03628; 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 88/07082를 참조하시오.

[0413] 바클로바이러스/곤충 세포 발현 시스템에 유용한 백터는 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 바클로바이러스인 오토그라파캘리포니카(*Autographacalifornica*) 핵 다각체병 바이러스(AcNPV)(조력자-의존성)로부터 유래된 곤충 발현 및 운반 백터와, 바이러스 발현 백터를 포함한다. 이 시스템으로부터 유래된 바이러스 발현 백터는 일반적으로 강력한 바이러스 다각체 유전자 프로모터를 사용하여 이종 유전자를 발현시킨다. 일반적으로 문헌[Reilly의 다수, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]을 참조하시오.

[0414] 외래 유전자를 바클로바이러스 게놈에 삽입하기 이전에, 전술한 성분들 예를 들어, 프로모터, 리더(원활 경우), 목적으로 하는 코딩 서열 및 전사 종결 서열은 통상적으로 중간체 이동 구조물(intermediate transplacement construct)(운반 백터)로 조립된다. 중간체 이동 구조물은 종종 숙주 예를 들어, 박테리아 내에 안정하게 유지될 수 있는 레플리콘 예를 들어, 외부 염색체 요소(예를 들어, 플라스미드)에 유지된다. 레플리콘은 복제 시스템을 보유할 것이므로, 이 레플리콘은 클로닝 및 증폭용인 적당한 숙주에 유지될 수 있을 것이다. 더욱 구체적으로, 상기 플라스미드는 다각체 폴리아데닐화 시그널(Miller의 다수, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177)과, 이.콜라이 내 선택 및 번식용 원핵 생물 앰피실린-내성(amp) 유전자 및 이.콜라이 내 선택 및 번식용 레플리콘의 기원을 포함할 수 있다.

[0415] 외래 유전자를 AcNPV에 도입시키는데 통상적으로 사용되는 이동 백터의 하나로서는 pAc373이 있다. 당 업자에게 공지된 다수의 기타 백터는 또한 예를 들어, pVL985를 포함하도록 고안되어, 그 결과 다각체 개시 코돈은 ATG에서 ATT로 바뀌고, ATT로부터 32개 염기쌍 하류에는 BamHI 클로닝 위치가 도입된다. 문헌[Luckow and Summers, 17 VIROLOGY 31 (1989)]을 참조하시오. 기타 시판되는 백터로서는 예를 들어, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 포함한다.

- [0416] 이종 유전자를 삽입한 후에, 운반 벡터 및 야생형 바클로바이러스 게놈은 곤충 세포 숙주에 공동 형질 감염된다. 이종 DNA를 바클로바이러스 내 목적 위치에 도입시키는 방법은 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith 외 다수, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 17:31]을 참조하시오. 예를 들어, 유전자 예를 들어, 각체 유전자에는 상동성 이종 교차 재조합법에 의하여 삽입이 이루어질 수 있고; 또한 목적 바클로바이러스 유전자에 조작된 제한 효소 위치에서도 삽입이 이루어질 수 있다. 문헌[Miller 외 다수, BIOESSAYS (1989) 4:91]을 참조하시오.
- [0417] 형질 감염은 전기 천공법에 의하여 수행될 수 있다. 문헌[TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501]을 참조하시오. 대안적으로, 리포좀은 곤충 세포를 재조합 발현 벡터 및 바클로바이러스로 형질 감염시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Liebman 외 다수, BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves 외 다수, BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura 외 다수, J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22):13570; Schmidt 외 다수, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert 외 다수, NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS 외 다수, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai 외 다수, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin 외 다수, NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost 외 다수, GENE (1997) 190:139; Jakobsson 외 다수, J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles 외 다수, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reversey 외 다수, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley 외 다수, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk 외 다수, J. VIROL. (1994) 68(2):766; 및 Peng 외 다수, BIOTECHNIQUES (1993) 14.2:274]을 참조하시오. 시판중인 리포좀으로서는 예를 들어, 셀펙틴(Cellfectin)(등록상표) 및 리포펙틴(Lipofectin)(등록상표)(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). 더욱이, 칼슘 포스페이트 형질 감염법도 사용될 수 있다. 문헌[TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; 및 Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501]을 참조하시오.
- [0418] 바클로바이러스 발현 벡터는 일반적으로 바클로바이러스 프로모터를 함유한다. 바클로바이러스 프로모터는 바클로바이러스 RNA 중합 효소와 결합하여 코딩 서열(예를 들어, 구조 유전자)의 mRNA로의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 말단에 인접하여 존재하는 전사 개시 부위를 보유할 것이다. 이러한 전사 개시 부위는 통상적으로 RNA 중합 효소 결합 위치 및 전사 개시 위치를 포함한다. 바클로바이러스 프로모터는 또한 제2의 영역 즉, 인핸서(존재한다면, 일반적으로 구조 유전자로부터 떨어져 존재함)를 보유할 수도 있다. 더욱이, 발현은 조절될 수 있거나 또는 보존적일 수 있다.
- [0419] 감염 주기에 있어서 후반기에 주로 전사되는 구조 유전자는 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 그 예로서는 바이러스 각체 단백질을 코딩하는 유전자[FRIESEN 외 다수, *The Regulation of Baculovirus Gene Expression, THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES* (1986); EP 0 127 839 및 0 155 476] 및 p10 단백질을 코딩하는 유전자[Vlak 외 다수, J. GEN. VIROL. (1988) 69:765]로부터 유래된 서열을 포함한다.
- [0420] 새로이 형성된 바클로바이러스 발현 벡터는 감염성 재조합 바클로바이러스로 팩킹되며, 이후에 성장한 플라크는 당 업자에게 공지된 기술로 정제될 수 있다. 문헌[Miller 외 다수, BIOESSAYS (1989) 4:91; SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)]을 참조하시오.
- [0421] 재조합 바클로바이러스 발현 벡터가 몇몇 곤충 세포로의 감염용으로 개발되었다. 재조합 바클로바이러스의 예로서는, 아에데스 애집티(ATCC No. CCL-125), 봄박스 모리(ATCC No. CRL-8910), 드로소필라 멜라노가스터(ATCC No. 1963), 스포도프테라 프루기페르다, 및 트리코플러시아 니를 포함한다. 문헌[WO 89/046,699; Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbone II 외 다수, J. VIROL. (1985) 56:153; Smith 외 다수, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156]을 참조하시오. 일반적으로, 문헌[Fraser 외 다수, IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225]을 참조하시오. 더욱 구체적으로, 바클로바이러스 발현 벡터 시스템으로서 사용되는 세포주로서는 Sf9 (스포도프테라 프루기페르다) (ATCC No. CRL-1711), Sf21 (스포도프테라 프루기페르다) (Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (트리코필시아 니) 및 High-Five(상표명) BTI-TN-5B1-4 (트리코필시아 니)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0422] 바클로바이러스/발현에 있어서 이종 폴리펩ти드의 직접 발현 및 융합 발현용인 세포 및 배양 배지가 시판되고 있으며, 세포 배양 기술은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다.
- [0423] 이.콜라이, 슈도모나스 종 및 기타 원핵 생물: 박테리아 발현 기술은 당 업계에 널리 공지되어 있다. 다양한 벡터가 박테리아 숙주에 사용될 수 있다. 벡터는 단일 복사체일 수 있거나, 소수 또는 다수의 복사체 벡터일 수

있다. 벡터는 클로닝 및/또는 발현용으로 사용될 수 있다. 벡터에 관한 다수의 문헌을 고려하였을 때, 다수의 벡터의 시판성과, 벡터에 관하여 설명된 매뉴얼 및 이 벡터의 제한 지도 및 특성에 관한 더 이상의 논의는 여기에 필요하지 않다. 널리 공지된 바와 같이, 벡터는 일반적으로 선택 가능하도록 만드는 마커를 포함하는데, 여기서 상기 마커는 세포 독성 제제 내성, 원형양성 또는 면역성을 제공할 수 있다. 종종, 다수의 마커가 존재하며, 이 마커는 상이한 특성을 제공한다.

[0424] 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 중합 효소가 결합하여 코딩 서열(예를 들어, 구조 유전자)의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 말단에 인접하여 위치하는 전사 개시 부위를 보유할 것이다. 이러한 전사 개시 부위는 통상적으로 RNA 중합 효소 결합 위치 및 전사 개시 위치를 포함한다. 박테리아 프로모터는 또한 RNA 합성이 개시되는 인접 RNA 중합 효소 결합 위치와 중첩될 수 있는 제2 영역(작동자)을 보유할 수도 있다. 유전자 억제 단백질이 작동자에 결합하여 특정 유전자의 전사를 억제할 수 있는 것과 같이, 상기 작동자는 음 조정된(유도성) 전사를 가능하도록 만든다. 보존적 발현은 음 조절 요소 예를 들어, 작동자의 부재하에 일어날 수 있다. 뿐만 아니라, 양 조절은 유전자 활성 단백질 결합 서열(존재한다면, 일반적으로 RNA 중합 효소 결합 서열에 인접(5')하여 존재함)에 의하여 일어날 수 있다. 유전자 활성 단백질의 예로서는 에스케리차 콜라이(이.콜라이) 내 lac 오페론의 전사를 개시하는 것을 돋는 이화 생성물 활성 단백질(CAP)이 있다[Raibaugh 외 다수, ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. 그러므로, 조절된 발현은 양성 또는 음성일 수 있으므로, 전사를 증가 또는 감소시킬 수 있다.

[0425] 대사 경로 효소를 코딩하는 서열은 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 그 예로서는, 당 대사 효소 예를 들어, 갈락토즈, 락토즈(lac)[Chang 외 다수, NATURE (1977) 198:1056] 및 말토즈로부터 유래된 프로모터 서열을 포함한다. 부가 예로서는 생합성효소 예를 들어, 트립토판(trp)[본원에 참고용으로 인용되어 있는, Goeddel 외 다수, Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton 외 다수, NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; 미국 특허 제 4,738,921 호; EP Pub. Nos. 036 776 및 121 775] 생합성효소로부터 유래된 프로모터 서열을 포함한다. β -갈락토시다제(bla) 프로모터 시스템[Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], 박테리오파지 람다 PL[Shimatake 외 다수, NATURE (1981) 292:128] 및 T5[본원에 참고용으로 인용되어 있는, 미국 특허 제 4,689,406 호] 프로모터 시스템은 또한 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법은 강력한 프로모터 예를 들어, T7 프로모터를 이용하여, ABP를 고농도로 유도시킨다. 이러한 벡터의 예는 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 노바젠(Novagen)으로부터 시판되는 pET29 시리즈와, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 WO 99/05297에 개시된 pPOP 벡터를 포함한다. 이러한 발현 벡터 시스템은 숙주 세포 생존능 또는 성장 매개 변수에 영향을 미치지 않고 숙주 내에서 ABP를 고농도로 생산한다. pET19(Novagen)은 당 업계에 공지된 다른 벡터이다.

[0426] 뿐만 아니라, 자연에서 생성되지 않는 합성 프로모터는 또한 박테리아 프로모터로서 작용하기도 한다. 예를 들어, 하나의 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 전사 활성화 서열은 다른 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 오페론 서열에 결합되어, 합성 하이브리드 프로모터를 생성할 수 있다[본원에 참고용으로 인용되어 있는, 미국 특허 제 4,551,433 호]. 예를 들어, tac 프로모터는 lac 억제자에 의해 조절되는, trp 프로모터와 lac 오페론 서열을 모두 포함하는 하이브리드 trp-lac 프로모터이다[Amann 외 다수, GENE (1983) 25:167; de Boer 외 다수, PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. 또한, 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 중합 효소에 결합하여 전사를 개시할 수 있는 비 박테리아 기원의 천연 발생 프로모터를 포함할 수 있다. 비 박테리아 기원의 천연 발생 프로모터는 또한 음화성 RNA 중합 효소와 커플링되어 일부 유전자를 원핵 생물 내에서 고농도로 생산하도록 만들수 있다. 박테리오파지 T7 RNA 중합 효소/프로모터 시스템은 커플링된 프로모터 시스템의 일례이다[Studier 외 다수, J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor 외 다수, Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. 뿐만 아니라, 하이브리드 프로모터는 또한 박테리오파지 프로모터 및 이.콜라이 작동자 부위로 구성되어 있을 수 있다(EP Pub. No. 267 851).

[0427] 프로모터 서열로서의 기능 이외에, 효과적인 리보솜 결합 위치는 또한 원핵 생물 내에서의 외래 유전자의 발현에 유용하다. 이.콜라이에서, 리보솜 결합 위치를 샤인-달가노(SD) 서열이라고 부르는데, 이는 개시 코돈(ATG) 및 개시 코돈으로부터 3~11개 뉴클레오티드 상류에 위치하는, 길이 3~9 뉴클레오티드의 서열을 포함한다 [Shine 외 다수, NATURE (1975) 254:34]. 상기 SD 서열은 SD 서열과 이.콜라이 16S rRNA의 3' 말단 사이에서 염기쌍을 형성함으로써 mRNA가 리보솜에 결합하는 것을 촉진하여[Steitz 외 다수 "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)], 약한 리보솜-결합 위치로써 전핵 생물 유전자 및 원핵 생물 유전자를 발현시키는 것으로 생각된다[Sambrook 외 다수 "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 1989].

[0428] "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"라는 용어는, 재조합 벡터 또는 기타 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용되는 박테리아를 의미한다. 상기 용어는 형질 감염된 기원 박테리아 숙주 세포의 자손을 포함한다. 우연하거나 또는 의도된 돌연변이로 인하여, 단일 균원 세포의 자손은 형태 면에서, 또는 기원 부모에 대한 계놈 또는 총 DNA 상보체 면에서 완전히 동일할 필요는 없다. 관련 특성 예를 들어, ABP을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재에 의해 특성 규명된 부모와 충분히 유사한 부모 세포의 자손은 본 정의에 의하여 의도되는 자손에 포함된다.

[0429] ABP 발현용으로서 적당한 숙주 박테리아의 선택 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. 발현용 박테리아 숙주의 선택에 있어서, 적당한 숙주는 양호한 포유체 형성능, 저 단백 분해 활성 및 전체적인 강건함을 나타내는 숙주를 포함할 수 있다. 박테리아 숙주는 일반적으로 다양한 공급원 예를 들어, 박테리아 유전자 스톡 센터 (Bacterial Genetic Stock Center), 생물 물리학 및 의학 물리부, 캘리포니아 대학(Berkeley, CA) 및 미국 모식균 배양 수집소("ATCC") (Manassas, VA)로부터 얻을 수 있다. 상업적/제약학적 발효는 일반적으로 K 변종(예를 들어, W3110)으로부터 유래된 박테리아 또는 B 변종(예를 들어, BL21)으로부터 유래된 박테리아를 사용한다. 이러한 변종들의 성장 매개 변수는 널리 공지되어 있으며 확고하므로 특히 유용하다. 뿐만 아니라, 이러한 변종들은 비 병원성으로서, 안전 및 환경상의 이유로 상업적으로 매우 중요하다. 본 발명의 방법에 대한 하나의 구체 예에서, 상기 이.콜라이 숙주는 BL21의 변종이다. 본 발명의 방법의 다른 구체예에서, 상기 이.콜라이 숙주는 무 프로테아제(protease minus) 변종으로서, 예를 들어, OMP- 및 LON-가 있다. 본 발명의 방법에 대한 다른 구체예에서, 숙주 세포 변종은 슈도모나스 종으로서, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 애루기노사 및 슈도모나스 푸티다를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 슈도모나스 플루오레센스 biovar 1(MB101 변종)은 재조합 생산에 유용한 것으로 공지되어 있으며 치료적 단백질 생산 공정에 유용하다. 슈도모나스 발현 시스템의 예로서는 다우 케미칼 컴퍼니(The Dow Chemical Company)(Midland, MI; www.dow.com)의 숙주 변종 시스템을 포함한다. 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 4,755,465 호 및 동 제 4,859,600 호에는 슈도모나스 변종을 인간 성장 호르몬 생산용 숙주 세포로 사용하는 것에 관하여 기술되어 있다.

[0430] 일단, 재조합 숙주 세포 변종이 확립되면(즉, 발현 구조물이 숙주 세포에 도입되어 적당한 발현 구조물을 보유하는 숙주 세포가 분리되면), 재조합 숙주 세포 변종은 ABP 생산에 적당한 조건하에서 배양된다. 당 업자에게 명백한 바와 같이, 재조합 숙주 세포 변종의 배양 방법은 사용된 발현 구조물의 특성과 숙주 세포의 동일성에 따라서 달라질 것이다. 재조합 숙주 변종은 보통 당 업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 배양된다. 재조합 숙주 세포는 통상적으로 동화 가능한 탄소, 질소 및 무기염 공급원을 함유하고, 임의로는 비타민, 아미노산, 성장 인자를 함유하는 액체 배지, 및 당 업계에 널리 공지된 기타 단백성 배양 보충액 중에서 배양된다. 숙주 세포의 배양액에 대한 액체 배지는 의도하지 않은 미생물의 성장을 억제하는 항생제 또는 항 곰팡이 제제를 함유할 수도 있으며/있거나, 화합물 예를 들어, 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하는 항생제를 포함할 수도 있다.

[0431] 재조합 숙주 세포는 세포 수집(ABP가 세포 내에 축적되는 경우)하거나 또는 회분식 또는 연속 방식으로 배양 상 청액을 수집하면서, 회분식 또는 연속 방식으로 배양될 수 있다. 원핵 숙주 세포 내에서의 생산에 있어서, 회분식 배양 및 세포 수집이 바람직하다.

[0432] 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드는 일반적으로 재조합 시스템 내에서 발현된 이후에 정제된다. ABP는 당 업계에 공지된 다양한 방법에 의하여 숙주 세포로부터 정제될 수 있다. 일반적으로, 박테리아 숙주 세포 내에 생산된 ABP는 거의 용해되지 않거나 또는 불용성(포유체의 형태)이다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 아미노산 치환은 본원에 개시된 방법과 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 재조합 생산된 단백질의 가용성을 증가시킬 목적으로 선택된 항원-결합 폴리펩티드에 용이하게 가하여질 수 있다. 불용성 단백질의 경우, 단백질은 원심 분리에 의해 숙주 세포 용해물로부터 수집될 수 있으며, 또한 이후 세포를 균질화시킬 수도 있다. 거의 용해되지 않는 단백질의 경우, 화합물 예를 들어, 폴리에틸렌 이민(PEI)을 가하여 부분적으로 가용성인 단백질의 침전을 유도할 수 있다. 이후 침전된 단백질은 원심 분리에 의하여 편리하게 수집될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 당 업자에게 널리 공지된 다양한 방법을 이용하여 파괴 또는 균질화되어 세포 내부로부터 포유체를 방출시킬 수 있다. 숙주 세포 파괴 또는 균질화는 널리 공지된 방법 예를 들어, 효소 세포 파괴법, 초음파 처리, 다운스 균질화 또는 고압 방출 파괴법을 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 방법에 관한 하나의 구체예에서, 고압 방출 기술은 이.콜라이 숙주 세포를 파괴하여 ABP의 포유체를 방출하는데 사용된다. ABP의 포유체를 다룰 때, 예를 들어, 가용화, 기계적 전단 또는 단백 분해와 같은 인자로 인하여 포유체가 상실되지 않고 이 포유체의 수율을 최대화하기 위해, 반복시 균질화 시간을 최소화시키는 것이 유리하다.

- [0433] 이후 불용성 또는 침전된 ABP는 당 업계에 공지된 다수의 적당한 가용화 제제 중 임의의 것을 사용하여 용해될 수 있다. 바람직하게, ABP는 우레아 또는 구아니딘 염산염으로 용해된다. 용해된 ABP의 부피를 최소화하여, 편리하고 다루기 쉬운 회분 크기로써 다량의 회분을 생산할 수 있다. 재조합 숙주가 부피 수 천 리터인 회분 내에서 성장할 수 있을 경우, 이러한 인자는 거대 규모의 상업적 세팅에 있어서 상당한 영향을 미칠 수 있다. 뿐만 아니라, 특히 인간의 의약 제조용인 거대 규모의 상업적 세팅에서 ABP를 제조할 때, 가능한 한 기계 및 용기, 또는 단백질 생산물 자체를 손상시킬 수 있는 독성 화학 물질은 피해야 한다. 본 발명의 방법에 있어서, 보다 강한 변성제인 구아니딘 염소염을 사용하는 대신에 보다 약한 변성 제제인 우레아를 사용하면 ABP 포유체를 용해시킬 수 있다. 우레아를 사용하면 ABP의 생산 및 정제 공정에 사용되는 스테인레스 스틸 장치를 손상시킬 위험성이 감소됨과 동시에, ABP 포유체는 효과적으로 용해시킬 수 있게 된다.
- [0434] 가용성 ABP의 경우에, ABP는 주변 세포질 공간 또는 배양 배지 내에 분비될 수 있다. 뿐만 아니라, 가용성 ABP는 숙주 세포의 세포질 내에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 이전에 가용성 ABP를 농축시키는 것이 바람직할 수 있다. 당 업자에게 공지된 표준 기술은 예를 들어, 세포 용해물 또는 배양 배지로부터 유래된 가용성 ABP를 농축시키는 데에 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 당 업자에게 공지된 표준 기술은 숙주 세포를 파괴하여, 숙주 세포의 세포질 또는 주변 세포질 공간으로부터 가용성 ABP를 방출시킬 수 있다.
- [0435] ABP가 융합 단백질로서 생산될 때, 융합 서열은 제거되는 것이 바람직하다. 융합 서열은 효소적 또는 화학적 절단법, 바람직하게는 효소적 절단법에 의해 제거될 수 있다. 융합 서열의 효소적 제거는 당 업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 융합 서열 제거용 효소의 선택은 융합체의 동일성에 의해 결정될 것이고, 반응 조건은 당 업자에게 명백할 효소의 선택에 의해 특정될 것이다. 절단된 ABP는 널리 공지된 방법에 의하여 절단된 융합 서열로부터 정제되는 것이 바람직하다. 이러한 방법은 당 업자에게 명백한 융합 서열 및 ABP의 동일성 및 특성에 의하여 결정될 것이다. 정제 방법으로서는 크기-배제 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피 또는 투석 또는 이러한 방법들의 임의의 병행법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0436] ABP는 또한 정제되어 단백질 용액으로부터 DNA를 분리한다. DNA는 당 업계에 공지된 임의의 적당한 방법 예를 들어, 침전법 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해서 제거될 수 있으나, 핵산 침전 제제 예를 들어, 황산 프로타민으로 침전시킴으로써 제거되는 것이 바람직하다. ABP는 널리 공지된 표준적 방법 예를 들어, 원심 분리 또는 여과법을 이용하여 침전된 DNA로부터 분리될 수 있다. 숙주 핵산 분자를 제거하는 것은 ABP가 인간을 치료하는데 사용되고, 본 발명의 방법이 숙주 세포 DNA를 약학적으로 허용 가능한 수준까지 감소시키는 경우, 세팅에 중요한 요소이다.
- [0437] 소규모 또는 대규모 발효 방법 예를 들어, 발효조, 진탕 플라스크, 유동상 생물 반응기, 중공사 생물 반응기, 롤러 병 배양 시스템 및 교반 탱크 생물 반응기 시스템은 또한 단백질 발현에 사용될 수 있다. 상기 방법들은 각각 회분식, 유가식 또는 연속 방식 공정으로 수행될 수 있다.
- [0438] 본 발명의 인간 ABP는 일반적으로 당 업계의 표준적인 방법을 이용하여 회수될 수 있다. 예를 들어, 배양 배지 또는 세포 용해물은 원심 분리 또는 여과되어 세포 파편을 제거할 수 있다. 상청액은 목적 부피로 농축 또는 회석되거나, 또는 적당한 완충액으로 정용 여과되어, 추가 정제용 제조물을 조정할 수 있다. 본 발명의 ABP의 추가 정제 방법은 원래 형태로부터 유래된 ABP 변이체의 탈아민화 및 절단된 형태를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0439] 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드의 정제를 위하여 다음과 같은 대표적인 방법들 중 임의의 방법을 사용할 수 있다: 친화성 크로마토그래피; 음이온- 또는 양이온-교환 크로마토그래피(예를 들어, DEAE SEPHAROSE 사용); 실리카 상 크로마토그래피; 역상 HPLC; 젤 여과법(예를 들어, SEPHADEX G-75 사용); 소수성 상호 작용 크로마토그래피; 크기-배제 크로마토그래피; 금속-킬레이트 크로마토그래피; 한외 여과법/정용여과법; 에탄올 침전법; 황산 암모늄 침전법; 크로마토포커싱(chromatofocusing); 치환 크로마토그래피; 전기 영동법(예를 들어, 예비 등전 포커싱; preparative isoelectric focusing), 감별 용해도법(예를 들어, 황산 암모늄 침전법), SDS-PAGE, 또는 추출.
- [0440] 본 발명의 단백질 예를 들어, 인공적 아미노산을 포함하는 단백질, 인공적 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 항체, 인공적 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 결합 파트너 등은, 당 업계에 공지되고 당 업자에 의해 이용되는 표준적 방법에 따라서, 부분적으로 또는 실질적으로 균일하게 정제될 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 당 업계에 널리 공지된 다수의 방법 예를 들어, 황산 암모늄 또는 에탄올 침전법, 산 또는 염기 추출법, 컬럼 크로마토그래피, 친화성 컬럼 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포 셀룰로즈 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 렉틴 크로

마토그래피, 젤 전기 영동법 등 임의의 방법에 의하여 회수 및 정제될 수 있다. 단백질 리폴딩 단계는 의도로 하는 바와 같이, 올바로 폴딩된 돌연변이 단백질을 제조하는데에 사용될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 친화성 크로마토그래피 또는 기타 적당한 방법이 (고순도인 것이 바람직한) 최종 정제 단계에 사용될 수 있다. 하나의 구체예에서, 인공적 아미노산에 대하여 생성된 항체(또는 인공적 아미노산을 포함하는 단백질)는 예를 들어, 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 단백질의 친화성계 정제용인 정제 시약으로서 사용된다. 일단 의도로 하는 바와 같이 부분적으로 또는 균일하게 정제되면, 폴리펩티드는 임의로는 다양한 용도 예를 들어, 검정법 성분, 치료제, 예방약, 진단약, 연구 시약 및/또는 항체 생산용 면역원으로 사용된다.

[0441] 본원에 언급된 다른 참고 문헌에 더하여, 다수의 정제/단백질 폴딩 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다[예를 들어, 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.; Bollag의 다수 (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; 및 Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ; 및 상기 문헌들에 인용되어 있는 참고 문헌 참조].

[0442] 진핵 숙주 세포 또는 비 진핵 숙주 세포 내에서 인공적 아미노산을 보유하는 목적 단백질 또는 폴리펩티드를 제조하는데 있어서 하나의 이점은 통상적으로 단백질 또는 폴리펩티드가 이것의 원래 형태로 폴딩될 것이라는 점이다. 그러나, 본 발명의 임의의 구체예에서, 당 업자는 합성, 발현 및/또는 정제 이후, 단백질은 관련 폴리펩티드의 의도로 하는 형태와 상이한 형태를 가질 수 있다는 사실을 인지할 것이다. 본 발명의 하나의 측면에서, 발현된 단백질은 임의로는 변성된 후 재변성된다. 이는 예를 들어, 목적 단백질 또는 폴리펩티드에 샤파로닌을 첨가하거나, 무질서 유발제(chaotropic agent) 예를 들어, 구아니딘 HCl 중에 단백질을 용해시키거나, 또는 단백질 이황화물 이성화제 등을 이용하는 등의, 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 이루어진다.

[0443] 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변성 및 환원시키고, 폴리펩티드를 바람직한 형태로 리폴딩시키는 것이 바람직할 때도 있다. 예를 들어, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE 및/또는 샤파로닌은 목적으로 하는 번역 생산물에 첨가될 수 있다. 단백질의 환원, 변성 및 재변성 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다[예를 들어, Debinski와 다수 (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; 및 Buchner의 다수, (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270]. 예를 들어, Debinski와 다수의 문헌에는 구아니딘-DTE 중에서, 포유체 단백질을 변성 및 환원시키는 것에 관하여 기술되어 있다. 단백질은 예를 들어, 산화된 글루타치온 및 L-아르기닌을 함유하는 산화 환원 완충액 중에서 리폴딩될 수 있다. 리폴딩 시약은 소통되거나, 또는 하나 이상의 폴리펩티드나 기타 발현 생산물과 접촉하도록 이동 될 수 있으며, 또는 그 역으로 될 수도 있다.

[0444] ABP의 원핵 생물 생산의 경우, 이를 통하여 생산된 ABP는 미스폴딩(misfolding)되므로 생물 활성이 상실되거나 또는 감소될 수 있다. 단백질의 생물 활성은 "리폴딩"에 의하여 회복될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 ABP는 예를 들어, 하나 이상의 무질서 유발제(예를 들어, 우레아 및/또는 구아니딘) 및 이황화 결합을 환원시킬 수 있는 환원제(예를 들어, 디티오프레이톨, DTT 또는 2-머캅토에탄올, 2-ME)를 사용하여 폴리펩티드 사슬을 (ABP가 불용성일 경우) 용해, 언폴딩 및 환원시킴으로써 리폴딩된다. 무질서 유발제가 적당한 농도로 존재할 때, 이후 이황화 결합을 재형성시킬 수 있는 산화제(예를 들어, 산소, 시스틴 또는 시스타미드)를 첨가한다. ABP는 당 업계에 공지된 표준적 방법[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는, 미국 특허 제 4,511,502 호, 동 제 4,511,503 호 및 동 제 4,512,922 호]을 이용하여 리폴딩될 수 있다. ABP는 또한 다른 단백질과 함께 폴딩되어 이종 이량체 또는 이종 다량체를 형성할 수 있다. 리폴딩 또는 공동 폴딩 이후, ABP는 바람직하게 추가로 정제된다.

[0445] 일반적 정제 방법: 다양한 분리 단계 중 임의의 하나는 임의의 분리 단계 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC"), 역상-HPLC("RP-HPLC"), 팽창 층 흡착법, 또는 이 방법들을 적당한 순서로 임의로 병행하고/하거나 반복 수행하는 분리 단계로부터 얻어진 ABP 또는 임의의 ABP 혼합물을 포함하는 세포 용해물에 대해서 수

행될 수 있다.

- [0446] 본원에 개시된 기술을 수행하는데 사용된 장치 및 기타 필요한 재료들은 시판되고 있다. 펌프, 분획 수집기, 모니터, 기록기 및 전체적인 시스템은 예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)(Foster City, CA), 바이오-래드 래보러토리즈 인코포레이션(Bio-Rad Laboratories, Inc.)(Hercules, CA), 및 애머샴 바이오사이언시스 인코포레이션(Amersham Biosciences, Inc.)(Piscataway, NJ)으로부터 시판되고 있다. 크로마토그래피 재료 예를 들어, 교환 매트릭스 재료, 배지 및 완충액도 상기 회사들로부터 시판되고 있다.
- [0447] 본원에 기술된 컬럼 크로마토그래피 과정 중 평형화 및 기타 단계 예를 들어, 세척 및 용리 단계는 전문화된 장치 예를 들어, 펌프를 사용하여 보다 신속하게 이루어질 수 있다. 시판중인 펌프로서는 예를 들어, 힐로드(HILOAD)(등록상표) 펌프 P-50, 연동 펌프 P-1, 펌프 P-901 및 펌프 P-903(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함한다.
- [0448] 분획 수집기의 예로서는, 레디프랙(RediFrac) 분획 수집기, FRAC-100 및 FRAC-200 분획 수집기, 및 수퍼프랙(SUPERFRAC)(등록상표) 분획 수집기(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함한다. 혼합기는 또한 pH 및 선형 농도 구배를 형성하는데 사용될 수도 있다. 시판중인 혼합기로서는 구배 혼합기(Gradient Mixer) GM-1 및 인라인 혼합기(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함한다.
- [0449] 크로마토그래피 과정은 임의의 시판되고 있는 모니터를 사용하여 모니터 될 수 있다. 이러한 모니터는 예를 들어, UV, pH 및 전도율과 같은 정보를 수집하기 위해 사용될 수 있다. 검출기의 예로서는 모니터 UV-1, UVICORD(등록상표) S II, 모니터 UV-M II, 모니터 UV-900, 모니터 UPC-900, 모니터 pH/C-900, 및 전도율 모니터(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함한다. 실제로, 예를 들어, 다수의 AKTA(등록상표) 시스템(Amersham Biosciences; Piscataway, NJ)과 같은 전체 시스템이 시판되고 있다.
- [0450] 본 발명의 하나의 구체예에서, 예를 들어, ABP는 우선, 우레아 중에서 결과로 생성된 정제 ABP를 변성시키고, 그 다음 환원제(예를 들어, DTT)를 함유하는 TRIS 완충액(적당한 pH)으로 희석시킴으로써 환원 및 변성될 수 있다. 다른 구체예에서, ABP는 우레아 중에서 약 2~약 9 M의 농도로 변성된 후, pH 약 5.0~약 8.0에서 TRIS 완충액중에 희석된다. 본 구체예의 리폴딩 혼합물은 이후 항온 처리될 수 있다. 하나의 구체예에서, 리폴딩 혼합물은 실온에서 4~24 시간 동안 항온 처리된다. 환원 및 변성된 ABP 혼합물은 이후 추가로 분리 또는 정제될 수 있다.
- [0451] 본원에 언급한 바와 같이, 제1 ABP 혼합물의 pH는 임의의 후속 분리 단계를 수행하기 이전에 조정할 수 있다. 뿐만 아니라, 제1 ABP 혼합물 또는 이것의 임의의 후속 혼합물은 당 업계에 공지된 기술을 사용하여 농축될 수 있다. 더욱이, 제1 ABP 혼합물 또는 이것의 임의의 후속 혼합물을 포함하는 용리 완충액은, 당 업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 다음 분리 단계에 적당한 완충액과 교환될 수 있다.
- [0452] 이온 교환 크로마토그래피: 하나의 구체예에서, 임의적이고, 부가적인 단계인 이온 교환 크로마토그래피 과정은 제1 ABP 혼합물에 대해서 수행될 수 있다. 일반적으로 문헌[ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ))]을 참조하시오. 시판되고 있는 이온 교환 컬럼으로서는 HITRAP(등록상표), HIPREP(등록상표), 및 HILOAD(등록상표) 컬럼 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함한다. 적당한 컬럼은 강력한 음이온 교환기 예를 들어, Q SEPHAROSE(등록상표) 급속 유동, Q SEPHAROSE(등록상표) 고성능, 및 Q SEPHAROSE(등록상표) XL; 강력한 양이온 교환기 예를 들어, SP SEPHAROSE(등록상표) 고성능, SP SEPHAROSE(등록상표) 급속 유동, 및 SP SEPHAROSE(등록상표) XL; 약한 음이온 교환기 예를 들어, DEAE SEPHAROSE(등록상표) 급속 유동; 및 약한 양이온 교환기 예를 들어, CM SEPHAROSE(등록상표) 급속 유동(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 이용한다. 음이온 또는 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피는 정제 과정 중 임의의 단계에서 ABP에 대해 수행되어 실질적으로 정제된 ABP를 분리할 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 임의의 적당한 양이온 교환 매트릭스를 이용하여 수행될 수 있다. 유용한 양이온 교환 매트릭스로서는 섬유상, 다공성, 비 다공성, 미소 과립형, 비드형 또는 가교형 양이온 교환 매트릭스 재료를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 양이온 교환 매트릭스 재료로서는 셀룰로즈, 아가로즈, 엑스트란, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐, 폴리스티렌, 실리카, 폴리에테르 또는 이들 중 임의의 것의 복합 재료를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0453] 양이온 교환 매트릭스는 강력하고 약한 양이온 교환기를 포함하는 임의의 적당한 양이온 교환기일 수 있다. 강력한 양이온 교환기는 광범위한 pH에서 이온화된 형태로 잔류할 수 있으므로, 광범위한 pH에서 ABP와 결합할 수 있다. 그러나, 약한 양이온 교환기는 pH가 변화함에 따라서 이온화 특성을 잃을 수 있다. 예를 들어, 약한 양이

온 교환기는 pH가 약 pH4 또는 pH5 이하로 떨어질 때 전하를 잃을 수 있다. 적당한 강력 양이온 교환기로서는 하전된 작용기 예를 들어, 설포프로필(SP), 설플산 메틸(S) 또는 설포에틸(SE)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 pH 약 2.5~약 6.0에서 ABP와 결합하는 강력한 양이온 교환기일 수 있다. 이와는 달리, 강력한 양이온 교환기는 pH 약 2.5~약 5.5에서 ABP와 결합할 수 있다. 양이온 교환 매트릭스는 pH 약 3.0에서 ABP와 결합하는 강력한 양이온 교환기일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 pH 약 6.0~약 8.0에서 ABP와 결합하는 강력한 양이온 교환기일 수 있다. 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 pH 약 8.0~약 12.5에서 ABP와 결합하는 강력한 양이온 교환기일 수 있다. 대안적으로, 강력한 양이온 교환기는 pH 약 8.0~약 12.0에서 ABP와 결합할 수 있다.

[0454] ABP를 로딩하기 이전에, 양이온 교환 매트릭스는 예를 들어, 수 컬럼 부피의 희석액, 약산 예를 들어, 4 컬럼 부피의 20 mM 아세트산(pH 3)을 이용하여 평형화될 수 있다. 평형화 이후, ABP가 침가될 수 있으며, 컬럼은 1회 ~수회 세척된 다음, 실질적으로 정제된 ABP를 용리시킬 수 있다(마찬가지로, 약산 용액 예를 들어, 약 아세트산 또는 인산 용액 사용). 예를 들어, 대략 2~4 컬럼 부피의 20 mM 아세트산(pH 3)은 컬럼을 세척하는데 사용될 수 있다. 추가로 세척될 수도 있다[예를 들어, 2~4 컬럼 부피의 0.05 M 아세트산나트륨(pH 5.5) 또는 0.1 M 염화나트륨과 혼합된 0.05 M 아세트산나트륨(pH 5.5)]. 대안적으로, 당 업계에 공지된 방법을 사용하여, 양이온 교환 매트릭스는 수 컬럼 부피의 희석액과 약 염기를 사용하여 평형화될 수 있다.

[0455] 대안적으로, 실질적으로 정제된 ABP는 양이온 교환기 매트릭스와 완충액(충분히 낮은 pH 또는 이온 세기 보유)을 접촉시킴으로써 용리되어 매트릭스로부터 ABP를 치환시킬 수 있다. 용리 완충액의 pH 범위는 pH 약 2.5~6.0일 수 있다. 더욱 구체적으로, 용리 완충액의 pH 범위는 pH 약 2.5~약 5.5, pH 약 2.5~약 5.0일 수 있다. 용리 완충액의 pH는 약 3.0일 수 있다. 뿐만 아니라, 용리 완충액의 양은 매우 다양할 수 있으며, 일반적으로는 약 2~약 10 컬럼 부피일 것이다. 더욱이, 당 업자에게 공지된 적당한 완충액 예를 들어, 시트르산염, 인산염, 포름산염, HEPES 및 MES 완충액(농도 범위 = 약 5~약 100 mM 이상)이 본원에 사용될 수 있다.

[0456] 양이온 교환기 매트릭스에 ABP 폴리펩티드를 흡착시킨 후, 실질적으로 정제된 ABP 폴리펩티드는 매트릭스와 완충액(충분히 높은 pH 또는 이온 세기 보유)을 접촉시킴으로써 용리되어 매트릭스로부터 ABP를 치환시킬 수 있다. 실질적으로 정제된 ABP의 고 pH 용리에 사용하기에 적당한 완충액으로서는, 시트르산염, 인산염, 포름산염, 아세트산염, HEPES, 및 MES 완충액(농도 범위 = 약 5~약 100 mM 이상)을 포함할 수 있다.

[0457] 역상 크로마토그래피: RP-HPLC는 당 업자에게 공지된 적당한 과정을 거쳐 단백질을 정제하도록 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Pearson 외 다수, ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier 외 다수, J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani 외 다수, J. CHROM. (1986) 359:391-402]을 참조하시오. RP-HPLC는 ABP상에서 수행되어 실질적으로 정제된 ABP를 분리할 수 있다. 이러한 관점에서, 알킬 작용기를 보유하며 다양한 길이의 실리카 유도체화 수지 예를 들어, 약 C₃~약 C₃₀ 이상, 약 C₃~약 C₂₀ 이상, 또는 약 C₃~약 C₁₈ 이상의 수지가 사용될 수 있다. 대안적으로, 중합체 수지가 사용될 수도 있다. 예를 들어, 토소하스 앰버크롬(TosoHass Amberchrome) CG1000sd 수지가 사용될 수 있는데, 이 수지는 스티렌 중합체 수지이다. 다양한 알킬 사슬 길이를 갖는 시아노 또는 중합체 수지가 사용될 수도 있다. 더욱이, RP-HPLC 컬럼은 용매 예를 들어, 에탄올로 세척될 수 있다. 공급 RP 컬럼은 RP-HPLC 컬럼의 또 다른 예이다.

[0458] 이온 쌍 형성 제제 및 유기 변형제 예를 들어, 메탄올, 이소프로판올, 테트라하이드로푸란, 아세토니트릴 또는 에탄올을 함유하는 적당한 용리 완충액은 RP-HPLC 컬럼으로부터 ABP를 용리시키는데에 사용될 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 이온 쌍 형성 제제로서는 아세트산, 포름산, 과염소산, 인산, 트리플루오로아세트산, 헵타플루오로부티르산, 트리에틸아민, 테트라메틸암모늄, 테트라부틸암모늄 및 아세트산트리에틸암모늄을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 용리는 하나 이상의 구배 형성제를 사용하거나 또는 평형화 조건하에서, 그리고 바람직하게는 분리 시간을 단축시키고 피크 폭을 좁힌 구배 조건하에서 수행될 수 있다. 다른 방법은 용매 농도 범위가 상이한 2개의 구배를 적용하는 것을 포함한다. 본원에 사용하기에 적당한 용리 완충액의 예로서는, 아세트산 암모늄 및 아세토니트릴 용액을 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0459] 소수성 상호 작용 크로마토그래피 정제 기술: 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC)는 ABP에 대해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ))]을 참조하시오. 적당한 HIC 매트릭스로서는 알킬- 또는 아릴-치환 매트릭스 예를 들어, 부틸-, 헥실-, 옥틸- 또는 페닐-치환 매트릭스 예를 들어, 아가로즈, 가교 아가로즈, 세파로즈, 셀룰로즈, 실리카, 텍스트란, 폴리스티렌, 폴리(메타크릴레이트) 매트릭스 및 혼합형 매트릭스 예를 들어, 폴리에틸렌아민 수지 또는 부틸- 또는 페닐-치환 폴리(메타크릴

레이트) 매트릭스를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 대한 상업적 공급원으로서는 HITRAP(등록상표), HIPREP(등록상표), 및 HILOAD(등록상표) 컬럼(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0460] 요약하면, 로딩 이전에, HIC 컬럼은 당 업자에게 공지된 표준적인 완충액 예를 들어, 아세트산/염화나트륨 용액 또는 황산암모늄 함유 HEPES를 사용하여 평형화될 수 있다. 황산암모늄은 HIC 컬럼 로딩용 완충액으로서 사용될 수 있다. ABP를 로딩한 이후, 컬럼은 표준 완충액 및 조건을 이용하여 세척되어, 그 결과 원치 않는 물질을 제거하되, HIC 컬럼상에 ABP는 잔류시킬 수 있다. ABP는 약 3~약 10 컬럼 부피의 표준 완충액 예를 들어, EDTA 및 평형화 완충액보다 낮은 농도의 황산암모늄, 또는 아세트산/염화암모늄 완충액 함유 HEPES 완충액으로 용리될 수 있다. 예를 들어, 인산칼륨 구배와 같이, 선형으로 감소하는 염 구배 또한 ABP 분자를 용리하는데 사용될 수 있다. 이후 용리액은 예를 들어, 여과법 예를 들어, 정용 여과법 또는 한외 여과법으로 농축될 수 있다. 정용 여과법은 ABP를 용리시키는데 사용된 염을 제거하는데 이용될 수 있다.

[0461] 기타 정제 기술: 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는, 겔 여과법[GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)], 히드록시아파타이트 크로마토그래피 [적당한 매트릭스 예를 들어, HA-Ultrogel, 고 해상도(Calbiochem), CHT 세라믹 히드록시아파타이트(BioRad), 바이오-겔 HTP 히드록시아파타이트(BioRad) 사용], HPLC, 팽창 층 흡착법, 한외 여과법, 정용 여과법, 동결 건조법 등을 사용하는 또 다른 분리 단계는 첫번째 ABP 혼합물 또는 이의 임의의 후속 혼합물에 대해 수행되어, 임의의 과량의 염을 제거하고, 완충액을 다음 분리 단계 또는 최종 생산 약물의 제조에 적당한 완충액으로 치환 할 수 있다.

[0462] ABP에 존재하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 또한 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하지 않는 기타 세포성 단백질의 분리에 이용될 수 있다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 독특한 화학 작용기를 포함할 수 있으므로, 독특한 작용기를 다른 분자에 커플링시켜 실질적인 정제 단계를 제공할 수 있다. 예를 들어, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다른 단백질로부터 분리를 촉진시키는 다른 분자에 커플링될 수 있다. 이와 같이 비 천연 아미노산으로의 커플링을 위한 분자로서는 PEG 및 기타 중합체, 비드, 및 기타 고체 물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0463] 실질적으로 정제된 ABP를 포함하는 ABP의 수율은 당 업자에게 공지된 기술을 사용하여 본원에 개시된 각 단계에서 모니터링 될 수 있다. 이러한 기술은 또한 마지막 분리 단계 이후의 실질적으로 정제된 ABP의 수율을 측정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, ABP의 수율은 임의의 몇몇 역상 고압 액체 크로마토그래피 컬럼(다양한 알킬 사슬 길이를 갖는 컬럼 예를 들어, 시아노 RP-HPLC, C₁₈RP-HPLC; 및 양이온 교환 HPLC 및 겔 여과 HPLC)을 이용하여 모니터링 될 수 있다.

[0464] 본 발명의 특정 구체예에서, 각 정제 단계 이후의 ABP 수율은 각 정제 단계의 출발 물질 중 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.9% 이상, 또는 약 99.99% 이상의 ABP 일 수 있다.

[0465] 순도는 표준 기술 예를 들어, SDS-PAGE를 사용하여 측정될 수 있거나, 또는 웨스턴 블로트 및 ELISA 검정법을 사용하여 ABP를 측정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 폴리클로날 항체는 음 조절 효모 발효액 및 양이온 교환 회수물로부터 분리된 단백질에 대하여 생성될 수 있다. 항체는 또한 오염 숙주 세포 단백질의 존재 여부에 대하여 탐침하는데 사용될 수도 있다.

[0466] RP-HPLC 재료 Vydac C4(Vydac)는 (표면에 C4-알킬 사슬을 보유하는) 실리카 겔 입자로 구성된다. 단백질 불순물로부터 ABP를 분리하는 방법은 소수성 상호 작용 세기의 차를 바탕으로 한다. 용리는 희석된 트리플루오로아세트산 중 아세토니트릴 구배를 걸어 주면서 수행된다. 예비 HPLC는 스테인레스 스틸 컬럼(2.8~3.2 l의 Vydac C4 실리카겔로 충전)을 이용하여 수행된다. 히드록시아파타이트 Ultrogel 용리액은 트리플루오로아세트산을 첨가하여 산성화되며, Vydac C4 컬럼상에 로딩된다. 희석된 트리플루오로아세트산 중 아세토니트릴 구배를 걸어 주는 세척 및 용리 방법이 이용된다. 분획은 수집된 직후, 인산염 완충액으로 중화된다. IPC 한도에 존재하는 ABP 분획을 폴링한다.

[0467] DEAE 세파로즈(Pharmacia) 재료는 세파로즈 비드 표면에 공유 결합되어 있는 디에틸아미노에틸(DEAE)기로 이루어져 있다. ABP의 DEAE기로의 결합은 이온 상호 작용에 의해 매개된다. 아세토니트릴 및 트리플루오로아세트산

은 체류하지 않고 컬럼을 통과한다. 이러한 물질이 세척되고 나면, 이 컬럼을 낮은 pH의 아세테이트 완충액으로 세척함으로써 미량의 불순물을 제거한다. 이후, 이 컬럼을 중성 인산염 완충액으로 세척하고, ABP를 이온 세기가 큰 완충액으로 용리시킨다. 이 컬럼을 DEAE 세파로즈 급속 유동층으로 팩킹한다. 컬럼 부피를 조정하여 ABP 로드가 3~10 mg ABP 폴리펩티드/ml 젤이 되도록 만든다. 컬럼을 물과 평형화 완충액(인산나트륨/인산칼륨)으로 세척한다. 풀링된 HPLC 용리 분획을 로딩하고 컬럼을 평형 완충액으로 세척한다. 이후 컬럼을 세척 완충액(아세트산나트륨 완충액)으로 세척한 다음, 평형화 완충액으로 세척한다. 결과적으로 ABP는 용리 완충액(염화나트륨, 인산나트륨/인산칼륨)과 함께 컬럼으로부터 용리되어, 주요 용리 프로필에 따라서 단일 분획으로 수집한다. DEAE 세파로즈 컬럼의 용리액은 특정 전도율로 조정된다. 결과로 생성된 약물은 테프론 병으로 멸균 여과되며 이것은 -70°C에 보관한다.

[0468] 사용될 수 있는 부가의 방법으로서는 내독소를 제거하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 내독소는 그램-음성 숙주 세포 예를 들어, 에스케리챠 콜라이의 외부 막에 존재하는 리포 다팡류(LPS)이다. 내부 독소 수치를 감소시키는 방법은 당 업자에게 공지되어 있으며, 실리카 지지체, 유리 분말 또는 히드록시아파타이트를 사용하는 정제 기술, 역상, 친화성, 크기-배제, 음이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 또는 이를 방법의 병행법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 변형 또는 부가적 방법은 목적 폴리펩티드로부터 오염 물질 예를 들어, 동시 이동(co-migrating) 단백질을 제거하는데에 필요할 수 있다.

[0469] 다양한 방법 및 절차 예를 들어, 브래드포드 검정법, SDS-PSGE, 은 염색 SDS-PAGE, 쿠마쉬 염색 SDS-PAGE, 질량 분광법(예를 들어, MALDI-TOF) 및 기타 당 업자에게 공지된 단백질의 특성 규명 방법이, 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP 단백질의 수율 및 순도를 측정하는데 사용될 수 있다.

VIII. 대안적 시스템에서의 발현

[0471] 비 재조합 숙주 세포, 돌연변이된 숙주 세포 또는 무 세포 시스템 내에서 비 천연 아미노산을 단백질에 도입시키는데에 몇몇 기법이 사용되고 있다. 이러한 시스템은 또한 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드를 제조하는데에도 사용하기에 적당하다. 반응성 측쇄를 보유하는 아미노산 예를 들어, Lys, Cys 및 Tyr를 유도체화시키면, 리신이 N²-아세틸-리신으로 전환된다. 화학 합성법은 또한 비 천연 아미노산을 삽입시키는 직접적인 방법을 제공한다. 최근, 펩티드 단편의 효소적 결찰법 및 천연 화학적 결찰법의 개발로 인하여 보다 큰 단백질을 제조할 수 있게 되었다. 예를 들어, 문헌[P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000)]을 참조하시오. 목적으로 하는 비 천연 아미노산에 의해 화학적으로 아실화된 억제 tRNA가 단백질 생합성을 지지할 수 있는 시험관 내 추출물에 첨가되는 일반적인 시험관내 생합성법은, 100개 이상의 비 천연 아미노산을 실제로 임의의 크기를 갖는 다양한 단백질에 위치 특이적으로 삽입시키는데 사용된다. 예를 들어, 문헌[V. W. Cornish, D. Mendel and P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, *Science* 244:182-188 (1989); 및 J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, *Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989)]을 참조하시오. 광범위한 작용기가 단백질 안정성, 단백질 풀딩, 효소 기작 및 시그널 전달 연구용인 단백질에 도입된다.

[0472] 야생형 합성효소 혼합물의 연구를 위해 생체 내 방법(선택 압 삽입법이라 칭함)이 개발되었다. 예를 들어, 문헌 [N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999)]을 참조하시오. 영양 요구성 변종 즉, 세포에 특정 천연 아미노산을 공급하는 상관 대사 경로가 스위치 오프(switch off)된 변종은 제한된 농도의 천연 아미노산을 함유하는 최소 배지에서 성장하지만, 표적 유전자의 전사는 억제된다. 정상 성장 단계의 개시시, 천연 아미노산은 고갈되어 비 천연 아미노산 유사체로 대체된다. 재조합 단백질의 발현을 유도하면, 인공적 아미노산 유사체를 함유하는 단백질이 축적된다. 예를 들어, 이러한 방안을 이용하면, o, m 및 p-플루오로페닐알라닌은 단백질에 삽입되어 UV 스펙트럼 내에 용이하게 확인될 수 있는 특징적인 2개의 상부(shoulder)를 나타내며[예를 들어, C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000)]; 트리플루오로메티오닌은 박테리오판지 T4 리소좀 내에서 메티오닌을 치환하여, ¹⁹F NMR로써 이것과 키토올리고당 리간드의 상호 작용을 해 연구하는데 사용되고[예를 들어, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997) 참조]; 트리플루오로루신은 루신 대신 삽입되어, 루신-지퍼 단백질의 열안정성 및 화학 안정성을 증가시킨다. 예를 들어, 문헌[Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001)]을 참조하시오. 뿐만 아니라, 셀레노메티오닌 및 텔루로메티오닌은 다양한 재조합 단백질에 삽

입되어 X-선 결정법에서 상의 분석을 촉진시킨다. 예를 들어, 문헌[W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); 및 N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997)]을 참조하시오. 알켄 또는 알킨 작용기를 보유하는 메티오닌 유사체는 또한 효과적으로 삽입되어, 화학수단에 의해 단백질을 부가적으로 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[J. C. M. vanHest and D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428:68 (1998); J. C. M. van Hest, K. L. Kiick and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:1282 (2000); 및 K. L. Kiick and D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); 미국 특허 제 6,586,207 호; 미국 특허 공보 2002/0042097]을 참조하시오.

[0473] 본 방법의 성공 여부는, 일반적으로 단백질 번역의 신뢰성을 보증하도록 고 선택성이 필요한 아미노아실-tRNA 합성효소에 의한 인공적 아미노산 유사체의 인지 여부에 달려있다. 본 방법의 범위를 확대하는 하나의 방법은 아미노아실-tRNA 합성효소의 기질 특이성의 폭을 넓히는 것이다[제한된 경우에만 이루어질 수 있음]. 예를 들어, 에스케리챠 콜라이 내에서 Gly에 의해 Ala^{294} 가 치환되면, 페닐알라닐-tRNA 합성효소(PheRS)는 기질 결합 포켓의 크기를 증가시키고, 그 결과 p-Cl-페닐알라닌(p-Cl-Phe)에 의하여 tRNAPhe이 아실화된다. 문헌[M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994)]을 참조하시오. 이러한 돌연변이 PheRS를 함유하는 에스케리챠 콜라이 변종은 페닐알라닌 대신에 p-Cl-페닐알라닌 또는 p-Br-페닐알라닌을 삽입시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌[M. Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); 및 N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000)]을 참조하시오. 이와 유사하게, 에스케리챠 콜라이 티로신-tRNA 합성효소의 아미노산 결합 위치에 인접하여 존재하는 점 돌연변이 Phe130Ser은 티로신보다 아자티로신을 보다 효율적으로 삽입시킬 수 있는 것으로 파악되었다. 문헌[F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil and S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275:40324(2000)]을 참조하시오.

[0474] 생체 내에서 인공적 아미노산을 단백질에 삽입시키는 다른 방안은 교정 기작을 나타내는 합성효소를 변형시키는 것이다. 이러한 합성효소는 구별될 수 없기 때문에, 구조적으로 같은 기원의 천연 아미노산과 유사한 아미노산을 활성화한다. 이러한 오류는 독립된 위치에서 수정되는데, 그 결과, tRNA의 잘못 부하된 아미노산을 탈 아실화하여 단백질 번역의 신뢰성을 유지시킨다. 만일 합성효소의 교정 작용이 불가능하게 되면, 잘못 활성화된 구조 유사체는 편집 작용을 탈피하여 삽입되게 된다. 최근 이러한 접근 방법은 발릴-tRNA 합성효소(ValRS)로써 입증되었다. 문헌[V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001)]을 참조하시오. ValRS는 Cys, Thr 또는 아미노부티레이트(Abu)로 tRNAVal을 잘못 아미노아실화시킬 수 있으며; 이후, 비 동족 아미노산은 편집 영역에 의해 가수 분해된다. 에스케리챠 콜라이 염색체의 랜덤한 돌연변이 유발법 수행 이후에, ValRS의 편집 위치 내에 돌연변이가 일어난 돌연변이 에스케리챠 콜라이 변종을 선택한다. 이러한 편집-결함 ValRS는 tRNAVal에 Cys을 잘못 부하한다. Abu는 (Cys의 -SH기가 Abu의 -CH₃로 치환된) Cys와 입체적으로 닮았기 때문에, 돌연변이 에스테리챠 콜라이 변종이 Abu의 존재 하에 성장하는 때 돌연변이 ValRS는 또한 Abu를 단백질에 삽입시킨다. 질량 분광 분석법을 통하여, 천연 단백질 내에 존재하는 각 발린 위치에서 약 24%의 발린이 Abu로 치환됨을 알 수 있다.

[0475] 고상 합성법 및 반합성법은 또한 신규의 아미노산을 함유하는 다수의 단백질을 합성시킬 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 문헌에 인용된 참고 문헌과 공보를 참조하시오: Crick, F.J.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.*, 47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. *Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin*, *J. Am. Chem. Soc.*, 3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. *Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease*, *Science*, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. *Semisynthetic peptides and proteins*, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. *Protein engineering by chemical means?* *Protein Eng.*, 1(3):151-157 (1987); 및 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).

- [0476] 다양한 인공적 측 쇄 예를 들어, 보조 인자, 스픈 표지 및 올리고뉴클레오티드를 시험관 내에서 단백질에 도입하는데에는 화학 변형법이 사용되고 있다. 예를 들어, 문헌[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.B., M.L. *A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin*. *J Am Chem Soc*, 3153-3154 (1966); 및 Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P. G. *Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites*, *Science*, 242(4881):1038-1040 (1988)]을 참조하시오.
- [0477] 대안적으로, 화학적으로 변형된 아미노아실-tRNA를 사용하는 생합성 방법은 몇몇 생물 물리학적 프로브를 시험관 내 합성된 단백질에 삽입시키는데에 사용된다. 다음과 같은 문헌 및 여기에 인용된 참고 문헌을 참조하시오: Brunner, J. *New Photolabeling and crosslinking methods*, *Annu. Rev. Biochem*, 62:483-514 (1993); 및 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).
- [0478] 앞서, 인공적 아미노산은 화학적으로 아미노 아실화된 억제 tRNA를 목적 앰버 넌센스 돌연변이를 포함하는 유전자에 의하여 프로그래밍된 단백질 합성 반응에 가함으로써, 시험관 내에서 위치-특이적으로 단백질에 삽입될 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 연구법을 이용하여, 다수의 공통 20개 아미노산을 인접한 구조 상동체 예를 들어, 페닐알라닌 대신인 플루오로페닐알라닌과 치환시킬 수 있다[특정 아미노산에 대한 영양 요구성 변종 사용]. 예를 들어, 문헌[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 외 다수, *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa 외 다수, FASEB J. 13:41-51 (1999); EUman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins*, *Methods in Enz.*, 301-336 (1992); 및 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)]을 참조하시오.
- [0479] 예를 들어, 억제 tRNA는 종결 코돈인 UAG를 인지하고 인공적 아미노산에 의해 화학적으로 아미노아실화되도록 제조된다. 종래의 위치-배향 돌연변이 유발법은 단백질 유전자 내 목적 위치에 종결 코돈인 TAG를 도입시키는데 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. *5',3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis*, *Nucleic Acids Res*, 16(3):791- 802 (1988)]을 참조하시오. 아실화된 억제 tRNA 및 돌연변이 유전자가 시험관 내 전사/번역 시스템에 삽입될 때, 인공적 아미노산은 UAG 코돈에 대응하여 삽입되어, 그 결과 특정 위치에 아미노산을 함유하는 단백질을 만든다. [³H]-Phe 을 사용하는 실험 및 α-히드록시산을 사용하는 실험은, 오로지 바람직한 아미노산만이 UAG 코돈에 의해 지정된 위치에 삽입되고, 이 아미노산은 단백질 내 임의의 위치에 삽입되지 않음을 증명해 준다. 예를 들어, 문헌 [Noren 외 다수, supra; Kobayashi 외 다수, (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; 및 Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. *Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins*, *Science*, 255(5041):197-200 (1992)]을 참조하시오.
- [0480] 인공적 아미노산을 단백질에 삽입하는데에 미세 주입 기술이 사용되기도 한다. 예를 들어, 문헌[M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Science*, 268:439 (1995); 및, D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000)]을 참조하시오. 제노파스(Xenopus) 난모 세포에 시험관 내에서 제조된 2 종류의 RNA 즉, 표적 단백질을 코딩하는 mRNA(목적 아미노산 위치에 UAG 종결 코돈 보유), 그리고 목적 인공적 아미노산으로 아미노아실화된 앰버 억제 tRNA를 주입하였다. 이후 난모 세포의 번역 기작을 통하여 UAG에 의해 지정된 위치에 인공적 아미노산이 삽입된다. 이러한 방법은 (일반적으로 시험관 내 발현 시스템에 영향을 받지 않는) 필수 막 단백질에 관한 생체 내 구조-기능 연구에 이용될 수 있다. 그러한 방법의 예로서는, 형광 공명 에너지 전이에 의해 거리를 측정하는, 형광성 아미노산의 타키키닌 뉴로키닌-2 수용

체로의 삽입법[예를 들어, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271:19991 (1996)]; 이온 통로 내에 존재하는 표면-노출 잔기를 확인하기 위한 바이오티닐화 아미노산의 삽입법[예를 들어, J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997)]; 실시간으로 이온 통로 내의 형태 변화를 모니터하기 위해 케이지 티로신 유사체를 사용하는 방법[예를 들어, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Neuron*, 20:619 (1998)]; 및 게이트화 기작을 탐침하기 위한 이온 통로 구조를 변경하기 위해서 알파 히드록시 아미노산을 사용하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Cell*, 96:89 (1999); 및, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001)]을 참조하시오.

[0481] 생체 내에서 인공적 아미노산을 단백질에 직접 삽입시키는 능력은 돌연변이 단백질의 고수율 수득, 기술적 용이성, 돌연변이 단백질의 세포 내 또는 생 유기체 내 연구 가능성 및 치료적 처치법에서의 돌연변이 단백질의 사용과 같은 이점을 제공한다. 다양한 크기, 산성도, 친핵성, 소수성 및 기타 특성을 보유하는 인공적 아미노산을 단백질에 도입하는 능력은, 단백질 기능을 탐침하고 새로운 특성을 갖는 신규의 단백질 또는 유기체를 생산하기 위하여 단백질 구조를 합리적으로, 그리고 체계적으로 조작하는 능력을 늘릴 수 있다. 그러나, 이러한 과정들은, 단백질 번역에서 신뢰도를 높이는데 필요한 tRNA-합성효소 상호 작용의 복합적 특성으로 인하여 어렵다.

[0482] 위치 특이적으로 파라-F-Phe를 삽입시키고자 하는 시도에서, 효모 앰버 억제 tRNAPheCUA/페닐알라닐-tRNA 합성 효소 쌍이 p-F-Phe 내성인 Phe 영양 요구성 에스케리챠 콜라이 변종에 사용된다. 예를 들어, 문헌[R. Furter, *Protein Sci.*, 7:419 (1998)]을 참조하시오.

[0483] 뿐만 아니라, 세포 유리(시험관 내) 번역 시스템을 이용하여 본 발명의 ABP 폴리펩티드를 발현시킬 수도 있다. 주형으로서 mRNA를 포함하거나(시험관 내 번역) 또는 주형으로서 DNA를 포함할 수 있는(시험관 내 전사 및 번역의 삽입) 시스템에서, 시험관 내 합성은 리보솜에 의해 유도된다. 세포 유리 단백질 발현 시스템을 개발하고자 하는 상당한 노력이 행하여져 왔다. 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Kim, D.-M. and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.-M. and J.R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.-M., and J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.-M., and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); 및 Patnaik, R. and J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); 미국 특허 제 6,337,191 호; 미국 특허 공보 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785]을 참조하시오. 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드의 발현에 적용될 수 있는 다른 연구 방법은 mRNA-펩티드 융합 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌[R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci.(USA)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel의 다수, *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003)]을 참조하시오. 이 연구에서, 퓨로마이신에 결합된 mRNA 주형은 리보솜 상에서 웨프티드로 번역된다. 하나 이상의 tRNA 분자가 변형되면, 비 천연 아미노산은 또한 웨프티드에도 삽입된다. 마지막 mRNA 코돈이 해독된 후, 퓨로마이신은 웨프티드의 C-말단을 포획한다. 결과로 생성된 mRNA-펩티드 컨쥬게이트가 시험관 내 검정법에서 흥미로운 특성을 보유하는 것으로 관찰되면, 이의 정체는 mRNA 서열로부터 용이하게 파악될 수 있다. 이러한 방식으로, 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 목적으로 하는 특성을 갖는 폴리펩티드를 동정할 수 있다. 보다 최근에, 정제된 성분을 이용하는 시험관 내 리보솜 번역은 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된 웨프티드를 합성시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 예를 들어, 문헌[A. Forster의 다수, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 100:6353 (2003)]을 참조하시오.

IX. ABP에 커플링된 거대 분자 중합체

[0484] 본원에 기술된 비 천연 아미노산 폴리펩티드는 본원에 기술된 조성물, 방법, 기술 및 방안을 이용하여 다양하게 변형될 수 있다. 이러한 변형법은 폴리펩티드의 비 천연 아미노산 성분상에 추가의 작용기 예를 들어, 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광 가교제; 방사성 핵종; 세포 독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 퀄레이트화제; 보조 인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 수용성 덴드리머; 시클로덱스트린; 억제 리보핵산; 생체 적합 물질; 나노 입자; 스피드 표지; 형광 표지 염료; 금속 함유 부위; 방사성 부위; 신규 작용기; 기타 분자들과 공유적으로 또는 비공유적으로 상호 작용을 하는 기; 포토케이지 부위; 광이성화 부위; 바이오틴; 바이오틴 유도체; 바이오틴 유사체; 중원자 삽입 부위; 화학적으로 절단 가능한 기; 광 절단기; 연장된 측쇄; 탄소 결합 당; 산화 환원 활성제; 아미노 티오산;

독성 부위; 동위 원소 표지화된 부위; 생물 물리학적 프로브; 인광기; 화학 발광기; 전자 치밀기; 자성 기; 삽입기; 발색단; 에너지 전이제; 생물 활성 제제; 검출가능한 표지; 소분자; 또는 이들의 임의의 조합체; 또는 임의의 기타 바람직한 화합물 또는 물질을 삽입하는 것을 포함한다. 본원에 기술된 조성물, 방법, 기술 및 방안의 비 제한적 예시로서, 다음의 설명은, 비 천연 아미노산 폴리펩티드에 거대 분자 중합체를 첨가하는 것에 초점을 맞출 것이며, 여기서 본원에 기술된 조성물, 방법, 기술 및 방안은 또한 다른 작용기 예를 들어, 상기 나열한 작용기를 첨가하는데 적용할 수 있다는 사실(필요에 따라서는 적당한 변형법으로써, 당 업자는 본원에 개시된 바에 의하여 실시 가능함)을 이해할 것이다.

[0486] 다양한 거대 분자 중합체 및 기타 분자들은 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드에 결합되어 ABP의 생물학적 특성을 조절하고/조절하거나, ABP 분자에 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이와 같은 거대 분자 중합체는 천연 코딩 아미노산, 비-천연적으로 코딩된 아미노산 또는 천연 또는 비 천연 아미노산의 임의의 작용 치환기, 또는 천연 또는 비 천연 아미노산에 가하여진 임의의 치환기 또는 작용기를 통하여 ABP에 결합될 수 있다. 상기 중합체의 분자량은 광범위할 수 있는데, 예를 들어, 약 100~약 100,000 Da 이상일 수 있다.

[0487] 본 발명은 중합체:단백질 컨쥬케이트의 실질적으로 균질한 제조물을 제공한다. 본원에 사용된 "실질적으로 균질한"이란 용어는 중합체:단백질 컨쥬케이트 분자가 전체 단백질의 절반보다 큰 것으로 판찰되는 경우를 의미한다. 이러한 중합체:단백질 컨쥬케이트는 생물 활성을 보유하며, 본원에 제공된 "실질적으로 균질한" PEG화 ABP 단백질 제조물은 균질한 제조물의 이점(예를 들어, 할당 대 할당(lot to lot) 약물 동력학의 예측 가능성을 임상에 용이하게 적용할 수 있는 특성)을 나타내기에 충분히 균질한 제조물이다.

[0488] 중합체:단백질 컨쥬케이트 분자의 혼합물을 제조하도록 선택할 수 있으며, 본원에 제공된 이점은 이 혼합물에 포함된 모노 중합체:단백질 컨쥬케이트의 비율을 선택할 수 있다는 점이다. 그러므로, 바람직할 경우, 다양한 수의 중합체 부위가 결합된(즉, 디-, 트리-, 테트라- 등) 다양한 단백질의 혼합물을 제조할 수 있고, 본 발명의 방법을 사용하여 제조된 상기 컨쥬케이트와 모노 중합체:단백질 컨쥬케이트를 조합할 수 있으며, 예정된 비율의 모노 중합체:단백질 컨쥬케이트와의 혼합물을 얻을 수 있다.

[0489] 선택된 중합체는 수용성이므로, 그것이 결합되어 있는 단백질은 수성 환경 예를 들어, 생리적 환경에서는 침전되지 않는다. 상기 중합체는 분지형 또는 직쇄형일 수 있다. 바람직하게, 최종 생산 제제를 치료용으로 사용하는데 있어서, 중합체는 약학적으로 허용 가능할 것이다.

[0490] 폴리에틸렌 글리콜 분자 대 단백질 분자의 비율은 반응 혼합물에서의 농도와 같이 다양할 것이다. 일반적으로, 최적 비율(최소 과량의 미반응 단백질 또는 중합체가 존재하는 반응 효율 면에서의 최적 비율)은 선택된 폴리에틸렌 글리콜의 분자량 및 사용 가능한 반응기의 수에 의해 결정될 수 있다. 분자량과 관련하여, 통상적으로 중합체의 분자량이 클수록, 보다 적은 수의 중합체 분자가 단백질에 결합될 수 있다. 이와 유사하게, 이러한 매개 변수들을 최적화할 때 중합체의 분지화를 고려할 수 있다. 일반적으로, 분자량이 클수록(또는 분지가 보다 많을 수록) 중합체:단백질의 비율은 보다 높아진다.

[0491] 본원에 사용된 바와 같이, PEG:AP 컨쥬케이트를 고려할 때, "치료적 유효량"이란, 환자에게 목적으로 하는 이점을 제공하는 양을 의미한다. 상기 양은 개체마다 다를 것이며, 다수의 인자 예를 들어, 환자의 전체적인 신체 조건 및 치료될 병태의 내재된 원인에 따라서 달라질 것이다. 치료에 사용되는 ABP 폴리펩티드의 양은 적당한 변화율을 제공하고 목적 반응을 유리한 수준으로 유지시킨다. 본 발명의 조성물의 치료적 유효량은 공중이 이용 가능한 물질과 방법을 이용하여 당 업자에 의해 용이하게 확정될 수 있다.

[0492] 수용성 중합체는 임의의 구조적 형태 예를 들어, 선형, 포크형 또는 분지형을 떨 수 있다. 통상적으로, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜) 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)이지만, 기타 수용성 중합체도 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG는 본 발명의 임의의 구체예를 설명하는데 사용된다.

[0493] PEG는 널리 공지된 시판 수용성 중합체로서, 당 업계에 널리 공지된 방법에 따라서 에틸렌 글리콜을 개환 중합시켜 제조될 수 있다[Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161]. "PEG"라는 용어는, PEG 크기 또는 PEG 말단의 변형 여부와 상관없이, 광범위하게 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함하도록 사용되며, 다음과 같이 ABP에 결합되어 있는 형태로 나타낼 수 있다:

[0494] $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$

[0495] [상기 식중, n은 2~10,000이고, X는 H 또는 말단 변형 기 예를 들어, C_{1~4} 알킬임]

[0496] 몇몇 경우에 있어서, 본 발명에 사용되는 PEG의 한쪽 말단은 히드록시 또는 메톡시로서 종결된다[즉, X는 H 또

는 CH_3 ("메톡시 PEG")]. 대안적으로, 상기 PEG는 반응기로 종결되어 이중 작용성 중합체를 형성할 수 있다. 통상적인 반응기로서는, 20개의 공통 아미노산에서 발견되는 작용기, 및 20개의 공통 아미노산에 비활성이되 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 상보성 작용기(예를 들어, 아지드기, 알킨기)와 특이적으로 반응하는 작용기와 반응하는데에 일반적으로 사용되는 반응기[예를 들어, 말레이미드기, 활성화된 카보네이트(예를 들어, p-니트로페닐 에스테르), 활성화된 에스테르(예를 들어, N-히드록시숙신이미드, p-니트로페닐 에스테르) 및 알데하이드]를 포함할 수 있다. 상기 화학식에서 Y로 나타낸 PEG의 다른 말단은 천연 발생 또는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 통하여 항원-결합 폴리펩티드에 직접적 또는 간접적으로 결합할 것이다. 예를 들어, Y는 폴리펩티드의 아민기(예를 들어, 리신의 앱실론 아민 또는 N-말단)에 대한 아미드, 카바메이트 또는 우레아 결합일 수 있다. 대안적으로, Y는 티올기(예를 들어, 시스테인의 티올기)에 대한 말레이미드 결합일 수 있다. 대안적으로 Y는 20개의 공통 아미노산을 통하여는 일반적으로 접근 불가능한 잔기에 대한 결합일 수 있다. 예를 들어, PEG상의 아지드기는 ABP 상에 있는 알킨기와 반응하여 휘스텐 [3 + 2] 고리 첨가 생산물을 생성할 수 있다. 대안적으로, PEG 상에 있는 알킨기는 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 아지드기와 반응하여 유사한 생산물을 생성할 수 있다. 몇몇 구체예에 있어서, 강력한 친핵체(예를 들어, 히드라진, 히드라지드, 히드록실아민, 세미카바지드)는 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 알데하이드 또는 케톤 기와 반응하여(몇몇 경우, 적당한 환원제로 처리함으로써 추가로 환원될 수 있는) 히드라존, 옥심 또는 세미카바존을 형성할 수 있다. 대안적으로, 강력한 친핵체는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 통하여 ABP에 삽입되어, 수용성 중합체 내에 존재하는 케톤 또는 알데하이드 기와 선호적으로 반응하는데 사용될 수 있다.

[0497] PEG에 대한 임의의 분자 질량은 실제로 약 100~100,000 Da 이상(바람직하게는 0.1~50 kDa 또는 10~40 kDa)인 것이 바람직할 수 있다. 분지형 사슬인 PEG 예를 들어, 각 사슬의 분자량이 1~100 kDa(예를 들어, 1~50 kDa 또는 5~20 kDa)인 PEG 분자도 사용될 수 있다. 광범위한 PEG 분자에 관하여는 예를 들어, 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[Shearwater Polymers, Inc. 카타로그, Nektar Therapeutics 카타로그]에 개시되어 있다.

[0498] 일반적으로, PEG 분자의 하나 이상의 말단은 비-천연적으로 코딩된 아미노산과의 반응에 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 측 쇄와의 반응을 위한 알킨 및 아지드 부위를 보유하는 PEG 유도체는 PEG를 본원에 개시된 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합시키는데에 사용될 수 있다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 아지드를 포함하면, PEG는 통상적으로 [3 + 2] 고리 첨가 생산물을 형성하기 위한 알킨 부위 또는 아미드 결합을 형성하기 위한 포스핀기를 함유하는 활성화 PEG 화학종(즉, 에스테르, 카보네이트)를 함유할 것이다. 대안적으로, 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 알킨을 포함하면, PEG는 통상적으로 [3 + 2] 휘스텐 고리 첨가 반응 생산물을 형성하는 아지드 부위를 포함할 것이다. 만일 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 카보닐기를 포함하면, PEG는 상응하는 히드라존, 옥심 및 세미카바존 결합을 각각 형성하기 위해 통상적으로 유효한 친핵체(예를 들어, 히드라지드, 히드라진, 히드록실아민 또는 세미카바지드 작용기)를 포함할 것이다. 대안적으로, 전술한 반응기의 역 배향이 사용될 수 있는데, 즉, 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 아지드 부위는 알킨을 함유하는 PEG 유도체와 반응할 수 있다.

[0499] 몇몇 구체예에서, PEG 유도체를 보유하는 ABP 변이체는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 측 쇄에 존재하는 화학 작용기와 반응하는 화학 작용기를 포함한다.

[0500] 몇몇 구체예에서, 본 발명은 평균 분자량이 약 800~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격을 포함하는 아지드-및 아세틸렌-함유 유도 중합체를 제공한다. 수용성 중합체의 중합체 골격은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 다양한 수용성 중합체 예를 들어, 폴리(에틸렌)글리콜 및 기타 관련 중합체 예를 들어, 폴리(헥스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)이 본 발명의 실시에 사용하기에 적당하고, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)이라는 용어는 이와 같은 모든 분자를 포함하는 의미로 사용된다는 사실을 이해해야 한다. PEG이라는 용어[폴리(에틸렌 글리콜)]에 한정되는 것은 아님]에는, 임의의 형태의 PEG 예를 들어, 이중 작용성 PEG, 다중 분지형 PEG, 유도체화된 PEG, 포크형 PEG, 분지형 PEG, 현수형 PEG(즉, 중합체 골격에 현수된 하나 이상의 작용기를 보유하는 PEG 또는 관련 중합체) 또는 분해 가능한 결합을 보유하는 형태의 PEG를 포함한다.

[0501] PEG은 통상적으로 투명하고, 무색이며, 무취이고, 물에 가용성이며, 열에 안정하고, 다수의 화학 제제에 비활성으로서, 가수 분해 또는 악영향을 끼치지 않으며, 일반적으로 비독성이다. 폴리(에틸렌 글리콜)은 생체 적합성인 것으로 간주되는데, 즉, PEG는 살아있는 조직 또는 유기체에 해를 끼치지 않고 이것들과 공존할 수 있다. 더욱 구체적으로, PEG는 실질적으로 비 면역원성인데, 즉, PEG는 체 내에서 면역 반응을 일으키지 않는다. 체 내에서 소수의 바람직한 기능을 갖는 분자 예를 들어, 생물 활성 제제에 결합할 때, PEG는 이 제제를 차폐하고,

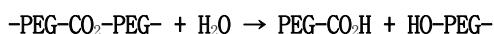
임의의 면역 반응을 감소 또는 경감시켜, 생물학적 활성 제제가 존재할 때 유기체가 견딜 수 있도록 만든다. PEG 컨쥬게이트는 실질적인 면역 반응을 나타내지 않거나 또는 응집 기타 바람직하지 않은 효과를 나타내지 않는 경향이 있다. 화학식 $--\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}--(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n--\text{CH}_2\text{CH}_2--$ [식 중, n은 약 3~약 4000, 통상적으로 약 20~약 2000임]인 PEG는 본 발명에 사용하기 적당하다. 본 발명의 몇몇 구체예에 있어서, 분자량 약 800~약 100,000 Da인 PEG는 중합체 골격으로서 특히 유용하다.

[0502] 중합체 골격은 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 중합체 골격은 일반적으로 당 업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 분지형 중합체는 중심 분지 코어부를 보유하며 이 중심 분지 코어에는 다수의 선형 중합체 사슬이 결합되어 있다. PEG는 일반적으로 다양한 폴리올 예를 들어, 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 펜타에리트리톨 및 소르비톨에 산화에틸렌을 부가함으로써 제조될 수 있는 분지형으로 사용된다. 중심 분지부는 또한 몇몇 아미노산 예를 들어, 리신으로부터 유래될 수 있다. 분지형 폴리(에틸렌 글리콜)은 일반적으로 $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ [식 중, R은 코어부 예를 들어, 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 또는 펜타에리트리톨로부터 유래된 것이고, m은 분지의 수를 나타냄]으로 나타낼 수 있다. 다중 분지형 PEG 문자 예를 들어, 본원에 그 자체로서 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 5,932,462호; 동 제 5,643,575 호; 동 제 5,229,490 호; 동 제 4,289,872 호; 미국 특허 출원 2003/0143596; WO 96/21469; 및 WO 93/21259에 개시되어 있는 문자는 또한 중합체 골격으로서 사용될 수도 있다.

[0503] 분지형 PEG는 또한 $\text{PEG}(-\text{YCH}_2)_n$ [식 중, Y는 결합기이고, Z는 일정한 길이의 원자 사슬에 의해 CH에 결합된 활성화 말단기임]로 나타내어 지는 포크형 PEG의 형태를 가질 수 있다.

[0504] 또 다른 분지형인, 현수 PEG는 (PEG 사슬의 말단부 보다는) PEG 골격을 따라서 반응기 예를 들어, 카복실기를 보유한다.

[0505] 이러한 형태의 PEG 이외에, 중합체는 또한 골격 내에 약한 결합 또는 분해성 결합을 보유하는 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, PEG는 중합체 골격 내에 가수 분해되는 에스테르 결합을 보유하도록 제조될 수 있다. 이하에 나타낸 바와 같이, 이러한 가수 분해 결과, 중합체는 저 분자량의 단편들로 절단된다:



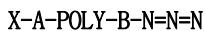
[0507] 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG라는 용어는 당 업계에 공지된 모든 형태의 것 예를 들어, 본원에 개시된 모든 형태의 것을 나타내거나 또는 포함한다는 사실은 당 업자가 이해할 수 있다.

[0508] 다수의 기타 중합체는 또한 본 발명에 사용하기 적당하다. 몇몇 구체예에서, 수용성이고 2개~약 300개의 말단부를 보유하는 중합체 골격이 본 발명에 특히 유용하다. 적당한 중합체의 예로서는 기타 폴리(알킬렌 글리콜) 예를 들어, 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 이의 공중합체(예를 들어, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체), 이의 삼중합체, 이의 혼합물 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 중합체 골격의 각 시슬의 분자량은 다양할 수 있으나, 통상적으로는 약 800~약 100,000 Da, 바람직하게는 약 6000~약 80,000 Da이다.

[0509] 당 업자는 상기 실질적으로 수용성인 골격에 대한 나열이 결코 한정적인 것이 아니고 오로지 예시적인 것이며, 전술한 성질을 갖는 모든 중합체 재료는 본 발명에 사용하기 적당한 것으로 간주된다는 사실을 알 수 있을 것이다.

[0510] 본 발명의 몇몇 구체예에 있어서, 유도 중합체는 "다중-작용성"으로서 즉, 중합체 골격은 2 이상의 말단부를 갖고, 가능하게는 약 300개의 말단부를 가질 수도 있으며, 작용기로 작용화 또는 활성화되어 있다. 다중 작용성 유도 중합체는 2개의 말단부를 보유하는 선형 중합체(각 말단부는 동일하거나 또는 상이할 수 있는 작용기에 결합되어 있음)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0511] 하나의 구체예에서, 유도 중합체는 다음의 구조를 갖는다



[0513] [식 중, N=N=N은 아지드 부위이고 ; B는 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 결합부이며; POLY는 수용성인 비 항원성 중합체이고; A는 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 결합 부위로서, B와 동일하거나 또는 상이할 수 있으며; X는 제2 작용기임]

[0514] A 및 B에 대한 결합부의 예로서는, 18개 이하, 및 더욱 바람직하게는 1~10개의 탄소 원자를 포함하는 다중 작용화된 알킬기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이종 원자 예를 들어, 질소, 산소 또는 황은 알킬 사슬

에 포함될 수 있다. 알킬 사슬은 또한 이종 원자에서 분지화될 수도 있다. A 및 B에 대한 결합부의 기타 예로서는, 10개 이하, 및 더욱 바람직하게는 5~6개의 탄소 원자를 포함하는 다중 기능화된 아릴기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적당한 결합기의 기타 예로서는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 미국 특허 제 5,932,462 호; 동 제 5,643,575 호; 및 미국 특허 출원 공보 2003/0143596에 개시되어 있는 결합기를 포함한다. 당 업자는 결합부에 관한 상기 나열은 결코 한정적인 것이 아니며, 오로지 예시적인 것으로서, 전술한 특성을 갖는 모든 결합부가 본 발명에 사용하기에 적당한 것으로 간주 된다는 사실을 인식할 것이다.

[0515]

X로서 사용하기에 적당한 작용기의 예로서는 히드록실, 보호 히드록실, 알콕실, 활성 에스테르 예를 들어, N-히드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 탄산염 예를 들어, 탄산 N-히드록시숙신이미딜 및 탄산 1-벤조트리아졸릴, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 설폰, 아민, 아미노옥시, 보호 아민, 히드라지드, 보호 히드라지드, 보호 티올, 카르복시산, 보호 카르복시산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설폰, 디티오피리딘, 비닐파리딘, 요도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메칠레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아지드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당 업자에게 이해되는 바와 같이, 선택된 X부는 아지드기와 융합하여 아지드기와의 반응은 일어나지 않아야 한다. 아지드-함유 유도 중합체는 상동 이종 작용성[제2 작용기(즉, X)가 아지드 부일 수 있음], 이종 이종 작용성[제2 작용기가 상이한 작용기일 수도 있음] 일 수도 있다.을 의미한다.

[0516]

"보호된"이란 용어는 임의의 반응 조건 하에서 화학적으로 반응성인 작용기의 반응을 막아주는 보호 기 또는 보호 부위가 존재하는 경우를 의미한다. 보호기는 보호될, 화학적으로 반응성인 기의 종류에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 화학적으로 반응성인 기가 아민 또는 히드라지드이면, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 만일 화학적으로 반응성인 기가 티올이면, 보호기는 오르토파리딜디설파이드일 수 있다. 화학적으로 반응성인 기가 카르복시산, 예를 들어, 부탄논산 또는 프로피온산이거나 히드록실기이면, 보호기는 벤질 또는 알킬 기 예를 들어, 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 당 업계에 공지된 기타 보호기도 또한 본 발명에 사용될 수도 있다.

[0517]

문현 중 말단 작용기의 구체예로서는 탄산 N-숙신이미딜(예를 들어, 미국 특허 제 5,281,698 호, 동 제 5,468,478 호), 아민(예를 들어, Buckmann 외 다수 Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplipsky 외 다수 Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), 히드라지드(예를 들어, Andresz 외 다수 Makromol. Chem. 179:301 (1978)), 프로파온산 숙신이미딜 및 부탄논산 숙신이미딜(예를 들어, Olson 외 다수 Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zaplipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; 또한 미국 특허 제 5,672,662 호), 숙신산 숙신이미딜(예를 들어, Abuchowski 외 다수 Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) 및 Joppich 외 다수 Macrolol. Chem. 180:1381 (1979), 숙신이미딜 에스테르(예를 들어, 미국 특허 제 4,670,417 호), 탄산 벤조트리아졸(예를 들어, 미국 특허 제 5,650,234 호), 글리시딜 에테르(예를 들어, Pitha 외 다수 Eur. J Biochem. 94:11 (1979), E11ing 외 다수, Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), 옥시카보닐 이미다졸(예를 들어, Beauchamp 외 다수, Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli 외 다수 J. Controlled Release 1:251 (1985)), 탄산 p-니트로페닐(예를 들어, Veronese 외 다수, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); 및 Sartore 외 다수, Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), 알데히드(예를 들어, Harris 외 다수 J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), 미국 특허 제 5,824,784 호, 미국 특허 제 5,252,714 호), 말레이미드(예를 들어, Goodson 외 다수 Bio/Technology 8:343 (1990), Romani 외 다수 in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), 및 Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), 이황화 오르토파리딜(예를 들어, Woghiren 외 다수 Bioconj. Chem. 4:314 (1993)), 아크릴올(예를 들어, Sawhney 외 다수, Macromolecules, 26:581 (1993)), 비닐설폰(예를 들어, 미국 특허 제 5,900,461 호)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 모든 참고 문현들 및 특허는 본원에 참고용으로서 인용되어 있다.

[0518]

본 발명의 임의의 구체예에서, 본 발명의 유도 중합체는 다음의 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다.

[0519]



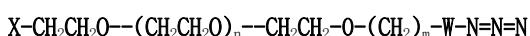
[0520]

[식 중, X는 전술한 바와 같은 작용기이고; n은 약 20~약 4000임]

[0521]

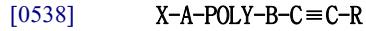
다른 구체예에서, 본 발명의 유도 중합체는 다음의 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다.

[0522]



- [0523] [식 중, W는 1~10개의 탄소 원자를 보유하는 지방족 또는 방향족 결합부이고; n은 약 20~약 4000이며; X는 전술한 바와 같은 작용기이고; m은 1~10임]
- [0524] 본 발명의 아지드-함유 PEG 유도체는 당 업계에 공지 및/또는 본원에 개시된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이하 기술한 하나의 방법에서, 수용성 중합체 골격의 평균 분자량은 약 800~약 100,000 Da이고, 제1 작용기에 결합된 제1 말단부 및 적당한 이탈기에 결합된 제2 말단부를 보유하는 중합체 골격은 (다수의 적당한 짹이온 예를 들어, 나트륨, 칼륨, tert-부틸암모늄 중 임의의 것과 쌍을 이를 수 있는) 아지드 음이온과 반응한다. 이탈기는 친핵성 치환 반응을 수행하고, 아지드부로 치환되어, 바람직한 아지드-함유 PEG 중합체를 생성한다.
- [0525] $X\text{-PEG-L} + \text{N}_3^- \rightarrow X\text{-PEG-N}_3^-$
- [0526] 상기와 같이, 본 발명에 사용하기에 적당한 중합체 골격을 X-PEG-L로 표시하였으며, 이때 PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이며, L은 적당한 이탈기이다. 적당한 작용기의 예로서는 히드록실, 보호 히드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호 아민, 보호 히드라지드, 보호 티올, 카르복시산, 보호 카르복시산, 말레이미드, 디티오피리딘 및 비닐피리딘, 그리고 케톤을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적당한 이탈기의 예로서는 염화물, 브롬화물, 요드화물, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0527] 본 발명의 아지드-함유 유도체의 다른 제조 방법에 있어서, 아지드 작용기를 보유하는 결합제는 평균 분자량 약 800~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격과 접촉하는데, 여기서 상기 결합제는 PEG 중합체 상에 있는 화학 작용기와 선택적으로 반응할 화학 작용기를 보유하며, 상기와 같이 접촉한 결과, (아지드가 결합기에 의하여 중합체 골격으로부터 분리되어 있는) 아지드-함유 유도 중합체 생성물을 형성한다.
- [0528] 대표적 반응식은 다음과 같이 나타낸다.
- [0529] $\text{X-PEG-M} + \text{N-링커-N=N=N} \rightarrow \text{PG-X-PEG-링커-N=N=N}$
- [0530] [식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고 X는 캡핑기 예를 들어, 알콕시 또는 전술한 바와 같은 작용기이며; M은 아지드 작용기와는 반응하지 않으나 N-작용기와 효율적이고 선택적으로 반응할 작용기임]
- [0531] 적당한 작용기의 예로서는, N이 아민인 경우 M이 카르복시산, 탄산염 또는 활성 에스테르인 기; N이 히드라지드 또는 아미노옥시 부위인 경우 M이 케톤인 기; 및 N이 친핵체인 경우 M이 이탈기인 기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0532] 미가공 생산물의 정제는 당 업계에 공지된 방법 예를 들어, 필요에 따라서, 생산물을 침전시킨 후 크로마토그래피하는 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0533] PEG 디아민의 더욱 구체적인 예를 이하에 나타내었는데, 여기서 아민 중 하나는 보호기 부위 예를 들어, tert-부틸-Boc에 의해 보호되고, 결과로 생성된 모노-보호 PEG 디아민은 아지드 작용기를 보유하는 결합부와 반응한다.
- [0534] $\text{BocHN-PEG-NH}_2 + \text{HO}_2\text{C-(CH}_2)_3\text{-N=N=N}$
- [0535] 상기 예에서, 아민기는 다양한 활성화 제제 예를 들어, 염화티오닐 또는 카보디이미드 시약 및 N-히드록시숙신 이미드 또는 N-히드록시벤조트리아졸을 이용하여 카르복시산 기와 커플링되어 모노아민 PEG 유도체와 아지드-보유 결합 부위 사이에 아미드 결합을 형성할 수 있다. 아미드 결합을 성공적으로 형성시킨 이후에, 생성된 N-tert-부틸-Boc-보호 아미드-함유 유도체는 생체 활성 분자를 직접 변형시키는데에 사용될 수 있거나, 또는 더욱 개질되어 기타 유용한 작용기를 부착시킬 수 있다. 예를 들어, N-t-Boc 기는 강산으로 처리하여 가수 분해될 수 있고, 그 결과 오메가-아미노-PEG-아지드가 생성된다, 결과로 생성된 아민은 합성 핸들(handle)로서 사용되어, 유용한 이종 이중 작용성 시약을 생성하기 위해 기타 유용한 작용기 예를 들어, 말레이미드기, 활성화된 이황화물, 활성화된 에스테르 등을 부착시킬 수 있다.
- [0536] 이종 이중 작용성 유도체는 그것이 중합체의 각 말단부에 상이한 분자를 결합시키는 것이 바람직할 경우에 특히 유용하다. 예를 들어, 오메가-N-아미노-N-아지도 PEG는 활성화 친 전자기 예를 들어, 알데히드, 케톤, 활성화 에스테르, 활성화 카보네이트 등을 보유하는 분자를 PEG의 한쪽 말단에 결합시키고, 아세틸렌기를 보유하는 분자는 PEG의 다른 쪽 말단에 결합시킬 수 있다.

[0537] 본 발명의 다른 구체예에서, 유도 중합체는 다음의 구조를 갖는다.



[식 중, R은 H 또는 알킬, 알켄, 알콕시 또는 아릴이거나, 치환 아릴 기일 수 있고; B는 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있는 결합부이며; POLY는 수용성인 비향원성 중합체이고; A는 결합부로서, 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, B와 동일하거나 또는 상이할 수 있고; X는 제2 작용기임]

[0540] A 및 B에 대한 결합부의 예로서는 18개 이하, 및 더욱 바람직하게는 1~10개의 탄소 원자를 함유하는 다중 기능화 알킬기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이종 원자 예를 들어, 질소, 산소 또는 황은 알킬 사슬에 포함될 수 있다. 알킬 사슬은 또한 이종 원자 위치에서 분지될 수도 있다. A 및 B에 대한 결합부의 기타 예로서는 10개 이하 및 더욱 바람직하게는 5~6개의 탄소 원자를 포함하는 다중 기능화 아릴기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적당한 결합기의 기타 예로서는 각각 본원에 참고용으로서 인용되어 있는, 미국 특허 제 5,932,462 호 및 동 제 5,643,575 호 및 미국 특허 출원 공보 2003/0143596에 개시되어 있다. 당 업자는 전술한 결합부에 관한 나열이 한정적인 것은 결코 아니며, 오로지 예시를 위한 것으로서, 전술한 특성을 갖는 다양한 결합부는 본 발명에 유용한 것으로 간주된다는 사실을 인식할 것이다.

[0541] X로서 사용하기에 적당한 작용기의 예로서는, 히드록실, 보호 히드록실, 알콕시, 활성 에스테르 예를 들어, N-히드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 탄산염 예를 들어, 탄산 N-히드록시숙신이미딜 및 탄산 1-벤조트리아졸릴, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 셀론, 아민, 아미노옥시, 보호 아민, 히드라지드, 보호 히드라지드, 보호 티올, 카르복시산, 보호 카르복시산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐셀론, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트 및 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아세틸렌을 포함한다. 이미 알고 있겠지만, 선택된 X 부위는 아세틸렌기와 융화되어 아세틸렌기와의 반응이 일어나지 않아야 한다. 아세틸렌-함유 유도 중합체는 상동 이중 작용성[제2 작용기(즉, X)가 아세틸렌 부위]이거나, 이중 이중 작용성[제2 작용기가 상이한 작용기]일 수 있다.

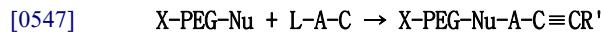
[0542] 본 발명의 다른 구체예에서, 유도 중합체는 다음의 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다.



[식 중, X는 전술한 바와 같은 작용기이고; n은 약 20~약 4000이며; m은 1~10임]

[0545] 이종 이중 작용성 PEG 중합체에 대한 각각의 구체예는 이하에 기술하였다.

[0546] 본 발명의 아세틸렌-함유 PEG 유도체는 당 업자에게 공지된 방법 및/또는 본원에 개시된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하나의 방법에서, 평균 분자량 약 800~약 100,000 Da이고, 제1 작용기에는 제1 말단부가 결합되어 있고, 적당한 친핵기에는 제2 말단부가 결합되어 있는 수용성 중합체 골격은 아세틸렌 작용기, 및 PEG상 친핵기와 반응하기에 적당한 이탈기를 모두 보유하는 화합물과 반응한다. 친핵성 부위를 보유하는 PEG 중합체와 이탈기를 보유하는 분자가 결합할 때, 이탈기는 친핵성 치환 반응을 수행하고, 친핵성 부위에 의해 치환되는 결과, 목적으로 하는 아세틸렌-함유 중합체를 얻을 수 있다.



[0548] 상기 나타낸 바와 같이, 상기 반응에서 사용하기에 바람직한 중합체 골격은 구조식 X-PEG-Nu로 나타낼 수 있으며, 여기서 PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, Nu는 친핵성 부위이며, X는 Nu, L 또는 아세틸렌 작용기와 반응하지 않는 작용기이다.

[0549] Nu의 예로서는, SN2 유형 기작을 통하여 주로 반응하는 아민, 알콕시, 아릴옥시, 설프히드릴, 이미노, 카복실레이트, 히드라지드, 아미노옥시 기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. Nu 기의 추가 예로서는 친핵성 부가 반응을 통하여 주로 반응하는 작용기들을 포함한다. L기의 예로서는 염화물, 브롬화물, 요드화물, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트와 친핵성 치환 반응을 수행하는 것으로 예상되는 기타 기, 그리고, 케톤, 알데히드, 티오에스테르, 올레핀, 알파-베타 불포화 카보닐기, 탄산염 및 친핵체에 의해 부가 반응을 수행하는 것으로 예상되는 기타 친전자 기를 포함한다.

[0550] 본 발명의 다른 구체예에서, A는 1~10개의 탄소 원자로 이루어진 지방족 링커 또는 6~14개의 탄소 원자를 보유하는 치환 아릴 고리이다. X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이며, L은 적당한 이탈기이다.

- [0551] 본 발명의 아세틸렌-함유 유도 중합체의 다른 제조 방법에 있어서, 평균 분자량 약 800~약 100,000 Da이고, 한 쪽 말단부에 보호 작용기 또는 캡핑제를 보유하며, 다른 쪽 말단부에는 적당한 이탈기를 보유하는 PEG 중합체는 아세틸렌 음이온과 접촉한다.
- [0552] 대표적인 반응식은 다음과 같다.
- [0553] $X\text{-PEG-L} + \text{-C}\equiv\text{CR}' \rightarrow X\text{-PEG-C}\equiv\text{CR}'$
- [0554] [식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고 X는 캡핑기 예를 들어, 알콕시 또는 전술한 작용기이며; R'는 H, 알킬, 알콕시, 아릴 또는 아릴옥시 기 또는 치환된 알킬, 알콕시, 아릴 또는 아릴옥시 기임]
- [0555] 전술한 예에 있어서, 이탈기 L은 충분한 농도의 아세틸렌 음이온과 접촉할 때, SN2-유형 치환 반응을 수행하기에 충분히 반응성이어야 한다. 이탈기의 SN2 치환 반응을 수행하는데 필요한 반응 조건은 당 업계에 널리 공지되어 있다.
- [0556] 미정제 생산물의 정제는 일반적으로 당 업계에 공지된 방법 예를 들어, 필요에 따라서 생산물을 침전시킨 이후에 크로마토그래피하는 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0557] 수용성 중합체는 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 수용성 중합체는, 비 천연 코딩 또는 천연 코딩 아미노산의 임의의 작용기 또는 치환기 또는 항원 결합 폴리펩티드, 또는 비 천연 코딩 또는 천연 코딩 아미노산에 부가된 임의의 작용기 또는 치환기에 삽입된, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 통하여 결합될 수 있다. 대안적으로, 수용성 중합체는, 천연 발생 아미노산(예를 들어, 시스테인, 리신 또는 N-말단 잔기의 아민기)를 통하여 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 삽입되어 있는 항원 결합 폴리펩티드에 결합된다. 몇몇 경우에 있어서, 본 발명의 ABP는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 비 천연 아미노산을 포함하는데, 여기서 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체(예를 들어, PEG 및/또는 올리고당)에 결합되어 있다. 몇몇 경우에 있어서, 본 발명의 ABP는 추가로 수용성 중합체에 결합되어 있는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 천연 코딩 아미노산을 포함한다. 몇몇 경우에 있어서, 본 발명의 ABP는 수용성 중합체에 결합되어 있는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산과, 수용성 중합체에 결합되어 있는 하나 이상의 천연 발생 아미노산을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명에 사용되는 수용성 중합체는 컨쥬게이트화되지 않은 형태와 관련하여 ABP의 혈청 반감기를 강화한다.
- [0558] 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드에 결합된 수용성 중합체의 수(즉, PEG화 또는 당질화된 정도)는 변형된(예를 들어, 증가 또는 감소된) 약리학적, 약물 동력학적 또는 약물 동태학적 특성 예를 들어, 생체 내 반감기를 제공하도록 조정될 수 있다. 몇몇 구체예에서, ABP의 반감기는 변형되지 않은 폴리펩티드에 비하여 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %, 2 배, 5 배, 10 배, 50 배, 또는 약 100 배 이상 증가한다.
- [0559] 강한 친핵기(즉, 히드라지드, 히드라진, 히드록실아민 또는 세미카바지드)를 함유하는 PEG 유도체
- [0560] 본 발명의 하나의 구체예에서, 카보닐-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 PEG 골격에 직접 결합되어 있는 말단 히드라진, 히드록실아민, 히드라지드 또는 세미카바지드 부위를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.
- [0561] 몇몇 구체예에서, 히드록실아민-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0562] $\text{RO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-O-(CH}_2)_m\text{-O-NH}_2$
- [0563] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa)임]
- [0564] 몇몇 구체예에서, 히드라진- 또는 히드라지드-함유 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0565] $\text{RO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-O-(CH}_2)_m\text{-X-NH-NH}_2$
- [0566] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있는 카보닐기(C=O)일 수도 있음]
- [0567] 몇몇 구체예에서, 세미카바지드-함유 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0568] $\text{RO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-O-(CH}_2)_m\text{-NH-C(O)-NH-NH}_2$

- [0569] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000임]
- [0570] 본 발명의 다른 구체예에서, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 아미드 결합에 의하여 PEG 골격에 결합되어 있는, 말단 히드록실아민, 히드라지드, 히드라진, 또는 세미카바지드 부위를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.
- [0571] 몇몇 구체예에서, 히드록실아민-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 갖는다.
- [0572] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$
- [0573] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa)임]
- [0574] 몇몇 구체예에서, 히드라진- 또는 히드라지드-함유 PEG 유도체는 다음의 구조를 갖는다.
- [0575] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0576] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있는 카보닐기(C=O)일 수도 있음]
- [0577] 몇몇 구체예에서, 세미카바지드-함유 PEG 유도체는 다음의 구조를 갖는다.
- [0578] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0579] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000임]
- [0580] 본 발명의 다른 구체예에서, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 ABP는 말단 히드라진, 히드록실아민, 히드라지드 또는 세미카바지드 부위를 함유하는 분지형 PEG 유도체로 변형되며, 여기서 상기 분지형 PEG의 각 사슬은 분자량이 10~40 kDa, 더욱 바람직하게는 5~20 kDa이다.
- [0581] 본 발명의 다른 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP는 분지형 구조를 갖는 PEG 유도체로 변형된다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 히드라진- 또는 히드라지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0582] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0583] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있는 카보닐기(C=O)일 수도 있음]
- [0584] 몇몇 구체예에서, 세미카바지드기를 함유하는 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0585] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0586] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 임의로 NH, O, S, C(O)이거나 존재하지 않으며, m은 2~10이고, n은 100~1,000임]
- [0587] 몇몇 구체예에서, 히드록실아민기를 함유하는 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.
- [0588] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$
- [0589] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 임의로 NH, O, S, C(O)이거나 존재하지 않으며, m은 2~10이고, n은 100~1,000임]
- [0590] 수용성 중합체가 ABP에 결합하는 정도 및 그 위치는 ABP가 항원 또는 수용체에 결합하는 것을 조절할 수 있다.
- [0591] 중합체 활성화 및 펩티드의 컨쥬게이트화를 위한 방법 및 화학 반응은 여러 문헌에 개시되어 있으며, 당 업계에도 공지되어 있다. 일반적으로 사용되는 중합체 활성화 방법은 작용기를 브롬화시아노겐, 과요드산염, 글루타르알데히드, 비에폭시드, 에피클로로히드린, 디비닐설폰, 카보디이미드, 할로겐화 설포닐, 트리클로로트리아진 등으로 활성화시키는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다[R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson 외 다수, (1993), IMMobilized AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L. 외 다수, Eds. POLYMERIC DRUGS

AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991)].

[0592] PEG의 기능화 및 컨쥬게이트화에 대한 몇몇 검토 및 논문을 구할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong 외 다수, *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado 외 다수, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995)]을 참조하시오.

[0593] 중합체의 활성화 방법은 문헌[WO 94/17039, 미국 특허 제 5,324,844 호, WO 94/18247, WO 94/04193, 미국 특허 제 5,219,564 호, 미국 특허 제 5,122,614 호, WO 90/13540, 미국 특허 제 5,281,698 호, 및 WO 93/15189]에서 살펴볼 수 있으며, 활성화된 중합체와 효소 예를 들어, 응집 인자 VIII(WO 94/15625), 헤모글로빈(WO 94/09027), 산소 운반 분자(미국 특허 제 4,412,989 호), 리보뉴클레아제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제(Veronesedhl 다수, *App. Biochem. Biotech.* 11 : 141-45 (1985)) 사이의 컨쥬게이트화 방법에 관하여도 문헌에서 살펴볼 수 있다. 인용되어 있는 모든 참고 문헌 및 특허는 본원에 참고용으로 인용되어 있다.

[0594] 비-천연적으로 코딩된 아미노산 예를 들어, p-아지도-L-페닐알라닌을 함유하는 항원-결합 폴리펩티드의 PEG화(즉, 임의의 수용성 중합체의 부가)는 임의의 종래 방법으로 수행된다. 예를 들어, ABP는 알킬-말단 mPEG 유도체로 PEG화된다. 간단히 말해서, 실온에서 과량의 고체 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH를 p-아지도-L-Phe-함유 ABP의 수용액에 교반하면서 첨가한다. 통상적으로, 수용액은 pK_a가 반응이 수행되는 pH(일반적으로 pH 약 4~10)에 가까운 완충액으로 완충된다. 예를 들어, PEG화용으로서 적당한 완충액(pH 7.5)의 예로서는 HEPES, 인산염, 봉산염, TRIS-HCl, EPPS, 및 TES를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. pH는 필요에 따라서 연속적으로 모니터하면서, 조정한다. 반응은 통상적으로 약 1~48 시간 동안 연속된다.

[0595] 반응 생성물은 결과적으로 소수성 상호 작용 크로마토그래피되어, 블로킹되지 않은 PEG가 분자의 양 말단에서 활성화될 때 생성될 수 있는 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH 및 임의의 고분자량 복합체(PEG화된 ABP 복합체)로부터 PEG화된 ABP 변이체가 분리되며, 이로써 ABP 변이체 분자는 가교된다. 소수성 상호 작용 크로마토그래피 동안의 조건은, 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH가 걸림을 통하여 흐를 때 임의의 가교된 PEG화 ABP 변이 복합체(하나 이상의 PEG기에 컨쥬게이트화된 하나의 ABP 변이체 분자 함유)가 원하는 형태를 취한 후 용리되는 것이다. 가교 복합체 대 목적 컨쥬게이트의 상대적 크기에 따라서 적당한 조건인지 여부가 달려있는 것이며, 이는 당 업자에 의해 용이하게 결정된다. 목적 컨쥬게이트를 함유하는 용리액은 한외 여과에 의해 농축되고, 정용 여과에 의해 탈염된다.

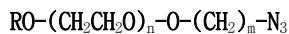
[0596] 필요한 경우, 소수성 크로마토그래피로부터 얻은 PEG화 ABP는 당 업자에게 공지된 하나 이상의 방법 예를 들어, 친화성 크로마토그래피; 음이온- 또는 양이온-교환 크로마토그래피(예를 들어, DEAE SEPHAROSE 사용); 실리카상 크로마토그래피; 역상 HPLC; 젤 여과법(예를 들어, SEPHADEX G-75 사용); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기-배제 크로마토그래피, 금속-킬레이트 크로마토그래피; 한외 여과법/정용 여과법; 에탄올 침전법; 황산 암모늄 침전법; 크로마토포커싱; 치환 크로마토그래피; 전기 영동법(예를 들어, 예비 등전 포커싱), 감별 용해도(예를 들어, 황산 암모늄 침전법) 또는 추출법에 의하여 추가로 정제될 수 있다. 정확한 분자량은 GPC에 의해서 구형 단백질 표준과 비교함으로써 측정될 수 있다[PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306]. ABP-PEG 컨쥬게이트의 순도는 단백 분해 절단법(예를 들어, 트립신 절단) 이후, 질량 분광 분석법을 수행하여 측정할 수 있다[Pepinsky B. 외 다수, *J. Pharmacol. & Exp. Ther.* 297(3): 1059-66 (2001)].

[0597] 본 발명의 ABP의 아미노산에 결합된 수용성 중합체는 무제한으로 유도체화 또는 치환될 수 있다.

아지도-함유 PEG 유도체

[0599] 본 발명의 다른 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄상에 존재하는 알킬 부위와 반응할 아지도부를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다. 일반적으로, PEG 유도체의 평균 분자량은 1~100 kDa이며, 몇몇 구체예에서는 10~40 kDa이다.

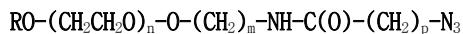
[0600] 몇몇 구체예에서, 아지도-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 갖는다.



[0602] [식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000(즉, 평균 분자량이 5~40

kDa)임]

[0603] 다른 구체예에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 갖는다.



[식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000임(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임)]

[0606] 본 발명의 다른 구체예에서, 알킬-함유 아미노산을 포함하는 ABP는 말단 아지드부를 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형되는데, 여기서 상기 분지형 PEG의 각 사슬 분자량은 10~40 kDa, 더욱 바람직하게는 5~20 kDa이다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.

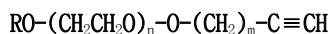


[식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이며, X는 임의로 O, N, S 또는 카보닐기(C=O)로서, 각각의 경우 존재할 수 있거나 또는 존재하지 않을 수도 있음]

알킬-함유 PEG 유도체

[0610] 본 발명의 다른 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는, 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄상에 존재하는 아지드부와 반응할 알킬부를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.

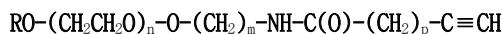
[0611] 몇몇 구체예에서, 알킬-말단 PEG 유도체는 다음과 같은 구조를 가질 것이다.



[식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa)임]

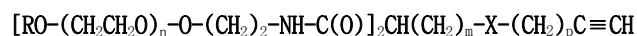
[0614] 본 발명의 다른 구체예에서, 알킬-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는, 아미드 결합에 의해 PEG 골격에 결합되어 있는 말단 아지드 또는 말단 알킬 부위를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.

[0615] 몇몇 구체예에서, 알킬-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.



[식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000임]

[0618] 본 발명의 다른 구체예에서, 아지드-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는, 말단 알킬 부위를 함유하는 분지형 PEG 유도체로 변형되며, 이때, 분지형 PEG의 각 사슬의 분자량은 10~40 kDa이고, 더욱 바람직하게는 5~20 kDa이다. 예를 들어, 몇몇 구체예에서, 알킬-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.

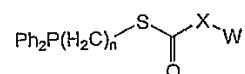


[식 중, R은 단순 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이며, X는 임의로 O, N, S 또는 카보닐기(C=O)이거나, 또는 존재하지 않음]

포스핀-함유 PEG 유도체

[0622] 본 발명의 다른 구체예에서, 항원-결합 폴리펩티드는 활성화된 작용기(예를 들어, 에스테르, 탄산염)를 함유하는 PEG 유도체로 변형되며, 여기서 상기 활성화된 작용기는 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄상에 존재하는 아지드부와 반응할 아릴 포스핀기를 추가로 포함한다. 일반적으로, PEG 유도체의 평균 분자량은 1~100 kDa이고, 몇몇 구체예에서는 10~40 kDa이다.

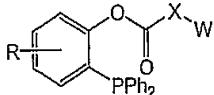
[0623] 몇몇 구체예에 있어서, PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.



[0624]

[0625] [식 중, n은 1~10이고; X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않을 수 있으며; Ph는 폐닐이고, W는 수용성 중합체임]

[0626] 몇몇 구체예에서, PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다.



[0627]

[0628] [식 중, X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않을 수 있으며, Ph는 폐닐이고, W는 수용성 중합체이며, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기일 수 있음]

[0629] 대표적인 R기로서는 -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -할로겐, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN 및 -NO₂를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 R', R'', R''' 및 R''''은 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비 치환 헤테로알킬, 치환 또는 비 치환 아릴, 예를 들어, 1~3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비 치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기이거나, 아릴알킬기이다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함하면, 예를 들어, 상기 기들 중 하나 이상이 존재할 때 R기는 각각 독립적으로 R', R'', R''' 및 R'''' 기에서와 같이 선택된다. R' 및 R''가 동일한 질소 원자에 결합할 때, 이들은 질소 원자와 결합하여 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성한다. 예를 들어, -NR'R''는 예를 들어, 1-피롤리디닐 및 4-모폴리닐을 포함하는 것으로 생각된다. 치환기에 대하여 전술한 바로부터, 당 업자는 "알킬"이라는 용어가 수소기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기 예를 들어, 할로알킬(예를 들어, -CF₃ 및 -CH₂CF₃) 및 아실(예를 들어, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등)을 포함하는 의미라는 것을 이해할 것이다.

기타 PEG 유도체 및 일반적 PEG화 기술

[0631] 항원-결합 폴리펩티드에 결합될 수 있는 기타 대표적인 PEG 분자 및 PEG화 방법에 관하여는 본원에 참고용으로 인용되어 있는 문헌[예를 들어, 미국 특허 공보 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; 2001/0027217; 2001/0021763; 미국 특허 제 6,646,110 호; 동 제 5,824,778 호; 동 제 5,476,653 호; 동 제 5,219,564 호; 동 제 5,629,384 호; 동 제 5,736,625 호; 동 제 4,902,502 호; 동 제 5,281,698 호; 동 제 5,122,614 호; 동 제 5,473,034 호; 동 제 5,516,673 호; 동 제 5,382,657 호; 동 제 6,552,167 호; 동 제 6,610,281 호; 동 제 6,515,100 호; 동 제 6,461,603 호; 동 제 6,436,386 호; 동 제 6,214,966 호; 동 제 5,990,237 호; 동 제 5,900,461 호; 동 제 5,739,208 호; 동 제 5,672,662 호; 동 제 5,446,090 호; 동 제 5,808,096 호; 동 제 5,612,460 호; 동 제 5,324,844 호; 동 제 5,252,714 호; 동 제 6,420,339 호; 동 제 6,201,072 호; 동 제 6,451,346 호; 동 제 6,306,821 호; 동 제 5,559,213 호; 동 제 5,612,460 호; 동 제 5,747,646 호; 동 제 5,834,594 호; 동 제 5,849,860 호; 동 제 5,980,948 호; 동 제 6,004,573 호; 동 제 6,129,912 호; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 및 EP 154 316]에 개시되어 있다. 본원에 개시된 PEG 분자 중 임의의 것은 임의의 형태 예를 들어, 단일 사슬, 분지형 사슬, 다중 분지형 사슬, 단일 작용성, 이중 작용성, 다 작용성 또는 임의의 조합된 형태로서 사용될 수 있다.

혈청 알부민에 대한 친화성의 강화

[0633] 다양한 분자도 또한 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드에 융합되어, 혈청 내 반감기를 조절할 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 분자는 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드에 결합 또는 융합되어, 이 항원-결합 폴리펩티드의 내인성 혈청 알부민에 대한 동물 내 친화성이 강화된다.

[0634] 예를 들어, 몇몇 경우에 있어서, 항원-결합 폴리펩티드 및 알부민 결합 서열의 재조합 융합체가 제조된다. 대표적인 알부민 결합 서열로서는 예를 들어, 스트렙토코커스 단백질 G[예를 들어, Makrides 외 다수, *J. Pharmacol.*

Exp. Titer. 277:534-542 (1996) 및 Sjolander 외 다수, *J Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)]로부터 유래된 알부민-결합 영역 또는 알부민-결합 웨პ티드[예를 들어, Dennis 외 다수, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002)]를 포함한다.

[0635] 다른 구체예에서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드는 지방산으로 아실화된다. 몇몇 경우에 있어서, 지방산은 혈청 알부민에의 결합을 촉진한다. 문헌[예를 들어, Kurtzhals 외 다수, *Biochem. J.* 312:725-731 (1995)]을 참조하시오.

[0636] 다른 구체예에서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드는 혈청 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민)과 직접적으로 융합된다. 당 업자는 다양한 기타 분자도 또한 본 발명의 ABP에 결합되어 혈청 알부민 또는 기타 혈청 성분에의 결합을 조절 할 수 있음을 인식할 것이다.

X. ABP의 당질화

[0638] 본 발명은 당 잔기를 보유하는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 삽입되어 있는 항원-결합 폴리펩티드를 포함한다. 상기 당 잔기는 천연의 것(예를 들어, N-아세틸글루코사민) 또는 비 천연의 것(예를 들어, 3-플루오로갈락토즈)일 수 있다. 상기 당은 N- 또는 O-결합 글리코시드 결합(예를 들어, N-아세틸갈락토즈-L-세린) 또는 비 천연 결합(예를 들어, 옥심 또는 상응하는 C- 또는 S-결합 글리코시드)에 의해 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합될 수 있다.

[0639] 당(예를 들어, 글리코실) 부위는 시험관 내 또는 생체 내에서 항원-결합 폴리펩티드에 부가될 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, 카보닐-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 아미노옥시기로서 유도체화된 당으로 변형되어, 옥심 결합을 통해 결합된 해당 당질화 폴리펩티드를 생성한다. 일단 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합하면, 당은 글리코실 전이효소 및 기타 효소로 추가로 개질되어, 항원-결합 폴리펩티드에 결합된 올리고당을 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[H. Liu 외 다수 *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003)]을 참조하시오.

[0640] 본 발명의 몇몇 구체예에서, 카보닐-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 아미노옥시 유도체로서 제조된 특정 구조를 갖는 글리칸으로 직접 변형된다. 당 업자는 기타 작용기 예를 들어, 아지드, 알kin, 히드라지드, 히드라진 및 세미카바지드가 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 당을 결합시키는데에 사용될 수 있다는 사실을 인식할 것이다.

[0641] 본 발명의 다른 구체예에서, 아지드 또는 알카닐-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드는 이후 예를 들어, 각각의 알카닐 또는 아지드 유도체와의 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응에 의해 변형될 수 있다. 이 방법은 단백질의 선택성을 고도로 높일 수 있다.

XI. ABP 이량체 및 다량체

[0643] 본 발명은 또한, 폴리펩티드 골격에 직접 결합하거나 또는 링커에 의해 결합함으로써, 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 ABP 폴리펩티드가 다른 ABP 또는 이의 변이체, 또는 비 ABP 폴리펩티드 또는 이의 변이체인 임의의 기타 폴리펩티드에 결합하는 경우, 예를 들어, ABP 동종 이량체, 이종 이량체, 동종 다량체, 또는 이종 다량체(즉, 삼량체, 사량체 등)를 포함하는 ABP 조합체를 제공한다. 단량체에 비하여 큰 분자량으로 인해, ABP 이량체 또는 다량체 컨쥬게이트는 단량체 ABP에 비하여 신규하거나 또는 바람직한 특성 예를 들어, 상이한 약리학, 약물 동력학 및 약물 동태학적 특성, 조절된 치료적 반감기, 또는 조절된 혈장 반감기를 가질 수 있다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 ABP 이량체는 ABP 수용체의 이량체화를 조절할 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 ABP 이량체 또는 다량체는 ABP 수용체 길항제, 작동약 또는 조절제로서 작용할 것이다.

[0644] 몇몇 구체예에서, ABP 함유 이량체 또는 다량체 내에 존재하는 하나 이상의 ABP는 수용성 중합체에 결합되어 있는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 상기 ABP는 예를 들어, Asn-Lys 아미드 결합 또는 Cys-Cys 이황화 결합을 통하여 직접적으로 결합되어 있다. 몇몇 구체예에서, 결합된 ABP 및/또는 결합된 비 ABP 폴리펩티드는 상이한 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하여, 이량체화를 촉진하는데, 예를 들어, 제1 ABP의 하나의 비-천연적으로 코딩된 아미노산 중 알kin, 및 제2 ABP의 제2 비-천연적으로 코딩된 아미노산 중 아지드는 휘스겐 [3 + 2] 고리 첨가 반응을 통해 컨쥬게이트화될 것이다. 대안적으로, 제1 ABP 및/또는 케톤-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 결합형 비 ABP 폴리펩티드는, 히드록실아민-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 제2 ABP 폴리펩티드에 컨쥬게이트화될 수 있으며, 이 폴리펩티드는 해당 옥심을 형성함으로써 반응하게 된다.

[0645] 대안적으로, 2개의 ABP 및/또는 결합형 비 ABP 폴리펩티드는 링커를 통하여 결합된다. 임의의 이중- 또는 동종-이중 작용성 링커는 동일하거나 또는 상이한 1차 서열을 보유할 수 있는 2개의 ABP 및/또는 결합형 비 ABP 폴리펩티드를 결합시키는데에 사용될 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, ABP 및/또는 결합형 비 ABP 폴리펩티드를 함께 묶는데 사용되는 링커는 모두 이중 작용성 PEG 시약일 수 있다. 링커는 광범위한 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. 보다 크거나 보다 작은 분자량을 갖는 링커는 ABP 및 결합된 실체 사이의 바람직한 공간 관계(spacial relationship) 또는 형태를 제공하는데 사용될 수 있다. 분자 길이가 보다 길거나 또는 짧은 링커는 또한 ABP와 결합된 실체 사이에 바람직한 공간 또는 유연성을 제공하는데 사용될 수 있다. 이와 유사하게, 특정 형태 또는 구조를 갖는 링커는, ABP가 표적에 도달하기 이전 또는 그 이후에 ABP 또는 결합된 실체에 특정 형태 또는 구조를 부여하도록 이용될 수 있다. 링커의 각 말단에 존재하는 작용기는 바람직한 조건 하에서 ABP 또는 비 ABP 폴리펩티드의 방출을 조절하도록 선택될 수 있다. 이러한 ABP 및 결합된 실체 사이의 공간 관계의 최적화는 분자에 신규하거나, 조절된, 또는 의도로 한 특성을 제공할 수 있다.

[0646] 몇몇 구체예에서, 본 발명은 덤벨 구조를 갖는 수용성의 이중 작용성 링커를 제공하는데, 이때 이 덤벨 구조는 a) 중합체 골격중 최소한의 제1 말단에 아지드, 알킨, 히드라진, 히드라지드, 히드록시아민 또는 카보닐-함유 부위를 포함하고; b) 중합체 골격의 제2 말단에 최소한의 제2 작용기를 포함한다. 제2 작용기는 제1 작용기와 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 제2 작용기는 제1 작용기와 반응하지 않는다. 몇몇 구체예에서, 본 발명은 분지형 분자 구조의 하나 이상의 분지를 포함하는 수용성 화합물을 제공한다. 예를 들어, 분지형 분자 구조는 텐드리머형일 수 있다.

[0647] 몇몇 구체예에서, 본 발명은 다음과 같은 구조를 갖는 수용성 활성화 중합체와의 반응에 의해 형성된 하나 이상의 ABP를 포함하는 다량체를 제공한다.

[0648] $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$

[0649] [식 중, n은 약 5~3000이고, m은 2~10이며, X는 아지드, 알킨, 히드라진, 히드라지드, 아미노옥시 기, 히드록실아민, 아세틸 또는 카보닐-함유 부위일 수 있으며, R은 X와 동일하거나 또는 상이한 캡핑기, 작용기 또는 이탈기임]

[0650] R은 예를 들어, 히드록실, 보호 히드록실, 알콕시, N-히드록시숙신아미딜 에스테르, 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 탄산 N-히드록시숙신아미딜, 탄산 1-벤조트리아졸릴, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 설휴, 아민, 아미노옥시, 보호 아민, 히드라지드, 보호 히드라지드, 보호 티올, 카르복시산, 보호 카르복시산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설휴, 디티오퍼리딘, 비닐퍼리딘, 요도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트 및 트레실레이트, 알켄 및 케톤으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기일 수 있다.

XII. ABP 활성 및 ABP 항원 또는 결합 파트너에 대한 ABP의 친화성 측정

[0652] ABP 활성은 표준적인 시험관 내 또는 생체 내 검정법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, ABP와 결합하는 세포 또는 세포 주(예를 들어, 원래의 ABP 항원 또는 결합 파트너 또는 재조합 ABP 항원 또는 결합 파트너 생산 세포)는 ABP 결합을 모니터하는데 사용될 수 있다. 비 천연 아미노산을 포함하는 비 PEG화 또는 PEG화 항원-결합 폴리펩티드에 있어서, 항원 또는 결합 파트너에 대한 ABP의 친화성은 당 업계에 공지된 기술 예를 들어, BIACore(상표명) 바이오센서(Pharmacia)를 이용하여 측정될 수 있다.

[0653] ABP를 생산하는데 어떤 방법을 사용하였는지에 상관 없이, ABP는 생물 활성에 대해 검정된다. 삼중 티미딘 검정법은 적당한 경우 세포 분열의 정도를 확인하기 위해 실시될 수 있다. 그러나, 기타 생물 검정법은 목적 활성을 확인하는데 사용될 수 있다. 생물 검정법 예를 들어, 항원의 생물 활성 예를 들어, 효소 활성, 증식 활성 또는 대사 활성을 억제하는 능력을 측정하는 방법은 또한 ABP 활성의 지표를 제공한다. 기타 시험관 내 검정법은 생물 활성을 확인하는데 사용될 수도 있다. 일반적으로, 생물 활성에 대한 시험은 항원의 생물 활성으로서 적당한 목적 결과에 대한 분석 결과 예를 들어, (비 변형 ABP에 비하여) 생물 활성이 증가하였는지 또는 감소하였는지 여부, (비 변형 ABP에 비하여) 상이한 생물 활성, 수용체 친화성 분석 결과, 형태적 또는 구조적 변화, 또는 혈청 반감기 분석 결과를 제공한다.

[0654] 검정 방법을 수행하기 위하여 상기 참고 문헌들을 조합하는 것은 한정적인 것이 아니며, 당 업자는 이러한 병행 법이 목적으로 하는 최종 결과물에 대한 시험용으로서 유용한 검정법임을 인식힐 것이다.

XIII. 효능, 가능성 생체 내 반감기 및 약물 동력학적 매개 변수의 측정

- [0656] 본 발명의 중요한 측면은, 수용성 중합체 부위에 컨쥬게이트화 되거나 또는 되지 않은 ABP를 구성함으로써 생물학적 반감기를 연장시키는 것이다. ABP 혈청 농도가 급속히 감소하였는지의 여부는, 컨쥬게이트화 및 비 컨쥬게이트화 ABP 및 이의 변이체를 이용하는 치료에 대한 생물학적 반응을 평가하는데 있어서 중요하다. 바람직하게, 본 발명의 컨쥬게이트화 및 비 컨쥬게이트화 ABP 및 이의 변이체는 또한, 정맥 내 투여 이후의 혈청 반감기를 연장시키는데, 이러한 사실은 예를 들어, ELISA 방법 또는 1차 스크리닝 검정법에 의해 확인할 수 있다. 생체 내 생물학적 반감기의 측정법은 본원에 개시된 바와 같이 수행된다.
- [0657] 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드에 대한 약물 동력학적 매개 변수는 정상적인 Sprague-Dawley 수컷 래트(N = 치료군 당 5 마리의 동물)에서 평가될 수 있다. 상기 동물에 25 ug/rat iv 또는 50 ug/rat sc만큼을 1회 투여하며, 미리 예정한 시간 계획[일반적으로, 수용성 중합체에 컨쥬게이트화되지 않은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드의 경우는 약 6 시간에 걸쳐서, 그리고 수용성 중합체에 컨쥬게이트화된 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드의 경우는 약 4일에 걸침]에 따라서, 대략 5~7개의 혈액 시료를 채취할 것이다. ABP에 대한 약물 동력학적 데이터는 몇몇 종에서 널리 연구되고 있으며, 이 데이터는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP에 대하여 얻어진 데이터와 직접적으로 비교될 수 있다.
- [0658] 본 발명에 따른 ABP의 특이 활성을 당 업계에 공지된 다양한 검정법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명에 따라서 얻어지고 ABP 뮤테인 또는 이의 단편의 생물 활성을 본원에 개시된 방법 또는 인용된 참고 문헌이나, 당 업자에게 공지된 방법에 의해서 시험될 수 있다.
- [0659] **XIV. 투여 방법 및 약학 조성물**
- [0660] 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질(예를 들어, 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하는 ABP, 합성효소, 단백질 등)은 치료적 용도로서, 적당한 약학 담체와 병용하여 사용될 수도 있다. 예를 들어, 이러한 조성물은 치료적 유효량의 화합물과 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체 또는 부형제로서는 염수, 완충 염수, 텍스트로즈, 물, 글리세롤, 에탄올 및/또는 이들의 조합물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제형은 투여 방식에 맞도록 제조된다. 일반적으로, 단백질을 투여하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 그러한 투여 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 투여할 때에도 적용된다.
- [0661] 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 치료 조성물은 임의로는 하나 이상의 적당한 동물 질환 모델 즉, 시험관 내 및/또는 생체 내 동물 질환 모델에서 시험되어, 그 결과 당 업계에 널리 공지된 방법에 따라서, 효능 및 조직 대사율을 확인하고, 투여량을 산정한다. 구체적으로, 처음에 투여량은 관련 검정법을 통하여, 본원의 인공적 아미노산의 활성, 안정성 또는 기타 적당한 측정 수단(예를 들어, 하나 이상의 인공적 아미노산을 포함하도록 변형된 ABP를 천연 아미노산 ABP와 비교하는 방법)에 의하여 측정될 수 있다.
- [0662] 투여는 궁극적으로 혈액 또는 조직 세포와 접촉하게 되는 분자를 도입시키는 데에 보통 사용되는 경로 중 임의의 경로에 의할 수 있다. 본 발명의 인공적 아미노산 폴리펩티드는 임의의 적당한 방식으로, 임의적으로는 하나 이상의 약학적 허용 담체와 함께 투여될 수 있다. 본 발명에 개시된 폴리펩티드를 환자에게 투여하는 적당한 방법이 허용 가능하며, 비록, 한 가지 이상의 경로가 특정 조성물을 투여하는데 사용될 수 있지만, 그러한 경로들 중 특정 경로는 종종 다른 경로보다 더 신속하고 더 효과적인 작용 또는 반응을 제공할 수 있다.
- [0663] 약학적 허용 담체는 부분적으로는 투여될 특정 조성물과, 이 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 따라서 다르다. 그러므로, 본 발명의 약학 조성물에 적당한 제형은 여러 가지가 있다.
- [0664] 폴리펩티드 조성물은 다수의 경로 예를 들어, 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국소, 설하, 또는 직장 경로에 의해 투여될 수 있다. 비 천연 아미노산 폴리펩티드를 포함하는, 변형 또는 변형되지 않은 조성물은 또한 리포좀을 통하여 투여될 수 있다. 이러한 투여 경로 및 적당한 제형은 일반적으로 당 업자에게 공지되어 있다.
- [0665] 비 천연 아미노산을 포함하는 ABP는 단독으로 또는 다른 적당한 성분들과 함께 흡입에 의해 투여되는 에어로졸 제형으로도 제작될 수 있다(즉, "분무화"될 수 있다). 에어로졸 제형에는 가압 허용 추진제 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등을 넣을 수 있다.
- [0666] 비 경구 투여 예를 들어, 관절 내(관절 내부), 정맥 내, 근육 내, 피내, 복강 내 및 피하 경로에 의한 투여에 적당한 제형은 수성 및 비 수성, 등장성 멀균 주입 용액 즉, 산화 방지제, 완충액, 정균제, 그리고 제형을 목적 수용체의 혈액에 등장성으로 만드는 용질, 그리고 혼탁제, 용해제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있

는 수성 및 비 수성 멸균 혼탁액을 포함한다. 팩킹된 ABP 제형은 단위-투여용 용기 또는 복수 투여용 밀봉 용기 예를 들어, 앰플 및 바이알로서 제공될 수 있다.

[0667] 비 경구 투여 및 정맥 내 투여 방법으로서 바람직하다. 특히, 이미 천연 아미노산 상동체 치료법(예를 들어, EPO, GH, ABP, G-CSF, GM-CSF, IFN, 인터루킨, 항체 및/또는 임의의 기타 약학적으로 전달되는 단백질에 통상적으로 사용되는 치료법)에 사용되고 있는 투여 경로는, 현재 사용되고 있는 제형과 함께, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 바람직한 투여 경로 및 제형을 제공한다.

[0668] 본 발명에 있어서, 환자에게 투여되는 투여량은, 용도에 따라서 시간이 경과함에 따라 환자에게 유리한 치료적 반응을 나타내는데 충분한 양으로서, 예를 들어, 병원균에 의한 감염을 억제하거나 또는 기타 적당한 활성을 나타내는데 충분한 양이다. 투여량은 특정 백터 또는 제형의 효능, 그리고 사용된 비 천연 아미노산 폴리펩티드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기와 환자의 상태, 그리고 치료 받을 환자의 체중 또는 표면적에 따라서 결정된다. 투여량의 크기는 또한 특정 환자에서 특정 백터, 제형 등의 투여에 따른 임의의 부작용의 존부, 성질 및 정도에 따라서 결정된다.

[0669] 질환(예를 들어, 암, 유전병, 당뇨병, AIDS 등)의 치료 또는 예방에 투여되는 백터 또는 제형의 유효량을 결정하는데 있어서, 의사는 혈류 내 혈장 수치, 제형의 독성, 병의 진행 및/또는 항-인공적 아미노산 폴리펩티드 항체의 생산 장소를 평가한다.

[0670] 예를 들어, 70 kg의 환자에게 투여될 투여량은 통상적으로 현재 사용되는 치료 단백질의 투여량과 균등한 범위로서, 관련 조성물의 변형된 활성 또는 혈청 반감기에 맞춘다. 본 발명의 백터는 공지된 임의의 통상적 치료법 예를 들어, 항체 투여법, 백신 투여법, 세포 독성 제제, 천연 아미노산 폴리펩티드, 핵산, 뉴클레오티드 유사체 및 생물 반응 개질제의 투여법에 의해 치료 조건을 보충할 수 있다.

[0671] 투여시, 본 발명의 제형은 관련 제형의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 다양한 농도의 인공적 아미노산으로 인한 임의의 부작용의 관찰 결과에 따라서 결정된 비율 예를 들어, 환자의 몸집과 전체적인 건강 상태에 따라 적용되는 바와 같은 비율로 투여된다.

[0672] 만일 제형을 흡입한 환자에서 발열, 오한 또는 근육통이 발생하면, 그 환자에게 적당량의 아스피린, 이부프로펜, 아세타미노펜 또는 기타 통증/발열 억제 약물을 투여한다. 흡입시 예를 들어, 발열, 근육통 및 오한과 같은 반응을 경험한 환자에게는 추후의 흡입 이전에 30 분 동안 아스피린, 아세타미노펜 또는 예를 들어, 디펜히드라민을 미리 투여한다. 메페리딘은 오한과 근육통이 보다 심할 때 즉, 해열제 및 항히스타민제에 신속하게 반응하지 않을 때, 사용된다. 세포 흡입은 반응의 심각한 정도에 따라서 늦추어지기도 하고 또는 중단되기도 한다.

[0673] 본 발명의 인간 항원-결합 폴리펩티드는 포유 동물 개체에 직접 투여될 수 있다. 투여는 개체에 ABP를 투여할 때 보통 사용되는 임의의 경로에 따른다. 임의의 경우에 있어서 가장 적당한 경로는 치료받을 병태의 특성 및 심각성에 따라 다를 것이지만, 본 발명의 구체예에 따른 ABP 조성물은 경구, 직장, 국소, 흡입(예를 들어, 에어로졸), 구강(예를 들어, 설하), 질내, 비경구(예를 들어, 피하, 근육내, 피내, 관절내, 늑막내, 복강내, 뇌내, 동맥내 또는 정맥내), 국소(즉, 피부 및 점막 표면 예를 들어, 기도 표면) 및 경피 투여에 적당한 조성물을 포함한다. 투여는 국소 또는 전신 투여일 수 있다. 화합물의 제형은 단위-투여 또는 복수-투여 밀봉 용기의 형태 예를 들어, 앰플 및 바이알로 제공될 수 있다. 본 발명의 ABP는 단위 투여 주입형(예를 들어, 용액, 혼탁액 또는 유액)으로서 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 혼합물의 형태로서 제공될 수 있다. 본 발명의 ABP는 또한 연속 주입법(예를 들어, 미니 펌프 예를 들어, 삼투압 펌프를 사용하는 방법), 단일 주입법 또는 서방형 제형에 의하여 투여될 수 있다.

[0674] 투여용으로서 적당한 제형은, 산화 방지제, 완충액, 정균제 및 제형을 등장성으로 만드는 용질, 그리고 혼탁제, 용해제, 중점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비 수성의 등장성 멸균 혼탁액을 포함한다. 용액 및 혼탁액은 전술한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0675] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 부분적으로는 투여될 특정 조성물과, 이 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 따라서 다르다. 그러므로, 본 발명의 약학 조성물의 적당한 제형(임의의 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 포함)은 여러가지이다[예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985)].

[0676] 적당한 담체로서는 인산염, 붕산염, HEPES, 시트르산염 및 기타 유기산을 함유하는 완충액; 아스코르브산을 포

함하는 산화 방지제; 저 분자량(약 10개 잔기 미만)의 폴리펩티드; 단백질 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린; 친수성 중합체 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물 예를 들어, 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린; 칼레이트화제 예를 들어, EDTA; 이가 금속 이온 예를 들어, 아연, 코발트 또는 구리; 당 알콜 예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 짹 이온 예를 들어, 나트륨; 및/또는 비 이온계 계면 활성화제 예를 들어, Tween(상표명), Pluronics(상표명), 또는 PEG를 포함한다.

[0677] 수용성 중합체 예를 들어, PEG에 결합된 ABP를 포함하여 본 발명의 ABP는 서방형 시스템에 의하거나 또는 이의 일부분으로서 투여될 수도 있다. 서방형 조성물은 예를 들어, 성형품 예를 들어, 필름 또는 미소캡슐의 형태를 갖는 반 투과성 중합체 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스는 생체 적합 물질 예를 들어, 폴리(메타크릴산 2-히드록시에틸)[Langer와 다수, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)], 아세트산 에틸렌 비닐[Langer와 다수, 상동] 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산(EP 133,988), 폴리락티드(폴리락트산) (미국 특허 제 3,773,919 호; EP 58,481), 폴리글리콜리드(글리콜산의 중합체), 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물, L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체[U. Sidman와 다수, *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)], 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산, 콜라겐, 황산콘드로이친, 카르복시산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 이소루신, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 서방형 조성물은 또한 리포좀으로 포집된 화합물을 포함한다. 화합물을 함유하는 리포좀은 그 자체가 공지되어 있는 방법에 의하여 제조된다[DE 3,218,121; Epstein와 다수, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang와 다수, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허 출원 83-118008; 미국 특허 제 4,485,045 호 및 동 제 4,544,545 호; 및 EP 102,324]. 인용된 참고 문헌 및 특허는 모두 본원에 참고용으로 인용되어 있다.

[0678] 리포좀으로 포집된 ABP는 문헌[예를 들어, DE 3,218,121; Epstein와 다수, *Proc. Natl. Acad. Sd. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang와 다수, *Proc. Natl. Acad. Sd. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허 출원 83-118008; 미국 특허 제 4,485,045 호 및 동 제 4,544,545 호; 및 EP 102,324]에 개시된 방법에 의하여 제조될 수 있다. 조성물 및 리포좀 크기는 널리 공지되어 있거나 또는 당 업자에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 리포좀의 예에 관하여는 문헌[예를 들어, Park JW 외 다수, *Proc. Natl. Acad. Sd. USA* 92:1327-1331 (1995); Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998); Draymond DC 외 다수, *Liposomal drug delivery systems for cancer therapy*, in Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002); Park JW 외 다수, *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB 외 다수, *Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C 외 다수, *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003)]에 개시되어 있다. 인용된 참고 문헌 및 특허는 모두 본원에 참고용으로 인용되어 있다.

[0679] 본 발명에 있어서, 환자에게 투여된 투여량은 시간이 경과 함에 따라서 개체 내에서 유리한 반응을 일으키기에 충분하여야 한다. 일반적으로, 본 발명의 ABP의 (비 경구 투여시) 총 약학적 유효량은, 치료적 재량에 따라서, 개체의 체중 1 kg당 약 0.01 ~ 약 100 µg/kg/일, 또는 약 0.05 ~ 약 1 mg/kg이다. 투여 횟수도 또한 치료적 재량에 따라 다르며, 인간에 사용하기 위해 승인된 시판중인 ABP 생산물의 경우보다 더 자주 투여할 수 있거나 또는 드물게 투여할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 PEG화된 항원-결합 폴리펩티드는 전술한 투여 경로 중 임의의 경로에 의하여 투여될 수 있다.

XV. 본 발명의 항원-결합 폴리펩티드의 치료적 용도

[0680] 본 발명의 ABP 폴리펩티드는 광범위한 질환의 치료에 유용하다. ABP를 함유하는 약학 조성물은 다양한 수단을 통한 사람 환자에의 투여에 효과적인 강도로 제형화 될 수 있는데, 이때 상기 환자는 ABP 작동약 또는 길항제 예를 들어, 항 중식제, 항 염증제 또는 항 바이러스제가 단독으로 사용되거나, 또는 병태 또는 질환 치료제의 일부로서 사용될 때, 이것에 의해 영향받을 수 있는 질환에 대한 발병 경험이 있는 환자이다. 평균 ABP 양은 다양할 수 있으며, 특히 전문의의 추천과 처방에 기초하여야 한다. ABP의 정확한 양은, 그러한 인자가 치료될 병태의 정확한 유형, 치료될 환자의 병태, 그리고 조성물 중 다른 성분들에 적용되는 선호도의 문제이다. 본 발명은 또한 다른 활성 제제 예를 들어, 항암 화학 요법 제제를 치료적 유효량으로 투여하는 방법을 제공한다. 투여 될 양은 ABP를 이용한 치료법을 기초로 하여 당 업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

실시예

[0683] 이하의 실시예들은 본 발명을 예시하게 위하여 제공된 것으로서 본 발명을 한정하고자 아는 것은 아니다.

실시예 1

[0685] 본 실시예는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 ABP에 삽입시키는데 있어서 바람직한 위치를 선택하는 기준에 대한 다수의 유효한 조합 중 하나에 대하여 기술되어 있다.

[0686] 본 실시예는 비-천연적으로 코딩된 아미노산 도입을 위해 항원-결합 폴리펩티드 내에서 바람직한 위치들이 어떻게 선택되는지에 관하여 기술되어 있다. 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 도입될 수 있는 바람직한 위치를 결정하는 데에는 2 분자의 ABP로 이루어진 3차원 구조, 또는 ABP의 2차, 3차 또는 4차 구조가 사용된다.

[0687] 다음의 기준들은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 ABP의 각 위치를 평가하는데 사용되었다: 즉, (a) ABP의 3차원 구조 또는 2차, 3차 또는 4차 구조의 구조 분석 결과를 바탕으로 하여, 어느 하나의 ABP와의 결합을 방해하지 않아야 하고, (b) 알라닌 또는 상동체 주사 돌연변이 유발법에 의해 영향 받지 않아야 하며, (c) 표면 노출되어 주변 잔기들과의 반 데르 벌스 결합 또는 수소 결합 상호 작용을 최소한으로 나타내어야 하고, (d) ABP의 하나 이상의 노출면에 존재할 수 있으며, (e) 제2 ABP 또는 기타 분자나 이의 단편에 병렬하여 존재하는 ABP의 위치(들)일 수 있고, (f) ABP 변이체 내에서 결실되었거나 또는 변이될 수 있어야 하며, (g) 비-천연적으로 코딩된 아미노산과 치환됨에 따라서 보존적으로 변화되어야 하며, (h) ABP 그 자체, 또는 하나 이상의 ABP를 포함하는 이량체 또는 다량체의 형태를, 완전한 구조의 유연성 또는 강도를 의도하는 바대로 변화시킴으로써 조절할 수 있으며, (i) 매우 유연한 부위 또는 구조적으로 단단한 부위에서 발견될 수 있고 (j) 상보성 결정 부위(CDR)에서 발견되거나 또는 발견되지 않는 잔기. 뿐만 아니라, Cx 프로그램[Pintar와 다수, *Bioinformatics*, 18, pp 980]을 사용하여 ABP 분자에 대해서 추가로 계산하여, 각 단백질 원자의 돌출 정도를 측정하였다. 결과적으로, 몇몇 구체예에서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 예를 들어, ABP의 하나 이상의 위치에서 치환된다.

실시예 2

[0689] 본 실시예는 이.콜라이 내에서 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP의 클로닝 및 발현에 대하여 기술되어 있다.

[0690] 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 ABP를 발현시키는데에 사용된다. 상기 O-RS는 바람직하게는 O-tRNA를 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 아미노아실화시킨다. 차례로, 코딩된 선택자 코돈에 대응하여, 번역 시스템은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 ABP에 삽입한다.

표 2

O-RS 및 O-tRNA 서열		
서열 1	엠.재너쉬 mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
서열 2	HLAD03: 최적화된 앰버 억제 tRNA	tRNA
서열 3	HL325A: 최적화된 AGGA 틀 이동 억제 tRNA	tRNA
서열 4	p-아지도-L-페닐알라닌 p-Az-PheRS(6)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 5	p-벤조일-L-페닐알라닌 p-BpaRS(1)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 6	프로파길-페닐알라닌 프로파길-PheRS의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 7	프로파길-페닐알라닌 프로파길-PheRS의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 8	프로파길-페닐알라닌 프로파길-PheRS의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 9	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(1)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 10	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(3)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS

서열 11	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(4)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 12	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(2)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 13	p-아세틸 페닐알라닌(LW1)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 14	p-아세틸 페닐알라닌(LW5)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 15	p-아세틸 페닐알라닌(LW6)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 16	p-아지도-페닐알라닌(AzPheRS-5)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS
서열 17	p-아지도-페닐알라닌(AzPheRS-6)의 삽입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소	RS

[0692]

이.콜라이를 변형된 ABP 유전자 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소/tRNA 쌍(목적 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 특이적)을 함유하는 플라스미드로 형질 전환 시키면, 비-천연적으로 코딩된 아미노산이 ABP에 위치 특이적으로 삽입된다. 0.01~100 mM의 특정 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 37°C의 배지 중에서 성장한 형질 전환된 이.콜라이는 고 신뢰도 및 고 효율로 변형된 ABP를 발현시킨다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 His-태깅된 ABP는 이.콜라이 숙주 세포에 의해 포유체 또는 응집체로서 생산된다. 응집체는 변성 조건하에서(6 M 구아니딘 HC1) 용해되어 친화성에 의해 정제된다. 리풀딩은 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 μM CuSO4 및 2%(w/v) 사코실 중 4°C에서 밤새도록 투석함으로써 수행된다. 이후 상기 물질들을 20mM TRIS-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 2mM CaCl2에 대해서 투석한 다음, 상기 His-태그를 제거한다. 문헌[Boisse1의 다수, (1993) 268:15983-93]을 참조하시오. ABP의 정제 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 그러한 방법에서는 SDS-PAGE, 웨스턴 블러트 분석법 또는 전기 분무-이온화 이온 포집 질량 분석 분광법 등을 통하여 결과를 확인한다.

[0693] 발현 구조물

[0694]

주변 세포질 scFv-108: EGFR-특이적 모노클로날 항체인 mAb108[본원에 참고용으로 인용되어 있는, 미국 특허 제 6,217,866호]의 가변부(VL 및 VH)를 효모 BGL2 (C7) 주변 세포질 리더 서열의 (GGGGS)₄ 링커 서열 하류와 함께 scFv 단편으로서 클로닝하였다. c-myc 항체 및 6X-His 태그에 의하여 인지된 에피토프 서열을 VL 영역의 하류에 클로닝하였다[Humphreys, DP외 다수 Protein Expr Purif. 2000 Nov;20(2):252-64]. 야생형 scFv-108 구조물과, VL 영역에 앰버 종결 코돈(TAG)을 함유하는 변이체(도 2의 패널 A)를 유도성 프로모터의 제어하에 있는 이.콜라이 발현 벡터 내에 클로닝하였다. 이 플라스미드는 또한 메타노코커스 재너쉬로부터 얻은 앰버 억제 티로신 tRNA^{Tyr/CUA} (Mj tRNA^{Tyr/CUA})를 구성적으로 발현시켰다. 앰버 종결 코돈의 위치를 표시하였다. 제조된 구조물을 서열 18(뉴클레오티드 서열) 및 서열 19(번역된 단백질 서열)에 나타내었다. 구조물을 이하 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 3

서열	위치(서열 18)
C7 리더	15~83
VH	84~446
GlySer 링커	447~506
VL	507~827
Myc	843~887
His	888~905
TAA	906~908

표 4

서열	위치(서열 19)
C7 리더	1~23
VH	24~144

[0696]

GlySer 링커	145~164
VL	165~276
Myc	277~291
His	292~297

[0697] 세포질 scFv-108: N-말단 MetGly-서열 및 6X-His 서열을 함유하는 VH-링커-VL(VH-GlySer-VL) 서열을 T7 프로모터의 제어하에 있는 밸현 벡터에 클로닝하였다(도 2의 패널 B 참조). 앰버 종결 코돈 및 PEG화된 잔기의 위치를 표시하였다. 제조된 구조물을 서열 20(뉴클레오티드 서열) 및 서열 21(번역된 단백질 서열)에 나타내었다. 구조물을 이하 표 5에 나타내었다.

표 5

서열	위치(서열 20)
His	3~26
VH	27~389
GlySer 링커	390~449
VL	450~767

[0699] Fab-108: mAb108의 VL 및 VH 서열을 pFT3 즉, g3(VL) 및 STII(VH) 주변 세포질 리더 서열, 그리고 인간 κ 불변부 및 CH1 영역을 코딩하는 플라스미드에 클로닝하였다. CH1 영역의 C-말단부는 6-His 태그를 함유하여 정제를 촉진시켰다. 앰버 돌연변이는 CH1 영역에 도입하였으며, 전체 이중 시스트론 카세트는 메타노코카스 재너쉬로부터 얻은 앰버 억제 티로실 tRNA^{Tyr/CUA}(Mj tRNA^{Tyr/CUA})를 구성적으로 밸현시키는 밸현 플라스미드에 클로닝하였다(도 2의 패널 C). Fab 단편의 VL 및 VH 영역을 번역시키는 2개의 샤인 엘가노 서열(SD)을 나타내었다. 제조된 구조물을 서열 22(뉴클레오티드 서열) 및 서열 23 및 24(Fab 108의 VL 카파 사슬; Fab108의 VH-CH1 사슬의 번역된 단백질 서열)에 나타내었다. 구조물을 이하 표 6에 나타내었다.

표 6

서열	위치(서열 22)
g3 리더	15~68
VL	81~416
K 사슬	432~755
STII 리더	788~856
VH	875~1237
CH1 영역	1247~1543
His	1544~1561

[0701] 주변 세포질 scFv-4D5: HER2-특이적 모노클로날 항체 mAb-4D5[Carter, P., et. al, Biotechnology (N Y). 1992 Feb;10(2):163-7]의 가변부(VL 및 VH)를 효모 BGL2(C7) 주변 세포질 리더 서열의 svFv 단편 하류로서 클로닝하였다. 6X-His 태그를 VL 서열(scFv-4D5-His; 도 2의 패널 D)의 C- 말단부, 또는 VH 영역(His-scFv-4D5; 도 2의 패널 E)의 N-말단부에 클로닝하였다. 야생형 scFv-4D5 구조물 및 GlySer 링커 영역 내에 존재하는 앰버 종결 코돈(TAG)을 함유하는 변이체를 메타노코카스 재너쉬로부터 얻은 앰버 억제 티로실 tRNA^{Tyr/CUA}(Mj tRNA^{Tyr/CUA})를 구성적으로 밸현하는 이.콜라이 밸현 벡터에 클로닝하였다. 제조된 6X-His C 말단 구조물을 서열 25(뉴클레오티드 서열) 및 서열 26(번역된 단백질 서열)에 나타내었다. 6X-His C 말단 구조물을 표 7에 나타내었고, 6X-His N 말단 구조물을 표 8에 나타내었다.

표 7

서열	단백질(서열 25)
C7 리더	15~83
VH	84~443
GlySer 링커	444~503
VL	504~824
His	825~848

표 8

서열	단백질(서열 27)
C7 리더	15~83
His	84~107
VH	108~470
GlySer 링커	471~530
VL	531~854

[0703]

Fab-4D5: mAb 4D5의 VL 및 VH 서열을 pFT3 즉, g3 및 STII 주변 세포질 리더 서열, 그리고 인간 κ 불변부 및 CH1 영역을 코딩하는 플라스미드에 서브클로닝한 후, 이것을 메타노코커스 재너쉬로부터 얻은 앰버 억제 티로실 tRNA^{Tyr/CUA}(Mj tRNA^{Tyr/CUA})를 구성적으로 발현시키는 발현 플라스미드에 클로닝하였다. 도 2의 패널 F는 Fab-4D5를 발현시키는데 사용된 시스트론을 나타낸다. 앰버 돌연변이를 Fab 4D5의 CH1 영역의 리신 139번 위치에 도입하였다. 이 리신은 Fab108의 K142에 해당한다. 중첩 PCR(overlapping PCR)로써 CH1 영역의 C-말단부에 존재하는 외부 시스테인 잔기(THTCAA)를 함유하는 Fab-4D5 구조물(Fab-4D5-cys)을 제조하였다. 제조된 구조물을 서열 29(뉴 클레오티드 서열) 및 서열 30 및 31(Fab 4D5의 VL 카파 사슬; Fab 4D5의 VH-CH1 사슬의 변역된 단백질 서열)에 나타내었다. 구조물을 이하 표 9에 나타내었다.

표 9

서열	위치
g3 리더	1~54
VL	67~386
K 사슬	403~726
STII 리더	759~827
VH	846~1205
CH1 영역	1215~1511
His	1512~1529

[0705]

발현/억제

[0707]

파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)를 이용한 억제: 업계에 공지된 표준적인 기술을 사용하여 이.콜라이 내 앰버 돌연변이를 억제하였다. 간단히 말하면, 이.콜라이 내 항체 단편(scFv 및 Fab)의 주변 세포질 억제를 위해, 발현 벡터 구조물을 엠. 재너쉬로부터 얻은 오르토고날 티로실-tRNA-합성효소(MjTyrRS)를 코딩하는 플라스미드와 함께 이.콜라이 숙주 세포로 형질 전환시켰다. 밤새 배양한 박테리아 배양액을 LB 배지(루리아-버테니) 또는 수퍼 브로쓰(Superbroth)를 함유하는 진탕 플라스크에서 1:100으로 희석시키고, 이를 37°C에서 OD 약 0.8이 될 때까지 성장시켰다. Fab 및 scFv 발현은 파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)을 최종 농도 4 mM이 될 때까지 첨가하여 앰버 코돈을 억제시켰을 때 유도되었다. 배양액을 25°C에서 밤새도록 항온 처리하였다. 야생형(앰버 코돈 흄결) scFv 및 Fab 단편(Fab-4D5-cys 포함)은 동일한 조건하에서 발현시켰다. 이와 유사한 방식으로 세포질 scFv 단편(도 2의 패널 B)을 발현/억제시켰다.

[0708]

aa9.2를 이용한 억제: 사용된 앤.재너쉬 유래 오르토고날 티로실-tRNA-합성효소(MjTyrRS)가 아미노산에 특이적이라는 점을 제외하고는, pAcF와 유사한 방식으로 pAcF(aa 9.2) 유도체를 이용하여 앰버 돌연변이를 억제하였다. 유도시 aa9.2(4 mM)를 첨가하여 억제시켰다.

[0709]

단백질 추출 및 정제

[0710]

세포를 원심 분리시키고, 100 ug/ml의 리소자임이 보강된 주변 세포질 방출 완충액(50 mM NaPO₄, 20% 수크로즈, 1mM EDTA, pH 8.0) 중에 재현탁시킨 다음, 얼음에서 30분 동안 항온 처리하여 세포를 수집하였다. 원심 분리 후, 상청액 중 항원 단편을 이것의 His 태그에 의해 ProBind 비드(Invitrogen; Carlsbad, CA) 상에 고정시키고, 이 비드를 결합 완충액으로 철저히 세척한 다음, 결합된 단편을 비드로부터 0.5 M 이미다졸과 함께 용리시켰다. 정제된 단편을 저장 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, 5% 수크로즈, pH 7.8) 중에서 투석시켰다. 세포질 내에 발현된 scFv 단편의 소규모 분석을 위하여, 15 ml의 배양액으로부터 얻은 이.콜라

이를 원심 분리시킨 후 다시 10 ug/ml의 DNase가 보강된 1 ml의 용해 완충액(B-PER, Pierce Biotechnology; Rockford, IL) 중에 재현탁시켜 수집하였다. 혼합물을 37°C에서 30 분 동안 항온 처리하고, 단백질 로딩 완충액 (Invitrogen; Carlsbad, CA) 중에서 1X 희석시킨 다음, SDS-PAGE로 분석하였다.

[0711] 도 3의 패널 A는 GlySer 링커의 제2 세린의 앰버 돌연변이(S131Am)의 억제 결과를 나타내는 것이고, 도 3의 패널 B는 상응하는 pAcF-함유 scFv의 정제 결과를 나타내는 것이다. 도 3의 패널 A에 나타낸 웨스턴 븍릿 분석 결과는, 세포가 LB 또는 수퍼브로쓰 배지 중에서 성장하였을 때, 앰버 종결 돌연변이를 억제하는데 pAcF가 필요하다는 사실을 입증하는 것이다. pAcF의 존재는 TAG 종결 코돈이 흡결된 scFv(WT scFv-108)의 발현에 영향을 미치지 않는다. 도 3의 패널 B는 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의한 pAcF-scFv 108-(S131)의 정제 결과를 나타내는 것이다. pAcF-함유 scFv의 산정된 수율은 1.5 mg/ l 였다. scFv 단편의 위치는 화살표 머리로 표시하였다. 쿠마쉬 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - scFv 대조구(1.7 ug); 래인 2 - IMAC 결합전(20 ul/70 ml); 래인 3 - 무 IMAC (20 ul/70 ml); 래인 4 - IMAC 용리(5 ul/1.3 ml); 래인 5 - NAP10 완충액 교환(10 ul/1.5 ml); 래인 6 - IMAC 비드 용리후; 래인 7 - scFv 대조구(3.4 ug).

[0712] scFv의 세포질 발현 동안의 VL 사슬(L156) 내의 앰버 돌연변이의 억제 결과를 도 4에 나타내었다. 수율은 1 l 의 이 콜라이 배양액 당 100 mg을 초과였으며, 종결 코돈의 억제는 pAcF의 존부에 절대적으로 의존적이었다. 전장 scFv는 화살표 머리로 표시하였다. 앰버 코돈에서 절단된 생산물은 ●로 표시하였다.

[0713] 항체 단편의 PEG화/이량체화 (1)

[0714] **PEG화:** 약 1mg의 pAcF-scFv-108 단백질을 반응 완충액(100 mM NaOAc, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4.0) 중에서 최종 부피 50ul가 될 때까지 농축시켰다. 반응 혼합물을 최종 부피 100ul에서 100배 몰 과량의 단일 작용성 (히드록실아민) 5 K PEG(반응 완충액 중에서 평형화됨)와 함께 28°C에서 32 시간 동안 항온 처리하였다. PEG화된 물질을 젤 전기 영동을 통해 평가한 다음, 이를 세포 결합 검정법에서 직접 사용하였다.

[0715] **이량체화:** 유사한 방법을 사용하여 pAcF-함유 scFv-108 단편을 이량체화시켰다. 간단히 말해서, 출발 pAcF-함유 scFv 단편을 반응 완충액 중 농도 > 5 ug/ul이 되도록 농축시킨 다음, 이중 작용성 히드록실아민-컨쥬게이트화 PEG 링커(364 Da)와 함께 항온 처리하였다. 미반응 PEG를 투석에 의해 제거하고, 여기에 pAcF-scFv 단편(1 몰의 단백질:단백질 당량)의 신선한 분취액을 혼합물에 첨가하였다. 이후 혼합물을 28°C에서 32 시간 동안 추가로 항온 처리하였다. 이량체를 20 mM의 아세트산나트륨(pH 4.0)으로 평형화시킨 양이온 교환 컬럼(SP-5PW)상에 로딩하고, NaCl 구배(0 → 0.4 M)를 걸어주면서 용리시켰다.

[0716] pAcF-scFv-108 단편의 PEG화 및 이량체화 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 패널 A는 pAcF-scFv-108-(L156) 및 pAcF-scFv-108-(S136)의 PEG화(5K) 및 pAcF-scFv-108-(S36)의 이량체화 결과를 나타내는 것이다. 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - pAcF-scFv-108-(L156) (5K PEG); 래인 2 - pAcF-scFv-108-(S136) (5K PEG); 래인 3 - pAcF-scFv-108-(S136) (364 da PEG) 링커의 이량체화; 래인 4 - pAcF-scFv-108-(S136)의 이량체화. 링커는 첫 번째 PEG화 반응에 의해 제거하였다. 단일-PEG화된 scFv 단편 및 scFv-108-(S136) 이량체의 위치는 단일 및 이중의 화살표 머리로 각각 표시하였다. 래인 4에서 이량체화가 일어나지 않은 것은, scFv가 문자간 이황화 결합 형성을 통해 커플링되지 않았음을 입증하는 것이다. 도 5의 패널 C는 PEG의 scFv 단편으로의 컨쥬게이트화가 pAcF의 존재에 절대적으로 의존적임을 나타낸다. WT scFv 단편은 PEG화가 일어나지 않았다. 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - WT scFv 108 대조구; 래인 2 - scFv WT, 반응 완충액 중, PEG 부재, 16 시간; 래인 3 - scFv WT + 5K PEG, 반응 완충액 중, 16 시간.

[0717] 도 6은 scFv 동종 이량체의 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 얻은 분획의 SDS PAGE 분석 결과를 나타낸다. 이중 작용성 히드록실아민 364 Da PEG 링커를 이용하여 pAcF-scFv108-(S131) 단편을 동종 이량체화 하였다. NaCl 구배(0 → 0.4 M)를 걸어주어 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 동안에 상이한 시점에서 분획을 취하였다. 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - 마커, 래인 2 - pAcF- scFv108(S131)-X-pAcF-scFv108(S131) 분획 #1, 래인 3 - pAcF-scFv108(S131)-X-pAcF-scFv108(S131) 분획 #2, 래인 4 - pAcF-scFv108(S131)-X-pAcF-scFv108(S131) 분획 #3.

[0718] 도 8의 패널 A는 pAcF 및 pAcF-PEG화된 Fab 단편의 SDS PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다. K142, T204, 및 K219에서 변형된 Fab-108 단편을 각각 나타내었으며, PEG화의 효율은 위치 특이적이다. pAcF-함유 Fab 단편의 PEG화는 히드록실아민 컨쥬게이트화된 5K PEG를 사용하여 수행되었다.

[0719] 도 10의 패널 A 및 B는 C-말단[pAcF-scFv-4D5-His (S133); 도 10의 패널 A] 또는 N-말단[pAcF-His-scFv-4D5(S139); 도 10의 패널 B] scFv-4D5 단편의 GlySer 링커 중 제2 세린 내에 발생한 앰버 돌연변이의 억제 결

과를 나타내는 것이다. scFv 단백질 발현은 5 시간 동안 또는 밤새도록(16 시간) 동안 0.02 %의 아라비노즈를 첨가함으로써 유도되었다. 앰버 돌연변이는 aa9.2(4 mM)를 함께 첨가함으로써 억제되었다. 억제된 생산물은 화살표 머리로 표시하였으며, 절단된 단백질은 ●로 표시하였다. 억제 수율은 50% 이상이었다(1.5 mg/l). scFv 108을 로딩한 대조구 래인(scFv-4D5보다 조금 더 높음)을 표시하였다(C).

[0720] Fab 단편인 pAcF-Fab-4D5-(K139) 및 Fab-4D5-cys을 동일한 방식으로 발현 및 정제하였다. 도 11의 패널 A는 환원 조건 및 비 환원 조건 하에서의 SDS-PAGE에 의한 시료 분석 결과를 나타내는 것이다. Fab 단편 수율은 다음과 같았다: pAcF-Fab-4D5-(K139), 0.37 mg/L/OD (최종 OD₆₀₀ = 3.14) 및 Fab-4D5-cys 0.23 mg/L/OD (최종 OD₆₀₀ = 3.26). 도 11의 패널 B는 도 11의 패널 A에 나타낸 시료(5 uL)의 웨스턴 븍렛(항 His 항체 사용) 결과를 나타내는 것이다. 비 환원 조건하에서 시료를 전개하였다. Fab-4D5-cys 구조물로부터 얻은 다량체 VH-CH1 복합체를 화살표로 나타내었다. pAcF-Fab-4D5-(K139)를 사용하였을 때에는 다량 복합체는 나타나지 않았다.

[0721] 항체 단편의 PEG화/이량체화 (2)

[0722] **PEG화:** 약 1mg의 pAcF-scFv-108 단백질을 원래의 반응 완충액(20 mM NaOAc, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4.0) 및 변성 반응 완충액(20 mM NaOAc, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 8 M 우레아, pH 4.0) 중에서 최종 부피 50 uL가 될 때까지 농축시켰다. 반응 혼합물을 최종 부피 100uL에서 100배 몰 과량의 단일 작용성 (히드록실아민) 5 K PEG(해당 반응 완충액 중에서 평형화됨)와 함께 28°C에서 32 시간 동안 항온 처리하였다. 16 시간 경과 후, 반응 혼합물을 SDS-PAGE로 평가한 후, 이를 세포 결합 검정법에 직접 사용하였다.

[0723] 변성 조건 하에서 링커, 중합체, 생물 활성 분자 또는 기타 분자와 폴리펩티드의 컨쥬게이트화는 하나 이상의 이점을 갖는다. 그러한 이점으로서는 예를 들어, 반응기의 개선된 접근 가능성으로 인한 보다 용이한 컨쥬게이트화, 컨쥬게이트화되지 않은 폴리펩티드에 비하여 컨쥬게이트화된 폴리펩티드의 보다 용이한 리풀딩, 및 비 변성 조건 하에서 적용 가능한 폴리펩티드 농도 보다 컨쥬게이트화에 대하여 보다 높은 농도로 폴리펩티드를 사용할 수 있는 능력을 포함한다. 변성 조건은 예를 들어, 폴리펩티드가 불안정하고 컨쥬게이트화 반응에 대해 고농도로 농축될 수 없는 경우에 바람직할 수 있다. 그러나, 변성 조건 하에서의 폴리펩티드 컨쥬게이트화는, 표준적인 시스테인계 컨쥬게이트화 화학 물질 예를 들어, 말레이미드 화학 물질, 또는 리신계 화학 물질 예를 들어, 말레이미드 화학 물질과 반응시 바람직하지 않고/않거나 의도로 하지 않은 폴리펩티드 내 하나 이상의 시스테인, 리신 또는 기타 아미노산과의 컨쥬게이트화 위치를 형성하게 된다. 이와 같이 바람직하지 않고/않거나 의도하지 않은 컨쥬게이트화 위치는 컨쥬게이트화된 폴리펩티드의 활성에 영향을 미친다. 다른 한편으로, 폴리펩티드 예를 들어, 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP는, 컨쥬게이트화 반응에 관여하는 반응기가 비 천연 코딩된 아미노산의 일부이므로, 변성 조건하에서 위치-특이적 방식으로 컨쥬게이트화될 수 있다. 그러므로, 변성 조건 하에서의 컨쥬게이트화에 따라서 얻어진 임의의 이점들은 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 사용함으로써 연구될 수 있다.

[0724] 도 5b는 PEG화된 pAcF-scFv-(S136) 및 대조구 시료의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다. 젤에는 다음과 같이 로딩시켰다: 래인 1 - pAcF-scFv-(S136); 래인 2 - pAcF-scFv-(S136), 28°C에서 16 시간 동안 항온 처리함; 래인 3 - pAcF-scFv-(S136), 5 K PEG, 28°C에서 16 시간 동안 항온 처리함, 원래의 조건; 래인 4 - pAcF-scFv-(S136), 5 K PEG, 28°C에서 16 시간 동안 항온 처리, 변성 조건. 화살표는 scFv 및 PEG화된 scFv를 나타낸다. 도 5c는 PEG의 scFv 단편에의 컨쥬게이트화가 pAcF의 존재에 절대적으로 의존적임을 나타내는 것이다. WT scFv 단편에서는 PEG화가 관찰되지 않았다. 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - WT scFv 108 대조구; 래인 2 - scFv WT, 반응 완충액 중, PEG 부재, 16시간; 래인 3 - scFv WT + 5K PEG3, 반응 완충액 중, 16 시간.

[0725] **후속 이량체화:** 간단히 말하면, scFv 단편을 함유하는 출발 pAcF를 반응 완충액 중에서 10 mg/mL 의 농도로 농축시킨 후, 이를 100배 과량의 이중 작용성 히드록실아민-컨쥬게이트화된 PEG 링커(364 Da)과 함께 항온 처리하였다. 반응 혼합물을 28°C에서 16 시간 동안 항온 처리하였다. 투석에 의하여 미반응 PEG를 제거하고, pAcF-scFv 단편(1 몰의 단백질:단백질 당량)의 신선한 분획액을 혼합물에 첨가하였다. 이후 혼합물을 28°C에서 32 시간 동안 추가로 항온 처리하였다. 도 13을 참조하시오. 이량체를 20 mM의 아세트산나트륨(pH 4.0)으로 평형화시킨 양이온 교환 컬럼(SP-5PW, 20 마이크론) 상에 로딩하고, NaCl 구배($0 \rightarrow 0.4 \text{ M}$)를 걸어주면서 용리시켰다.

[0726] 도 14의 패널 A 및 B는 이량체화 시료의 비 환원 및 환원 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 것이다. 젤에는 다음과 같이 로딩하였다: 래인 1 - 364 Da PEG 이중 작용성 링커와의 최종 scFv 이량체화 반응 혼합물; 래인 2 - 최종 scFv 이량체화 반응 대조구(364 Da PEG 이중 작용성 링커 부재); 래인 3 - scFv. 화살표는 scFv 이량체 및 scFv 단량체를 나타낸다. scFv 이량체는 이중 작용성 링커만이 존재할 때 합성되었다. 래인 2에서 이량체화가 일어나지 않았음은 scFv가 분자간 이황화 결합 형성을 통해 커플링되지 않았음을 입증하는 것이다. 환원 및 비

환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분석된 시료들 간에 차이점이 관찰되지 않았기 때문에, 이중 작용성 링커의 존재는 분자 간 이황화 결합 형성을 촉진시키지 않았음을 알 수 있었다.

[0727] **이량체 정제:** 강한 양이온 교환 컬럼(SP-5PW, 20 마이크론)을 사용하여 이량체화 반응 혼합물을 정제하였다. 완충액 A: 20 mM NaOAc, pH 4.0; 완충액 B: 20 mM NaOAc, 1 M NaCl, pH 4.0. scFv 이량체를 40% B에 용리시켰다. 정제된 이량체의 SDS PAGE 분석 결과(도 15)를 통하여, 하나의 컬럼이 정제된 후, 이량체의 순도는 약 90%였음을 알 수 있었다.

[0728] 본 발명의 이종-이중 작용성 ABP의 일례를 도 9에 나타내었다. 동일한 항원(예를 들어, ErbB2)의 상이한 에피토프에 결합하는 2 개의 상이한 항체 분자(예를 들어, 허셉틴(Herceptin) 및 옴니타그(Omnitarg))에 대하여 측정된 공자의 결정 구조를 바탕으로 하였을 때, 특이 아미노산 위치는 이 위치가 임의의 목적 선택 기준에 부합하는 존재하는 것으로 확인된다. 이러한 예에 있어서, 아미노산 위치에 대한 바람직한 선택 기준으로서는 각 분자상 하나 이상의 특이 아미노산 위치의 상대적 인접도를 포함한다. 이러한 아미노산 위치는 링커 분자를 이용하여 도 9에 나타낸 이종-이중 작용성 분자를 형성하는데 바람직할 수 있다. 이 기준에 맞는 각 분자상에 존재하는 특이 아미노산 위치를 이하 표 10에 나타내었으며, 이는 이종-이중 작용성 ABP를 형성하는데 사용될 수 있는 링커 분자의 경우와 같다. 당 업자는 이 목록이 결코 한정적인 것은 아니며 오로지 예시적인 것이라는 것과, 임의의 목적 선택 기준에 맞는 모든 아미노산 위치는 본 발명에 사용하는데 적당하다는 사실을 인식할 것이다. 본 발명의 비 천연 아미노산은 각 분자 내 위치들 중 하나 이상의 위치에서 치환되어, 링커 결합용으로서 이용되는 화학적 작용기를 제공할 수 있다. 다양한 기타 선택 기준은 또한 목적 기준 예를 들어, 동일하거나 상이한 분자간 인접성, 형태 변화 조절, ABP 또는 ABP에 결합된 분자 사이의 거리 조절, 링커 길이 또는 형태, 표면 노출, 리간드 결합 특성의 조절, 수용체 이량체화의 조절 등에 맞는 아미노산 위치를 확인하는데 사용될 수도 있다.

표 10

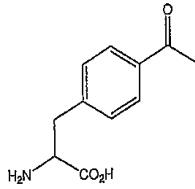
유효 결합 위치 (허셉틴 중쇄 - 페투즈맵 경쇄)	거리(Å)
Asn211-Asp28	15.4
Asn211-Gly68	15.8
Asn211-Ser30	15.8
Asn211-Ser67	17.8
Lys213-Asp28	18.0
Asn211-Thr69	18.1
Lys213-Gly68	18.2
Lys208-Ser30	19.2
Lys213-Thr69	20.1
Lys208-Ser67	20.6
Lys213-Asp70	21.8
Thr123-Tyr92	24.9
Ser122-Tyr92	26.2
Gln13-Tyr92	27.9

[0730] HIV-1 중화 인간 Fab 4E10과 HIV gp41 env 단백질의 상호 작용을 바탕으로 하여, 특이 아미노산 위치는 임의의 바람직한 선택 기준에 맞는 것으로 확인된다. 이러한 예에 있어서 아미노산 위치에 대한 바람직한 선택 기준으로서는 T-20 웨პ티드의 Fab로의 컨쥬게이트화에 사용될 잔기를 포함하며, 이로써 4E10의 상보성 결정 부위(CDR)가 gp41에 결합하는 경우 및 인지하는 경우, 악영향을 끼치지 않고 T-20과 gp41이 결합하게 된다. T-20(DP-178이라고도 함)은 바이러스 융합 억제제로서 작용함으로써 HIV가 세포에 도입하는 것을 억제한다. 도 12는 인간 Fab 4E10과 모의 g41 웨პ티드를 중화시키는 HIV를 나타내는 것이다. T-20 웨პ티드의 결합용으로서 유효한 잔기를 나타내었다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 삽입에 유효한 잔기로서는 예를 들어, Gln64--Fab의 중쇄; Glu1--Fab의 경쇄, 및 Gln27--Fab의 경쇄를 포함한다. 당 업자는, 상기 나열은 결코 한정적인 것이 아니며, 오로지 예시를 위한 것이고, 바람직한 선택 기준에 맞는 모든 아미노산 위치는 본 발명에 사용하기에 적당하다는 사실을 인식할 것이다. 기타 다양한 선택 기준은 또한 목적 기준 예를 들어, 동일하거나 또는 상이한 분자 사이의 인접성, 형태 변화 조절, ABP 또는 ABP에 결합하는 분자 사이의 거리 조절, 링커의 포유, 링커 길이 또는 형태, 표면 노출 여부, 리간드 결합 특성의 조절, 수용체 이량체화의 조절 등과 같은 기준에 맞는 아미노산 위치를 확인하는데 이용될 수 있다.

[0731] 실시예 3

[0732] 본 실시예는 카보닐-함유 아미노산의 도입 및 아미노옥시-함유 PEG와의 후속 반응을 설명한다.

[0733] 본 실시예는 케톤-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산(추후 분자량 약 5,000인 아미노옥시-함유 PEG와 반응하는 아미노산)을 삽입시키는 항원-결합 폴리펩티드의 생산 방법에 관하여 기술한다. 실시예 1의 기준에 따라서 확인된 잔기는 각각 다음의 구조를 갖는 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 독립적으로 치환된다:

[0734]

[0735] p-아세틸페닐알라닌을 ABP에 위치-특이적으로 삽입시키는데 사용되는 서열을 전술한 실시예 2에서와 같이 서열 1[mtt tRNA, 엠. 재너쉬 mtRNA^{Tyr}_{CUA}] 및 서열 13, 14 또는 15[TyrRS LW1, 5, 또는 6]에 나타내었다.

[0736] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 ABP 변이체는 다음의 구조를 갖는 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응한다.

[0737] R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

[0738] [식 중, R은 메틸이고, n은 3이며, N은 대략 5,000 MW임]

[0739] p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 ABP를 25 mM의 MES(Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6.0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0, 또는 10 mM 아세트산나트륨(Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 10 mg/ml로 용해시키고, 10~100배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 이를 실온에서 10~16 시간 동안 교반하였다[Jencks, W. J. *Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475]. 이후 PEG-ABP를 신속한 정제 및 분석을 위해 적당한 완충액으로 희석시켰다.

[0740] 실시예 4

[0741] 아미드 결합을 통하여 PEG에 결합된 히드록실아민 기로 이루어진 PEG와의 컨쥬게이트화.

[0742] 다음의 구조를 갖는 PEG 시약을 실시예 3에 기술된 방법에 따라서 케톤-함유 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 커플링시켰다.

[0743] R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-O-NH₂

[0744] [식 중, R = 메틸이고, n=4이며, N은 대략 20,000 MW임].

[0745] 반응, 정제 및 분석 조건은 실시예 3에 기술된 바와 같다.

[0746] 실시예 5

[0747] 본 실시예는 2개의 뚜렷한 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 ABP에 도입시키는 것에 관하여 기술되어 있다.

[0748] 본 실시예는 실시예 1에 따라서 확인된 2개의 위치에 케톤 작용기를 포함하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 삽입시키는 항원-결합 폴리펩티드의 생산 방법을 기술하고 있는데, 여기서, X*는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 나타낸다. 항원-결합 폴리펩티드는 실시예 1 및 실시예 2에 기술된 바와 같이(단, 억제 코돈이 핵산 내부의 2개의 뚜렷한 위치에 도입되는 점은 제외) 제조된다.

[0749] 실시예 6

[0750] 본 실시예는 항원-결합 폴리펩티드의 히드라지드-함유 PEG에의 컨쥬게이트화 및 후속 시험관 내 환원에 관하여 기술하고 있다.

[0751] 카보닐-함유 아미노산이 삽입되어 있는 항원-결합 폴리펩티드는 실시예 2 및 3에 기술된 방법에 따라서 제조된다. 일단 변형되면, 다음의 구조를 갖는 히드라지드-함유 PEG는 ABP에 컨쥬게이트화된다.

[0752] R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-X-NH-NH₂

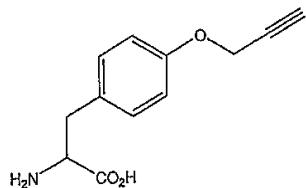
[0753] [식 중, R = 메틸이고, n=2이며 N = 10,000 MW이고 X는 카보닐(C=O) 기임]

[0754] p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 ABP를 25 mM의 MES(Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6.0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0, 또는 10 mM 아세트산나트륨(Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5에 0.1~10 mg/ml로 용해시키고, 1~100배 과량의 히드라지드-함유 PEG와 반응시킨 다음, 1M의 NaCNBH₃(Sigma Chemical, St. Louis, MO)의 스톡을 첨가하여 상응하는 히드라존을 시험관 내에서 환원시킨 후, 이를 H₂O에 용해시켜 최종 농도가 10~50 mM이 되도록 만들었다. 반응은 4°C의 실온에서 18~24 시간 동안 암실에서 수행하였다. 여기에 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 약 7.6)를 첨가하여 최종 Tris 농도가 50 mM 되도록 만들어 반응을 중지시키거나 또는 이를 적당한 완충액으로 희석시켜 신속하게 정제할 수 있도록 준비하였다.

[0755] 실시예 7

[0756] 본 실시예는 알킨-함유 아미노산을 ABP에 도입시키는 방법과 이 아미노산을 mPEG-아지드로 유도체화하는 방법에 관하여 기술한다.

[0757] 실시예 1에 따라서 확인된 잔기들 중 임의의 것을 다음과 같은 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하였다.



[0758]

[0759] p-프로파길-티로신의 위치-특이적 삽입화에 이용된 서열은 상기 실시예 2에 기술되어 있는 서열 1(mut tRNA, 엠.재너쉬 mtRNA^{Tyr}_{CUA}) 및 서열 6, 7 또는 8이다. 프로파길 티로신을 함유하는 항원-결합 폴리펩티드는 이.콜라 이에서 발현되고, 실시예 3에 기술된 조건을 이용하여 정제된다.

[0760] 프로파길-티로신을 함유하는 정제 ABP를 PB 완충액[100 mM 인산 나트륨, 0.15 M NaCl, pH = 8] 중 0.1~10 mg/ml로 용해시키고, 10~1000배 과량의 아지드-함유 PEG를 반응 혼합물에 첨가하였다. 이후 촉매량의 CuSO₄ 및 Cu 와이어를 반응 혼합물에 첨가하였다. 이 혼합물을 항온 처리한 후[예를 들어, 실온 또는 37°C에서 약 4 시간, 또는 4°C에서 밤새도록], H₂O를 첨가하고, 그 혼합물을 투석막을 통해 여과하였다. 실시예 3에 기술된 방법과 유사한 방법으로 이 시료에 첨가가 일어났는지 여부에 대하여 분석할 수 있다.

[0761] 본 실시예에서, PEG는 다음의 구조를 가질 것이다.

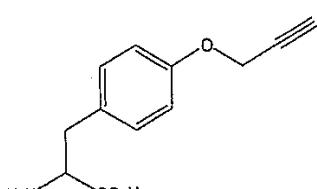
[0762] R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-N₃

[0763] [식 중, R = 메틸이고, n=4이며 N = 10,000 MW임]

[0764] 실시예 8

[0765] 본 실시예는 ABP 중 큰 소수성의 아미노산을 프로파길 티로신으로 치환하는 것에 관하여 기술하고 있다.

[0766] ABP 서열 내에 존재하는 Phe, Trp 또는 Tyr 잔기는 실시예 7에 기술된 바와 같이 이하의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다.



[0767]

[0768] 일단 변형되면, PEG는 알킨-함유 아미노산을 포함하는 ABP 변이체에 결합된다. 상기 PEG는 다음의 구조를 가질 것이며, 커플링 방법은 실시예 7에 기술된 방법에 따른다.

[0769] Me-PEG(N)-O-(CH₂)₂-N₃

[0770] 이로써, 천연 발생되며 큰 소수성의 아미노산 중 하나와 대략 등전자성인 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하고, 폴리펩티드 내에 명확한 위치에서 PEG 유도체로 변형된 ABP 변이체가 제조될 것이다.

[0771] 실시예 9

[0772] 본 실시예는 하나 이상의 PEG 링커에 의하여 분리된 ABP 동종 이량체, 이종 이량체, 동종 다량체 또는 이종 다량체의 제조에 관하여 기술하고 있다.

[0773] 실시예 7에서 제조된 알킨-함유 ABP 변이체는 이종 작용성 PEG 유도체와 반응하여 다음의 것을 형성하고, 2개의 ABP 분자가 PEG에 의해 물리적으로 분리되어 있는 해당 ABP 동종 이량체를 생산한다.

[0774] N₃-(CH₂)_n-C(O)-NH-(CH₂)₂-O-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)-(CH₂)_n-N₃

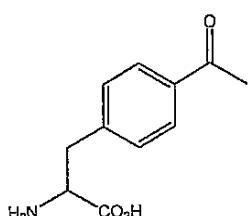
[0775] [식 중, n은 4이고 PEG의 평균 분자량은 약 5,000임]

[0776] 유사한 방식으로, 항원-결합 폴리펩티드는 하나 이상의 기타 폴리펩티드와 커플링되어 이종 이량체, 동종 이량체 또는 이종 다량체를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 7 및 실시예 3에 기술된 바와 같이 수행할 것이다.

[0777] 실시예 10

[0778] 본 실시예는 당 부위를 ABP에 커플링하는 방법에 관하여 기술한다.

[0779] ABP의 하나 이상의 아미노산 잔기는 실시예 3에 기술된 바와 같이, 다음의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다.



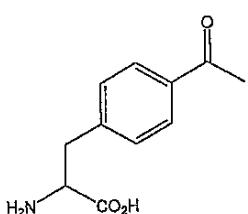
[0780]

[0781] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 ABP 변이체는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 β-결합 아미노옥시 유사체와 반응한다. ABP 변이체(10 mg/ml) 및 아미노옥시 당(21 mM)을 수성 아세트산 나트륨 완충액(pH 5.5) 100 mM 중에서 혼합하여, 이를 7~26 시간 동안 37°C에서 항온 처리한다. 당-컨쥬게이트화 ABP(5 mg/ml)와 UDP-갈락토즈(16 mM), 그리고 β-1,4-갈라시토실 전이효소(0.4 유닛/ml)를 150 mM HEPES 완충액(pH 7.4) 중에서 48 시간 동안 상온에서 항온 처리하여, 제2의 당을 제1의 당에 효소적으로 커플링시킨다[Schanbacher와 다수. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5057-5061].

[0782] 실시예 11

[0783] 본 실시예는 PEG화된 ABP 길항체의 제조에 관하여 기술한다.

[0784] 하나 이상의 ABP 아미노산 잔기는 실시예 3에 기술되어 있는 바와 같이 이하의 비-천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다.



[0785]

[0786] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 ABP 변이체는 다음의 구조를 갖는 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응하여, 폴리펩티드 내에 존재하는 단일의 위치에서 PEG 유도체로 변형된 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP 길항제를 생성할 것이다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 3에서와 같이 수행된다.

[0787] R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

[0788] [식 중, R은 메틸이고, n은 4이며, N의 MW는 20,000임]

[0789] 실시예 12

[0790] ABP 분자가 직접적으로 결합되어 있는 ABP 동종 이량체, 이종 이량체, 동종 다량체 또는 이종 다량체의 제조.

[0791] 알킨-함유 아미노산을 포함하는 ABP 변이체를 아지도-함유 아미노산을 포함하는 다른 ABP 변이체와 직접 커플링 시킬 수 있으며, 이들은 각각 예를 들어, 실시예 10에 기술된 바와 같은 위치에 비-천연적으로 코딩된 아미노산 치환부를 포함한다. 이로써, 2개의 ABP 변이체가 물리적으로 연결되어 있는 해당 ABP 동종 이량체를 생산할 것이다. 유사한 방식으로, 항원-결합 폴리펩티드는 하나 이상의 기타 폴리펩티드와 커플링되어 이종 이량체, 동종 다량체 또는 이종 다량체를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 3, 실시예 6 및 실시예 7에서와 같이 수행된다.

[0792] 실시예 13

[0793] PEG-OH + Br-(CH₂)_n-C≡CR' → PEG-O-(CH₂)_n-C≡CR'



[0795] 폴리알킬렌 글리콜(P-OH)은 할로겐화알킬(A)과 반응하여 에테르(B)를 생성한다. 이 화합물에서, n은 1~9의 정수이고, R'는 직쇄 또는 분지쇄의 포화 또는 불포화 C1~C20 알킬 또는 헤테로알킬 기일 수 있다. R'는 또한 C3~C7의 포화 또는 불포화 고리형 알킬 또는 고리형 헤테로 알킬, 치환 또는 비치환 아릴 또는 헤테로아릴 기, 또는 치환 또는 비치환 알크아릴(여기서 알킬은 C1~C20 포화 또는 불포화 알킬임) 또는 헤테로알크아릴 기일 수 있다. 통상적으로, PEG-OH는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜(mPEG)로서, 분자량은 800~40,000 달톤(Da)이다.

[0796] 실시예 14

[0797] mPEG-OH + Br-CH₂-C≡CH → mPEG-O-CH₂-C≡CH

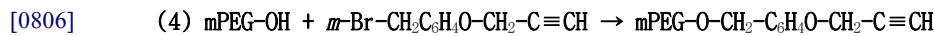
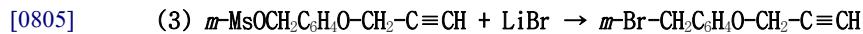
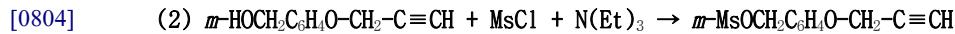
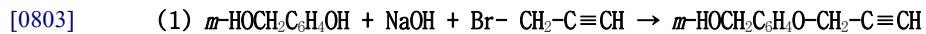
[0798] 분자량 20,000 Da인 mPEG-OH(mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g, 0.1 mmol, 썬바이오)를 THF(35 mL)중 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리하였다. 이후 자일렌(0.56 mL, 5 mmol, 50 당량, Aldrich) 중 80 중량% 용액으로서 용해시킨 브롬화프로파길 용액과, 촉매량의 KI를 상기 용액에 첨가하고, 결과로 생성된 혼합물을 2시간 동안 가열 환류시켰다. 이후 진공 하에서 물(1 mL)을 첨가하고 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH₂Cl₂(25 mL)를 첨가하여 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 부피를 약 2 mL까지 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 디에틸 에테르(150 mL)에 적가하였다. 결과로 생성된 침전물을 수집한 다음, 수 부의 냉 디에틸 에테르로 세척하고 건조시킨 결과, 프로파길-0-PEG가 생성되었다.

[0799] 실시예 15

[0800] mPEG-OH + Br-(CH₂)₃-C≡CH → mPEG-O-(CH₂)₃-C≡CH

[0801] 분자량 20,000 Da인 mPEG-OH(mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g, 0.1 mmol, 썬바이오)를 THF(35 mL)중 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리하였다. 이후 50 당량의 5-브로모-1-펜틴(0.53 mL, 5 mmol, Aldrich)과 촉매량의 KI를 상기 용액에 첨가하였다. 결과로 생성된 혼합물을 16 시간 동안 가열 환류시켰다. 이후 진공 하에서 물(1 mL)을 첨가하고 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH₂Cl₂(25 mL)를 첨가하여 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 부피를 약 2 mL까지 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 디에틸 에테르(150 mL)에 적가하였다. 결과로 생성된 침전물을 수집한 다음, 수 부의 냉 디에틸 에테르로 세척하고 건조시킨 결과, 해당 알킨이 생성되었다. 5-클로로-1-펜틴은 유사한 반응에서 사용될 수 있다.

[0802] 실시예 16

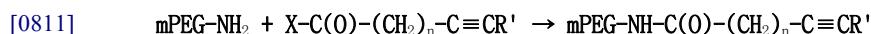


[0807] 우선, THF (50 mL) 및 물(2.5 mL) 중 3-히드록시벤질알콜(2.4 g, 20 mmol)의 용액에 분말화된 수산화나트륨 (1.5 g, 37.5 mmol)을 첨가한 후, 자일렌(3.36 mL, 30 mmol) 중 80 중량% 용액으로서 용해시킨 브롬화 프로파길 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 6 시간 동안 가열 환류시켰다. 이 혼합물에 10% 시트르산(2.5 mL)을 첨가하고, 진공 하에서 용매를 제거하였다. 잔류물을 아세트산에틸로 추출하고(3 x 15 mL) 합하여진 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척한 다음, MgSO₄로 건조시키고 농축한 결과, 3-프로파길옥시벤질 알콜이 생성되었다.

[0808] 염화 메탄설포닐(2.5 g, 15.7 mmol) 및 트리에틸아민(2.8 mL, 20 mmol)을 0°C에서 CH₂Cl₂ 중 화합물 3(2.0 g, 11.0 mmol) 용액에 첨가하고, 반응물을 16 시간 동안 냉장실에 넣어두었다. 통상의 작업을 수행한 결과, 담황색 오일인 메설레이트를 얻었다. 이 오일(2.4 g, 9.2 mmol)을 THF (20 mL) 중에 용해시키고 LiBr(2.0 g, 23.0 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 가열 환류시킨 다음, 실온으로 냉각시켰다. 진공 하에서 이 혼합물에 물(2.5 mL)을 첨가하여 용매를 제거하였다. 잔류물을 아세트산에틸(3 x 15 mL)로 추출하고 합하여진 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척한 다음, 이를 무수 Na₂SO₄로 건조시켜 농축한 결과, 목적으로 하는 브롬화물이 얻어졌다.

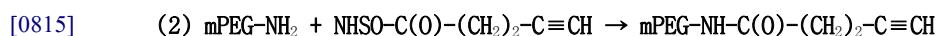
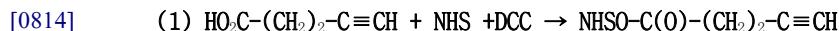
[0809] 20 kDa의 mPEG-OH(1.0 g, 0.05 mmol, 썬바이오)를 THF (20 mL)에 용해시키고, 이 용액을 얼음 조에서 냉각시켰다. NaH(6 mg, 0.25 mmol)를 수 분간 격렬하게 교반하면서 첨가한 다음, 여기에 전술한 바와 같이 얻어진 브롬화물(2.55 g, 11.4 mmol)과 촉매량의 KI를 첨가하였다. 냉각 조를 없애고 결과로 생성된 혼합물을 12 시간 동안 가열 환류시켰다. 진공 하에서 이 혼합물에 물(1.0 mL)을 첨가하고 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH₂Cl₂(25 mL)를 첨가하여 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 부피를 약 2 mL까지 감소시켰다. 이를 에테르 용액(150 mL)에 적가한 결과, 흰색 침전물이 생성되었으며, 이를 수집하였더니 PEG 유도체가 얻어졌다.

실시예 17



[0812] 말단 알킨-함유 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체는 또한 말단 작용기를 함유하는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체를, 전술한 바와 같이 n이 1~10인 알킨 작용기를 함유하는 반응 분자에 커플링시킴으로써 제조될 수 있다. R'는 H 또는 작은 알킬기(C1~C4)이다.

실시예 18



[0816] 4-펜티논산(2.943 g, 3.0 mmol)을 CH₂Cl₂(25 mL)에 용해시켰다. N- 히드록시숙신이미드(3.80 g, 3.3 mmol)와 DCC(4.66 g, 3.0 mmol)를 첨가한 다음, 용액을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 결과로 생성된 미정제 NHS 에스테르 7을 추가의 정제 없이 후속 반응에 사용하였다.

[0817] 분자량 5,000 Da인 mPEG-NH₂(mPEG-NH₂, 1 g, 썬바이오)를 THF(50 mL) 중에 용해시키고, 혼합물을 4°C로 냉각시켰다. NHS 에스테르 7(400 mg, 0.4 mmol)을 격렬하게 교반하면서 일부분씩 첨가하였다. 온도를 실온으로 가온하면서 이 혼합물을 3 시간 동안 교반시켰다. 이후 진공 하에서 물(2 mL)을 첨가하고 용매를 제거하였다. 이 잔류물에 CH₂Cl₂(50 mL)를 첨가하여 유기층을 분리한 후, 이를 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 부피를 약 2 mL까지 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 에테르 용액(150 mL)에 적가하였다. 그 결과, 침전물이 얻어졌으며, 이를 진공 상태에서 건조시켰다.

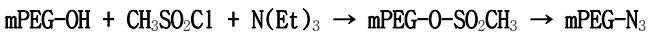
[0818]

실시예 19

[0819]

본 실시예는 폴리(에틸렌 글리콜)의 메탄 살포닐 에스테르의 제조 방법을 나타내는 것으로서, 이는 또한 폴리(에틸렌 글리콜)의 살포산 메탄 또는 메실레이트라고도 칭하여 질 수 있다. 해당 토실레이트 및 할로겐화물은 유사한 방법으로 제조될 수 있다.

[0820]



[0821]

톨루엔 150 mL 중 mPEG-OH(MW = 3,400, 25 g, 10 mmol)를 질소 하에서 2 시간 동안 공비 증류한 다음, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 무수 CH₂Cl₂ 40 mL와 무수 트리에틸아민(15 mmol) 2.1 mL를 이 용액에 첨가하였다. 용액을 얼음 조에서 냉각시킨 다음, 여기에 증류 염화 메탄살포닐(15 mmol) 1.2 mL를 적가하였다. 용액을 실온 및 질소 하에서 밤새도록 교반시킨 다음, 반응물을 무수 에탄올 2 mL를 첨가하여 반응을 급랭시켰다. 혼합물을 진공하에서 증발시켜 용매(이때, 용매는 주로 톨루엔 이외의 것들임)를 제거하였으며, 이를 진공 하에서 여과시키고 다시 농축한 다음, 디에틸 에테르 100 mL 중에서 침전시켰다. 여과액을 냉각 디에틸 에테르 수 부로 세척한 다음, 이를 진공 상태에서 건조시킨 결과 메실레이트가 얻어졌다.

[0822]

메실레이트(20 g, 8 mmol)를 THF 75 mL 중에 용해시키고 그 용액을 4°C로 냉각하였다. 냉각된 용액에 나트륨 아지드(1.56 g, 24 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 질소 하에서 2 시간 동안 가열 환류하였다. 이후 용매를 증발시키고 잔류물을 CH₂Cl₂(50 mL)로 희석시켰다. 유기 분급물을 NaCl 용액으로 세척하고 무수 MgSO₄로 건조시켰다. 이후 부피를 20 mL로 감소시킨 후, 여기에 냉각 무수 에테르 150 mL를 첨가하여 생산물을 침전시켰다.

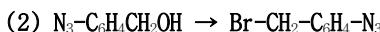
[0823]

실시예 20

[0824]



[0825]



[0826]



[0827]

4-아지도벤질 알콜은 미국 특허 제 5,998,595 호(본원에 참고용으로 인용됨)에 개시된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 염화 메탄살포닐(2.5 g, 15.7 mmol) 및 트리에틸아민(2.8 mL, 20 mmol)을 0°C에서 CH₂Cl₂ 중 4-아지도벤질 알콜 용액(1.75 g, 11.0 mmol)에 첨가하고, 반응물을 16 시간 동안 냉장실에 넣어두었다. 통상의 작업을 수행한 결과, 담황색 오일인 메실레이트를 얻었다. 이 오일(9.2 mmol)을 THF (20 mL) 중에 용해시키고, 여기에 LiBr(2.0 g, 23.0 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 가열 환류시킨 다음, 실온으로 냉각시켰다. 진공 하에서 이 혼합물을 물(2.5 mL)을 첨가하여 용매를 제거하였다. 잔류물을 아세트산에틸(3 x 15 mL)로 추출하고, 합하여진 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척한 다음, 이를 무수 Na₂SO₄로 건조시켜 농축한 결과, 목적으로 하는 브롬화물이 얻어졌다.

[0828]

20 kDa의 mPEG-OH (2.0 g, 0.1 mmol, 썬바이오)를 THF (35 mL) 중 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리한 다음, 이 혼합물에 브롬화물(3.32 g, 15 mmol)과 촉매량의 KI를 첨가하였다. 결과로 생성된 혼합물을 12 시간 동안 가열 환류하였다. 진공 하에서 이 혼합물에 물(1.0 mL)을 첨가하고 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH₂Cl₂(25 mL)를 첨가하여 유기층을 분리한 후, 무수 Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 부피를 약 2 mL까지 감소시켰다. 여기에 에테르 용액 (150 mL)을 적가한 결과, 침전물이 생성되었으며, 이를 수집하였더니 mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃가 얻어졌다.

[0829]

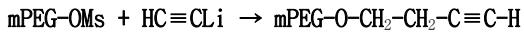
실시예 21

[0830]



[0831]

NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H(MW 3,400 Da, 2.0 g)를 NaHCO₃(10 mL)의 포화 수용액에 용해시키고, 이 용액을 0°C로 냉각시켰다. 프로피온산 3-아지도-1-N-히드록시숙신이미도(5 당량)를 격렬하게 교반하면서 첨가하였다. 3 시간 경과 후, H₂O 20 mL를 첨가한 다음, 그 혼합물을 실온에서 45분 동안 더 교반하였다. 0.5 N H₂SO₄로 pH를 3으로 맞추고, NaCl을 약 15 중량%인 농축물에 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(100 mL x 3)로 추출하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시켜 농축하였다. 냉각 디에틸 에테르로 침전시킨 후, 생산물을 여과에 의해 수집하여 진공 하에서 건조시킨 결과, 오메가-카르복시-아지드 PEG 유도체를 얻었다.

[0832] 실시예 22

[0834] 당 업계에 공지된 바와 같이 제조되어 THF 중에서 -78°C로 냉각시킨 리튬 아세틸리드(4 당량) 용액에 THF 중에 용해시킨 mPEG-OMs 용액을 격렬하게 교반하면서 적가하였다. 3 시간 경과후, 반응물을 실온으로 승온시키고, 여기에 부탄올 1ml를 첨가하여 급냉시켰다. 이후 H₂O 20ml를 첨가하고 혼합물을 실온에서 45분 동안 더 교반하였다. 0.5 N H₂SO₄로 pH를 3으로 맞추고, NaCl을 약 15 중량%인 농축물에 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(100 ml x 3)로 추출하고, Na₂SO₄로 건조시켜 농축하였다. 냉각 디에틸 에테르로 침전시킨 후, 생산물을 여과에 의해 수집하여 진공 하에서 건조시킨 결과, 1-(부트-3-이닐옥시)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG)을 얻었다.

[0835] 실시예 23

[0836] 문현[L. Wang와 다수, (2001), *Science* 292:498-500, J.W. Chin와 다수, *Science* 301:964-7 (2003)), J. W. Chin와 다수, (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *Chem Bio Chem* 11:1135-1137; J. W. Chin와 다수(2002), *PNAS United States of America* 99:11020-11024: 및 L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-10]에 개시된 방법을 이용하여 아지드- 및 아세틸-함유 아미노산을 단백질에 위치-특이적으로 삽입시켰다. 일단 아미노산을 삽입시키고, 2 mM PEG 유도체, 1 mM CuSO₄, 및 약 1 mg의 Cu-와이어의 존재하에 37°C에서 4 시간 동안, 인산염 완충액(PB) 중 0.01 mM 단백질(pH 8)과 함께 고리 첨가 반응을 수행하였다.

[0837] 실시예 24

[0838] 본 실시예는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 ABP 및 PEG화된 ABP의 활성을 시험관 내 및 생체 내에서 측정하는 방법에 관하여 기술한다.

[0839] 세포 결합 검정법

[0840] 세포(3×10^6)를 0°C에서 90분 동안, 다양한 농도(부피: 10μl)의 비 표지화 ABP, ABP 또는 음성 대조구의 부재 또는 존재하, 그리고 ¹²⁵I-ABP(약 100,000 cpm 또는 1 ng)의 존재하에, PBS/1% BSA (100 μl) 중에서 2가지로 항온 처리하였다(총 부피: 120 μl). 이후 350 μl 들이 플라스틱 원심 분리 튜브 내에서 세포를 재현탁시키고, 200 μl의 얼음 냉각 FCS에 총을 형성한 다음, 이를 원심 분리시켰다(1000 g; 1 분). 튜브의 끝 부분을 컷 오프(cut off)시켜 펠렛을 수집하고, 이 펠렛과 상청액을 각각 감마 카운터(Packard)에서 계측하였다.

[0841] 특이적 결합량(cpm)은, 경쟁 물질 부재하에서의 총 결합량(2가지 경우의 중간치) - 100배 과량의 비 표지화 ABP의 존재하에서의 결합량(cpm)(비 특이적 결합량)을 측정하였다. 비 특이적 결합량은 사용된 세포 유형의 각각에 대해서 측정하였다. 각각 다른 날에 동일한 ¹²⁵I-ABP 제제를 사용하여 실험을 수행하였으며, 이때에는 내부적으로 일관성을 가져야만 한다. 결합은 비 표지화 천연 ABP 또는 ABP에 의하되, 음성 대조구에 의하지는 않도록, 투여량 의존 방식으로 억제된다. ABP가 천연 ¹²⁵I-ABP의 결합에 대해 경쟁하는 능력은 수용체가 두가지 형태를 균등하게 인식한다는 사실을 시사한다.

[0842] scFv-108을 이용한 결합 검정법에 있어서, A431 세포를 수집한 다음, 이를 트립신으로 처리하고, FACS 완충액 (PBS, 2% FBS, 0.01% NaN₃) 중에 재 현탁시킨 다음, 96-웰 둥근 바닥 미세 역가판에 접종하였다(3×10^5 세포/웰). 세포를 상이한 농도의 야생형 또는 pAcF-함유 scFv-108 단편과 함께 30분 동안 얼음 상에서 항온 처리하였다. 미결합 scFv 단백질을 세척하여 제거한 다음, 원심 분리(2~3 회 반복)시켰다. 이후 세포를 7.5 nM(EC₅₀) 농도에서 mAb-108(ATCC # HB 9764)과 함께 30 분 동안 항온 처리하였다. 2회 세척한 다음, 세포를 APC-표지된 (알로피코시아닌) 항마우스 항체(10 ug/ml)와 함께 30분 동안 얼음 상에서 항온 처리하였다. 이 세포를 2회 세척하여 2차 항체를 제거한 다음, 그 세포를 프로피odium 요드(0.5 ug/ml)로 보강한 FACS 완충액 중에 재현탁한 후, 유동 혈구 계측법으로 분석하였다. Fab-108을 이용하는 결합 검정법에 있어서, 세포를 scFv-108 검정법에서 사용되는 것과 동일한 조건 하에서 다량의 Fab-108로 항온 처리하였다. Fab 결합 여부는 항-His 항체 → ABP-표지된 항마우스 2차 항체를 이용하여 검출하였다.

[0843]

도 7의 패널 A~C는 EGF 수용체 발현 A431 세포에 대한 p-아세틸-페닐알라닌(pAcF) 함유 scFv 단백질, 또는 pAcF 보유 PEG, 그리고 WT scFv의 경쟁적 결합 곡선을 나타내는 것이다. 세척 후 세포를 다양한 농도의 scFv 단백질과 함께 항온 처리하여 미결합 scFv를 제거하고, 이 세포는 전술한 바와 같이 mAb108로 처리하였다. 모든 단백질은 주변 세포질에서 발현되었다. 이하 표 11에는 야생형 scFv에 대한 변형 scFv(pAcF, 및 pAcF와 PEG)의 결합 결과를 요약하였다.

표 11

표 11	
scFv 108	IC50
WT	1x (8.1 nM)
Ser131pAcF	1.3x
Ser131pAcF-5K PEG	5.0x
Ser136pAcF	1.6x
Ser136pAcF-5K PEG	6.3x
His144pAcF	2.6x
Leu156pAcF	1.8x
Leu156pAcF-5K PEG	2.9x
Tyr190pAcF	2.1x
Ser193pAcF	1.8x
Lys248pAcF	2.1x
Ser259pAcF	0.5x

[0844]

[0845]

도 8의 패널 B~D는 EGF 수용체 발현 A431 세포에 대한 pAcF 또는 pAcF-PEG-함유 Fab-108 단편 및 WT Fab의 결합 여부를 나타내는 것이다. Fab 단편의 PEG화 결과 EGF 수용체에 대한 단편의 친화성이 최소한으로 감소하였음을 알 수 있다. 야생형 Fab의 결합량에 상대적인 변형 Fab 단편의 결합량을 이하 표 12에 나타내었다. 결합 조건은 이미 서술한 바와 같았다.

표 12

표 12	
Fab108	EC50
WT	1x (4.0 nM)
Lys142pAcF	1.7x
Lys142pAcF-5K PEG	2.8x
Thr204pAcF	1.7x
Thr204pAcF-5K PEG	1.8x
Lys 219pAcF	2.0x

[0846]

[0847]

PEG화된 ABP의 생체 내 연구

[0848]

PEG-ABP, 비변형 ABP 및 완충 용액을 마우스 또는 래트에 투여하였다. 그 결과, 본 발명의 PEG화된 ABP는 비변형 ABP에 비하여 활성이 보다 월등하고 반감기도 늘어날 것이다.

[0849]

컨쥬게이트화된 ABP 및 컨쥬게이트화되지 않은 ABP 및 이들의 변이체의 생체 내 반감기 측정

[0850]

수컷 스프라그 돌리 래트(약 7주령)를 사용하였다. 투여 당일, 각 동물의 체중을 측정하였다. 체중 1 kg당 100 µg씩, 컨쥬게이트화되지 않은 ABP 및 컨쥬게이트화된 ABP 시료를 각각 3마리 래트의 꼬리 정맥에 정맥 내 주사하였다. 주사 후 1분, 30분, 1, 2, 4, 6 및 24 시간 경과시, CO₂ 마취하에 각 래트로부터 500 µl씩의 혈액을 채혈하였다. 혈액 시료를 실온에 1시간 30분 동안 보관한 다음, 원심 분리(4°C, 18000 xg, 5분 동안)에 의하여 혈청을 분리하였다. 분석일까지 혈청 시료를 -80°C에 보관하였다. 활성 ABP의 혈청 시료 중 양은 이 시료를 얼음 상에서 해동시킨 다음 ABP 시험관 내 활성 검정법을 수행하여 정량하였다.

[0851]

실시예 31

[0852]

비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 ABP의 안전성 및/또는 효능에 대한 인간 임상 실험

[0853]

목적 : 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 재조합 인간 ABP를 피하 투여하였을 때의 안전성 및 약물 동력학적 특성을, 시판중인 제품[동일한 표적 항원에 특이적인 것으로서, 예를 들어, Herceptin(등록상표), Bexxar(등록상표), Campath(등록상표), CEA-Scan(등록상표), Enbrel(등록상표), Erbitux(등록상표), Humira(등록상표), Myoscint(등록상표), Prostascint(등록상표), Raptiva(등록상표), Remicade(등록상표), ReoPro(등록상표), Rituxan(등록상표), Simulect(등록상표), Synagis(등록상표), Verluma(등록상표), Xolair(등록상표), Zenapax(등록상표), Zevalin(등록상표), 또는 Avastin(등록상표)]과 비교하기 위함.

[0854]

환자 : 연령이 20~40 세 사이이고 체중이 60~90 kg인 건강한 자원자 18명을 본 연구에 참여시켰다. 환자들은 혈액학 또는 혈청 화학, 및 음성 소변 독성 스크리닝, HIV 스크리닝 및 B형 간염 표면 항원에 대해서 임상학적으로 상당히 비정상인 수치를 나타내지 않을 것이다. 이 환자들은 다음과 같은 소견들 중 임의의 것을 나타내어서는 안된다: 즉, 고혈압; 1차 혈액학적 질환력; 간, 신장, 심혈관, 위장, 비뇨 생식기, 대사, 신경 질환력; 빈혈 또는 발작 질환의 병력; 박테리아 또는 포유 동물 유래 생성물, PEG 또는 인간 혈청 알부민에 대한 알려진 감응 반응; 카페인 함유 음료의 습관성 및 중독성 섭취; 연구 개시 전 30일 이내에 다른 임상 실험에 참여하였거나 수혈 또는 헌혈한 경우; 연구 개시 전 3개월 이내에 ABP에 노출된 경우; 연구 개시 전 7일 이내에 앓았을 경우; 연구 개시 전 14일 이내에 연구 전 신체 검사 또는 임상 실험 평가에서 상당한 비정상 소견을 보인 경우. 환자 모두는 안전성에 대해 평가받을 수 있으며, 약물 동력학적 분석을 위한 혈액 수집률 모두는 예정대로 수집하였다. 모든 연구는 연구 윤리 위원회의 승인과 환자들의 동의를 얻어 수행하였다.

[0855]

연구 계획 : 본 연구는 건강한 남성 지원자에 있어서 제1의 단일 중심, 개방형인 임의의 2기 교차 연구로서 수행될 것이다. 18명의 환자들을 2개의 치료군 중 하나의 군에 무작위로 나누었다(9 명/군). 2회의 개별 투여 기간에 걸쳐 ABP를 투여하였다[비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 ABP 및 시판중인 제품 중 임의의 것을 동량으로 이용하여 상부 대퇴부에 일정 용량으로 피하 주사함]. 시판중인 제품을 투여하는 횟수 및 투여량은 포장 라벨에 적혀있는 대로 한다. 환자의 추가 군을 포함시켜 시판중인 제품을 사용할 때와 같이 추가 투여하고, 이때와 동일한 투여 횟수 또는 기타 매개 변수를 본 연구에 적용할 수 있다. 각 투여 기간의 중간 중간에는 14일씩의 워시 아웃(washout) 기간을 둔다. 2회의 각 투여 기간 동안 즉, 투여 전 12일 이상 동안, 그리고 투여 후 72 시간 동안(투여 기간 사이는 제외), 환자들을 연구 센터에 집합시켰다. PEG화된 ABP에 대해서 추가 투여, 투여 횟수 또는 기타 매개 변수들을 테스트할 경우, 환자의 추가 군을 더할 수 있다. ABP의 실험 제형은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 ABP이다.

[0856]

채혈 : ABP 투여 전과 투여 후에 직접 정맥에 구멍을 뚫어 연속적으로 혈액을 채취하였다. 혈청 ABP 농도 측정 용 정맥혈 시료(5 ml)는 투여 전 약 30분, 20분 및 10 분 경과시에 수집하고(3개의 기준 시료), 투여 후에는 다음과 같은 시점에서 수집하였다: 30분, 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 및 72 시간. 각 혈청 시료를 2개의 분취액으로 나누었다. 모든 혈청 시료는 -20°C에 보관하였다. 혈청 시료를 드라이 아이스 위에 놓았다. 1일 경과시 초기 투여 직전에 단식 임상 실험 테스트(혈액학적 분석, 혈청 화학적 분석 및 소변 분석)를 수행하고, 4일 경과시, 16일 경과시 투여 직전에, 그리고 19일 경과시(아침)에 각각 모니터하였다.

[0857]

생물 분석학적 방법 : 혈청 ABP 농도를 측정하기 위해서 방사성 면역 분석법(RA) 또는 ELISA 키트법을 이용한다.

[0858]

안전성 측정 : 각 투여 직전(1일 및 16일)에, 그리고 각 투여 후 6, 24, 48 및 72 시간 경과시에 활력 증후를 기록하였다. 안전성 측정은 부작용의 발생 및 그 유형과, 임상 실험 테스트 결과의 (기준치로부터 발생한) 변화를 바탕으로 하였다. 뿐만 아니라, 활력 증후 예를 들어, 혈압 및 신체 검사 결과와 예비 연구 결과와의 차이점을 평가하였다.

[0859]

데이터 분석 : 투여 후 각각의 수치로부터 평균 기준 ABP 농도[투여 전 30, 20 및 10 분 경과시 수집한 3개의 시료로부터 ABP 수치를 평균하여 측정]를 공제함으로써, 투여 후 혈청 농도 수치를 투여 전 기준 ABP 농도에 대해 보정하였다. 농도가 검정법의 정량 수치 이하일 경우, 투여 전 혈청 ABP 농도는 평균 수치의 계산에 포함시키지 않았다. 기준 ABP 농도에 대해 보정된 혈청 농도 데이터로부터 약물 동력학적 매개 변수를 측정하였다. Digital Equipment Corporation VAX 8600 컴퓨터 시스템[BIOAVL 소프트웨어 최신판 사용] 상에서 모델에 상관 없이 독립적인 방법으로써 약물 동력학적 매개 변수를 계산하였다. 다음과 같은 약물 동력학적 매개 변수를 측정하였다: 피크 혈청 농도(C_{\max}); 시간 대 피크 혈청 농도(t_{\max}); 선형 사다리꼴 규칙(linear trapezoidal rule)을 이용하여 계산된, 0 시간 → 최후 채혈 시간(AUC₀₋₇₂)에 걸친 농도-시간 곡선 아래의 면적(AUC); 및 소멸률 상수로부터 계산한 최종 소멸 반감기($t_{1/2}$). 상기 소멸률 상수는 로그-선형 농도-시간 그래프의 최종 선형 영역

에서의 연속적 데이터 포인트를 선형 회귀법으로 측정하였다. 약물 동력학적 매개 변수의 평균, 표준 편차(SD) 및 변동 계수(CV)는 각 처리에 대해서 계산한다. 매개 변수 평균값의 비율(보존적 제형/비보존적 제형)을 계산하였다.

[0860] 안전성 결과: 부작용은 치료군 전반에 걸쳐 균등하게 발생하였다. 기준 또는 예비 연구 임상 실험 테스트 또는 혈압은 임상학적으로 상당한 정도로 변하지는 않았으며, 예비 연구시 신체 검사 결과 및 활력 증후 측정치 역시 눈에 띌 정도로 변하지는 않았다. 2개의 치료 군에 대한 안전성 프로필은 유사하게 나타났다.

[0861] 약물 동력학적 결과: 측정된 각 시점마다, 동일한 표적 항원에 특이적인 하나 이상의 시판 제품이 1회 투여된 18명의 환자 모두에 있어서의 평균 혈청 ABP 농도-시간 프로필(기준 ABP 수치에 대해 보정하지 않음)을 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 ABP와 비교하였다. 모든 환자의 투여 전 기준 ABP 농도는 정상적인 생리 범위 내이어야 한다. 투여 전 평균 기준 ABP 농도에 대해 보정된 혈청 데이터로부터 약물 동력학적 매개 변수를 측정하고, C_{max} 및 t_{max} 를 측정하였다. 임상학적 비교물에 대한 평균 t_{max} 는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 ABP에 대한 t_{max} 보다 짧았다. 테스트된 시판 ABP 제품의 최종 반감기 수치는, 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 ABP의 최종 반감기 수치에 비하여 상당히 짧았다.

[0862] 비록 본 연구는 건강한 남성 환자에 대하여 수행되었지만, 다른 환자 집단 예를 들어, 남성 또는 여성 암 환자 또는 만성 신장 이상 환자, 소아 신장 이상 환자, 자가 이식 예치 프로그램 수행중인 환자, 또는 예정 수술 스케줄이 잡혀있는 환자에서도 유사한 흡착 특성 및 안전성 프로필이 기대된다.

[0863] 결과적으로, 피하 투여된 단일 투여량의 PEG화 ABP(비-천연적으로 코딩된 아미노산 포함)는 안전하며, 건강한 남성 환자는 이를 잘 견뎌낼 것이다. 부작용 발생, 임상 실험 수치, 활력 증후 및 신체 검사 결과의 비교 결과를 바탕으로 하였을 때, 시판중인 ABP 및 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 ABP의 안전성 프로필은 균등할 것이다. 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 ABP는 환자 및 건강 관리 제공자에게 매우 유익한 임상적 수단을 제공한다.

[0864] 본원에 기술된 실시예 및 구체예는 오로지 예시적 목적의 것으로서 설명되었으며, 당 업자는 본원의 사상과 첨부된 청구항의 범위 내에서 여기에 변형 및 변화를 가할 수 있음을 이해하여야 한다. 본원에 인용된 모든 공보, 특히 및 특히 출원은 그 자체로서 참고 문헌으로서 첨부되어 있는 것이다.

본 발명의 부가적 및 대안적 구체예

[0866] 1. 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드.

[0867] 2. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0868] 3. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0869] 4. 제3항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 수용성 중합체에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0870] 5. 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 이중 작용성 중합체, 이중 작용성 링커 또는 하나 이상의 부가적 항원-결합 폴리펩티드에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0871] 6. 제5항에 있어서, 상기 이중 작용성 링커 또는 중합체는 제2 폴리펩티드에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0872] 7. 제6항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드는 항원-결합 폴리펩티드인 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0873] 8. 제6항에 있어서, 상기 제2 폴리펩티드는 비 항원-결합 폴리펩티드인 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0874] 9. 제4항에 있어서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0875] 10. 제5항에 있어서, 상기 이중 작용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분인 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0876] 11. 제4항에 있어서, 상기 수용성 중합체는 상기 항원-결합 폴리펩티드에 존재하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0877] 12. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 수용성 중합체에 결합

되어 있는 2 이상의 아미노산을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0878] 13. 제12항에 있어서, 상기 수용성 중합체에 결합되어 있는 하나 이상의 아미노산은 비-천연적으로 코딩된 아미노산인 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0879] 14. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 ABP 수용체 또는 항원에 대한 항원-결합 폴리펩티드의 친화성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 하나 이상 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0880] 15. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 항원-결합 폴리펩티드의 안정성, 재조합 숙주 세포 내 또는 시험관 내 합성시 발현 수준, 면역원성, 프로테아제 내성, 조직 또는 기관 특이성, 또는 가용성을 조절하는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0881] 16. 제1항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 폴리펩티드 내 20개의 공통 아미노산 중 임의의 것에 대하여 미 반응성이 립커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 대하여 반응성이 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0882] 17. 제1항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아미노옥시기, 히드라진기, 히드라지드기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0883] 18. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0884] 19. 제18항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0885] [식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환 알킬 또는 치환 아릴이며; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환 알킬 및 치환 아릴이고; R₃는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이며; R₄는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0886] 20. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 아미노옥시기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0887] 21. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 히드라지드기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0888] 22. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 히드라진기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0889] 23. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 세미카바지드기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0890] 24. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 아지드기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0891] 25. 제24항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0892] [식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환 알킬, 치환 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S 또는 존재하지 않고; m은 0~10이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이고; R₃는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0893] 26. 제17항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 알킨기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0894] 27. 제26항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는 것인 항원-결합 폴리펩티드.

[0895] [식 중, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환 알킬 또는 치환 아릴이며; X는 O, N, S 또는 존재하지 않고; m은 0~10이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 아미노 말단 변형 기이고; R₃는 H, 아미노산, 폴리펩티드 또는 카르복시 말단 변형 기임]

[0896] 28. 제4항에 있어서, 상기 수용성 중합체의 분자량은 약 0.1~약 100 kDa인 것인 항원-결합 폴리펩티드.

- [0897] 29. 제28항에 있어서, 상기 수용성 중합체의 분자량은 약 0.1~약 50 kDa인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0898] 30. 제4항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 수용성 중합체를 반응시킴으로써 제조되는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0899] 31. 제30항에 있어서, 상기 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 기는 아미드 결합을 통하여 수용성 중합체에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0900] 32. 제4항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 카보닐기를 포함하는 수용성 중합체와, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 반응시킴으로써 제조되는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0901] 33. 제4항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 알킨-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와, 아지드 부분을 포함하는 수용성 중합체를 반응시킴으로써 제조되는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0902] 34. 제4항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 아지드-함유 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드와, 알킨 부분을 포함하는 수용성 중합체를 반응시킴으로써 제조되는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0903] 35. 제17항에 있어서, 상기 아지드 또는 알킨 기는 아미드 결합을 통하여 수용성 중합체에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0904] 36. 제4항에 있어서, 상기 수용성 중합체는 분지형 또는 다중 분지형 중합체인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0905] 37. 제36항에 있어서, 수용성 중합체의 각 분지의 분자량은 약 1~100 kDa인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0906] 38. 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 항원-결합 폴리펩티드 길항체인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0907] 39. 제38항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 번역 후 변형, 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0908] 40. 제39항에 있어서, 상기 중합체는 수용성 중합체 및 폴리(에틸렌 글리콜)로 이루어진 군으로부터 선택된 부분을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0909] 41. 제1항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 당 부분을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0910] 42. 제3항에 있어서, 상기 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 당 부분을 통하여 폴리펩티드에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0911] 43. 엄격한 조건하에서 항원-결합 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 핵산으로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하는 것인 핵산.
- [0912] 44. 제43항에 있어서, 상기 선택자 코돈은 앰버 코돈, 오커 코돈, 오펠 코돈, 특이 코돈, 희귀 코돈 및 4 염기 코돈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 분리된 핵산.
- [0913] 45. 제3항에 있어서, 상기 방법은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 분리된 항원-결합 폴리펩티드를 비-천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 부분을 포함하는 링커, 중합체, 또는 생물 활성 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드의 제조 방법.
- [0914] 46. 제45항에 있어서, 상기 중합체는 수용성 중합체 및 폴리(에틸렌 글리콜)로 이루어진 군으로부터 선택되는 부분을 포함하는 것인 방법.
- [0915] 47. 제45항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아미노옥시기, 히드라지드기, 히드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하는 것인 방법.
- [0916] 48. 제45항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐 부분을 포함하고, 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 부분을 포함하는 것인 방법.
- [0917] 49. 제48항에 있어서, 상기 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드 또는 세미카바지드 부분은 아미드 결합을 통하여 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있는 것인 방법.
- [0918] 50. 제45항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 알킨 부분을 포함하고 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 아지드 부분을 포함하는 것인 방법.

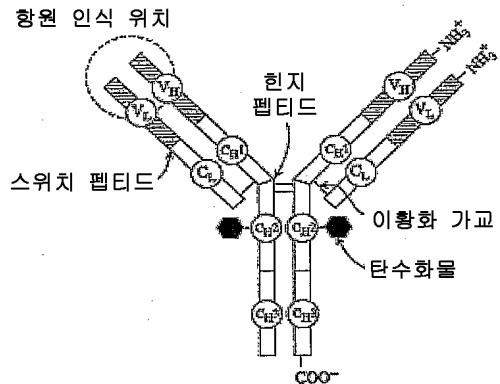
- [0919] 51. 제45항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 아지드 부분을 포함하고 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 알킨 부분을 포함하는 것인 방법.
- [0920] 52. 제47항에 있어서, 상기 아지드 또는 알킨 부분은 아미드 결합을 통하여 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있는 것인 방법.
- [0921] 53. 제46항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 평균 분자량이 약 0.1~약 100 kDa인 것인 방법.
- [0922] 54. 제46항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 부분은 분지형 또는 다중 분지형 중합체인 것인 방법.
- [0923] 55. 제1항의 항원-결합 폴리펩티드와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0924] 56. 제55항에 있어서, 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 결합되어 있는 것인 조성물.
- [0925] 57. 환자에게 제55항의 조성물을 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, ABP에 의하여 조절되는 질환을 앓는 환자를 치료하는 방법.
- [0926] 58. 제43항의 핵산을 포함하는 세포.
- [0927] 59. 제58항에 있어서, 상기 세포는 오르토고날 tRNA 합성효소 또는 오르토고날 tRNA를 포함하는 것인 세포.
- [0928] 60. 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 조건 하에서, 선택자 코돈을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드, 오르토고날 RNA 합성효소 및 오르토고날 tRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하는 세포를 배양하는 단계; 및 상기 항원-결합 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0929] 61. 항원-결합 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 항원-결합 폴리펩티드에서 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 1 이상의 임의의 천연 발생 아미노산으로 치환하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0930] 62. 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 항원-결합 폴리펩티드로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 선택자 코돈을 포함하고, 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0931] 63. 제62항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 링커, 중합체, 수용성 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0932] 64. 제63항에 있어서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0933] 65. 제62항에 있어서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아미노옥시기, 히드라지드기, 히드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0934] 66. 제64항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량이 약 0.1~약 100 kDa인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0935] 67. 제64항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 부분이 분지형 또는 다중 분지형 중합체인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0936] 68. 제67항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량이 약 1~약 100 kDa인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0937] 69. 제62항의 항원-결합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0938] 70. 제1 ABP와 제2 ABP가 서로 결합되어 있는 이중특이적 ABP로서, 상기 제1 ABP 및 제2 ABP는 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하고, 상기 제1 ABP는 제1 항원 상에 존재하는 하나 이상의 에피토프에 대하여 결합 특이성을 가지며, 상기 제2 ABP는 상기 제1 에피토프와 상이하고 제1 항원 또는 제2 항원 상에 존재하는 제2 에피토프에 대하여 결합 특이성을 가지고, 상기 이중특이적 ABP는 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 것인 이중특이적 ABP.
- [0939] 71. 제70항에 있어서, 상기 제1 ABP 및 상기 제2 ABP는 링커에 의하여 결합되어 있는 것인 이중특이적 ABP.
- [0940] 72. 제71항에 있어서, 상기 링커는 웹티드 링커인 것인 이중특이적 ABP.

- [0941] 73. 제72항에 있어서, 상기 링커는 단백 분해 절단 위치가 흡결되어 있는 펩티드 링커인 것인 이중특이적 ABP.
- [0942] 74. 제70항에 있어서, 상기 제1 ABP는 단일 사슬 ABP이고, 상기 제2 ABP는 단일 사슬 ABP이며, 상기 제1 ABP는 상기 제2 ABP에 펩티드 링커에 의하여 커플링되어 있는 것인 이중특이적 ABP.
- [0943] 75. 제70항의 이중특이적 ABP와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0944] 76. 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 그러한 치료가 필요한 환자에게 제75항의 조성물을 약학적으로 허용가능한 양으로 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0945] 77. 생물 활성 분자에 커플링되어 있는 제70항의 이중특이적 ABP를 포함하는 ABP.
- [0946] 78. 제77항에 있어서, 상기 생물 활성 분자는 세포 독소, 표지, 방사성 핵종, 약물, 리포좀, 리간드 및 ABP로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 ABP.
- [0947] 79. 제77항에 있어서, 상기 ABP는 융합 단백질인 것인 ABP.
- [0948] 80. 하나 이상의 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 검출가능한 표지와 결합되어 있는 제70항의 ABP를 세포 또는 조직과 접촉시키는 단계; 및 상기 표지를 검출하는 단계로서, 세포 또는 조직과 결합한 상기 표지를 검출하는 것은 ABP에 의해 결합되어 있는 하나 이상의 항원을 발현하는 세포 또는 조직이 존재함을 나타내는 것인 단계를 포함하는 방법.
- [0949] 81. 제80항에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 감마 방사체, 양전자 방사체, MRI 표지 및 형광 표지로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0950] 82. 제80항에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 감마 방사체이고 상기 검출 단계는 감마 카메라로 이미지 형성하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0951] 83. 제80항에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 양전자 방사체이고, 상기 검출 단계는 양전자 방사 단층 촬영(PET)으로 이미지 형성하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0952] 84. 제80항에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 MRI 표지이고, 상기 검출 단계는 자기 공명 이미지화로 검출하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0953] 85. 단일 아미노산에서 공유 결합에 의하여 항원-결합 폴리펩티드에 결합되어 있는 수용성 중합체를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드.
- [0954] 86. 제85항에 있어서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0955] 87. 제85항에 있어서, 상기 수용성 중합체에 공유 결합되어 있는 아미노산은 비-천연적으로 코딩된 아미노산인 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0956] 88. 하나 이상의 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드로서, 상기 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자는 리보좀에 의하여 폴리펩티드에 삽입된 비-천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통하여 폴리펩티드에 결합되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0957] 89. 제88항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 모노PEG화된 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0958] 90. 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산에 결합되어 있는 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함하는 항원-결합 폴리펩티드로서, 상기 비-천연적으로 코딩된 아미노산은 리보좀에 의하여 폴리펩티드의 미리 선택한 위치에 삽입되어 있는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0959] 91. 제90항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 하나의 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자를 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0960] 92. 제1항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 이 항원-결합 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 하나 이상의 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0961] 93. 항원-결합 폴리펩티드의 면역원성을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 항원-결합 폴리펩티드에서 하나 이상의 비-천연적으로 코딩된 아미노산을 하나 이상의 천연 발생 아미노산으로 치환하는 단계를 포함하는 방법.
- [0962] 94. 제43항에 있어서, 상기 분리된 핵산은 서열 18, 20, 22, 25, 27 및 29 또는 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 분리된 핵산.

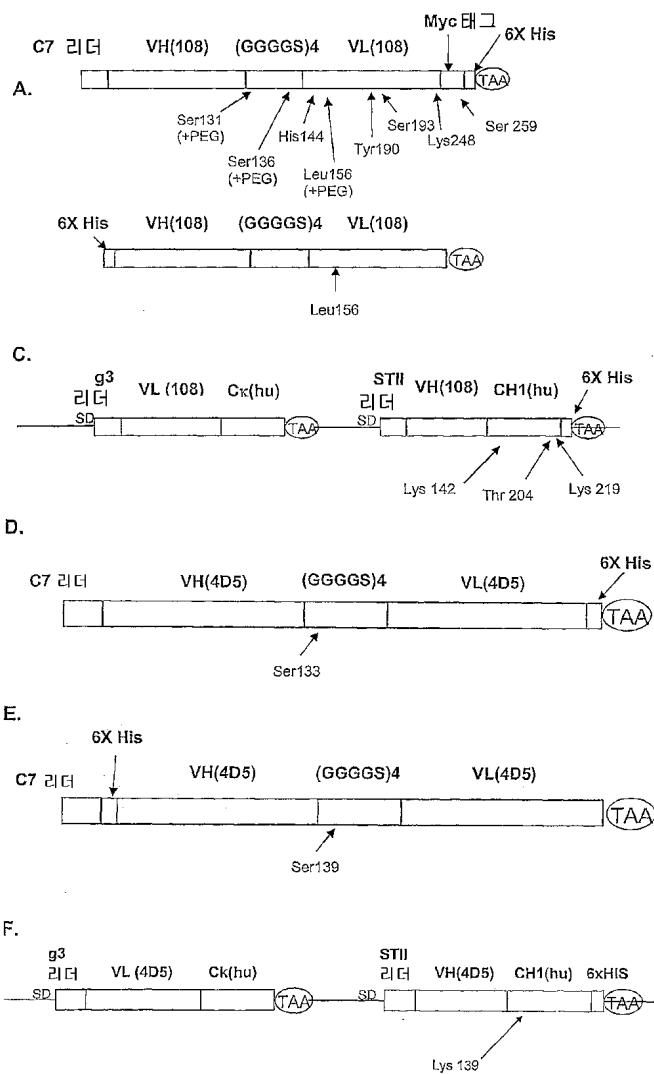
- [0963] 95. 폴리펩티드가 서열 19, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 31 또는 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항원-결합 폴리펩티드.
- [0964] 96. 제3항에 있어서, 상기 항원-결합 폴리펩티드는 변성 조건 하에서 링커, 중합체 또는 생물 활성 분자에 결합되어 있는 것인 항원-결합 단백질.

도면

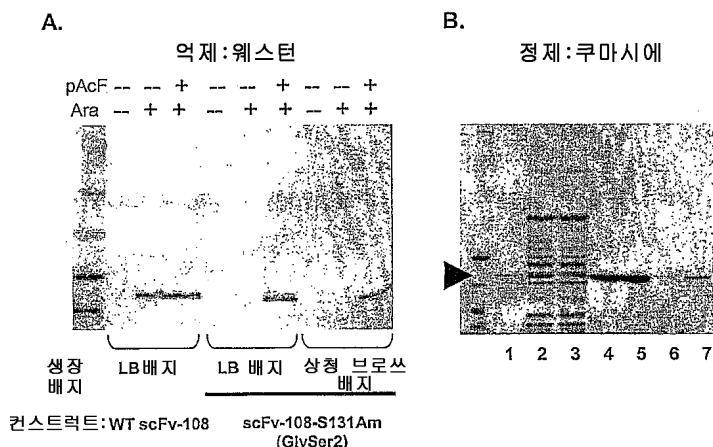
도면1



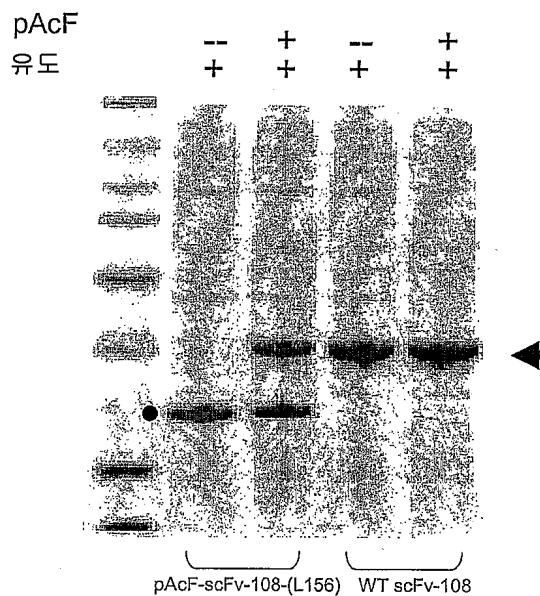
도면2



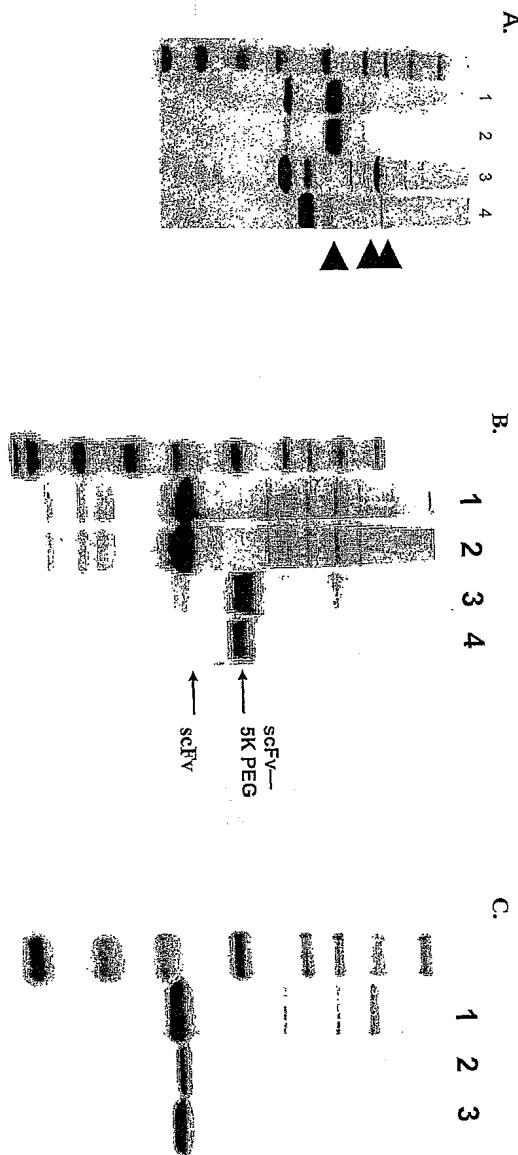
도면3



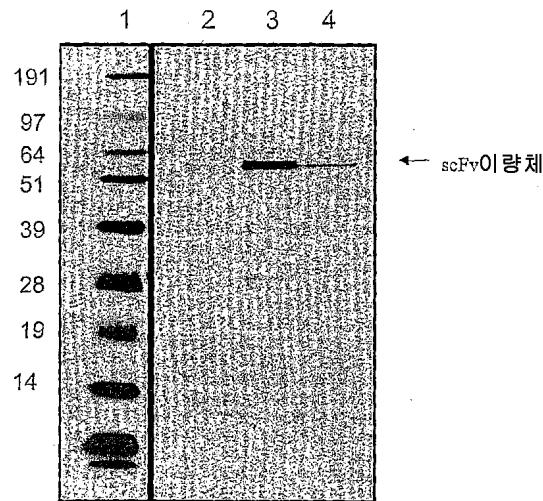
도면4



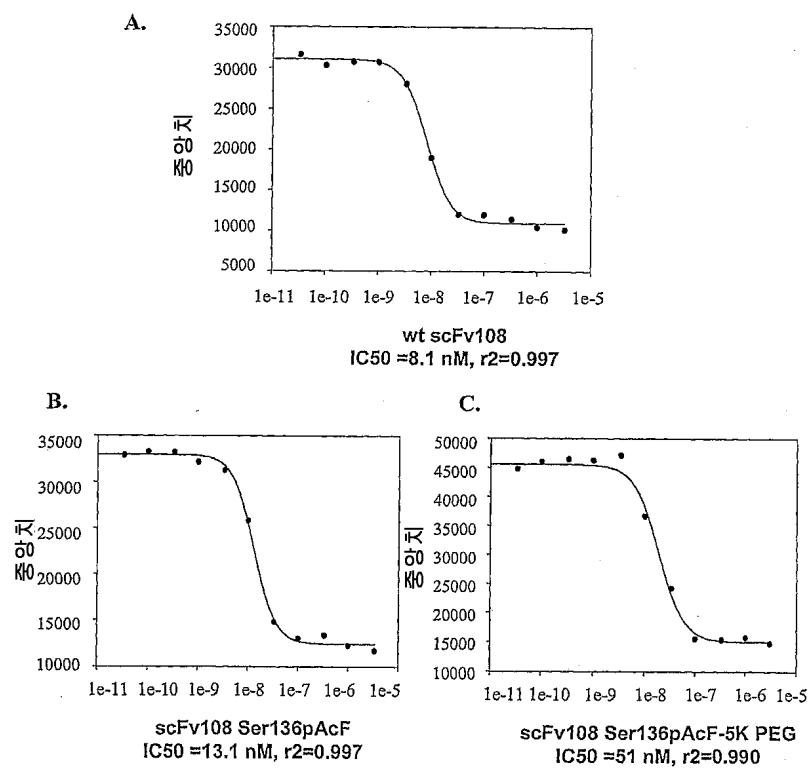
도면5



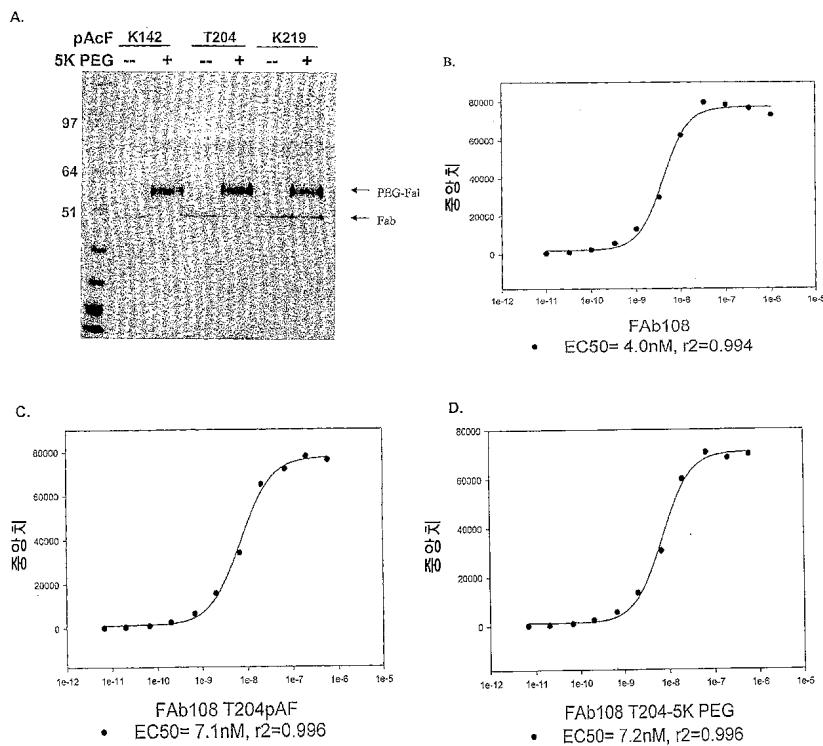
도면6



도면7

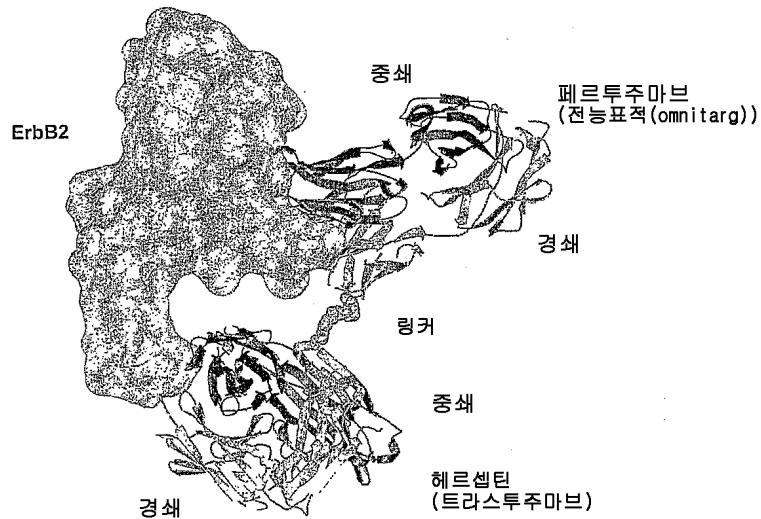


도면8

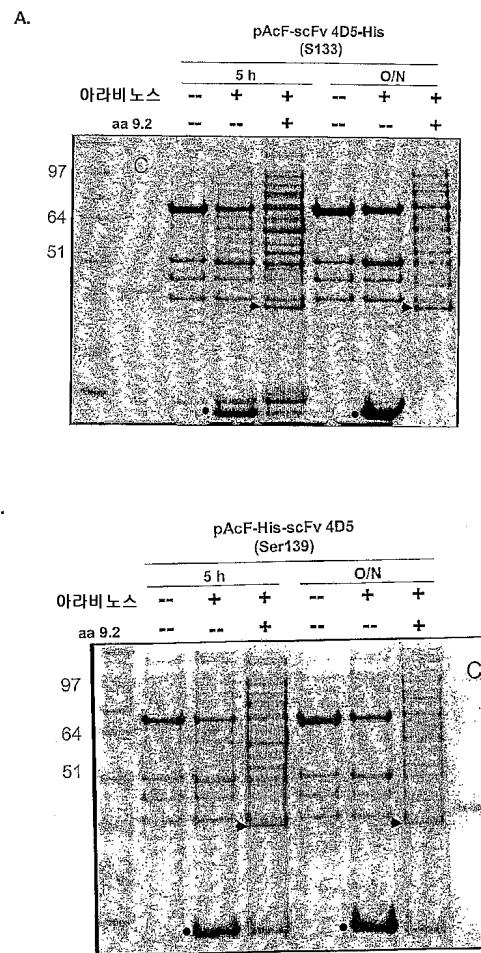


도면9

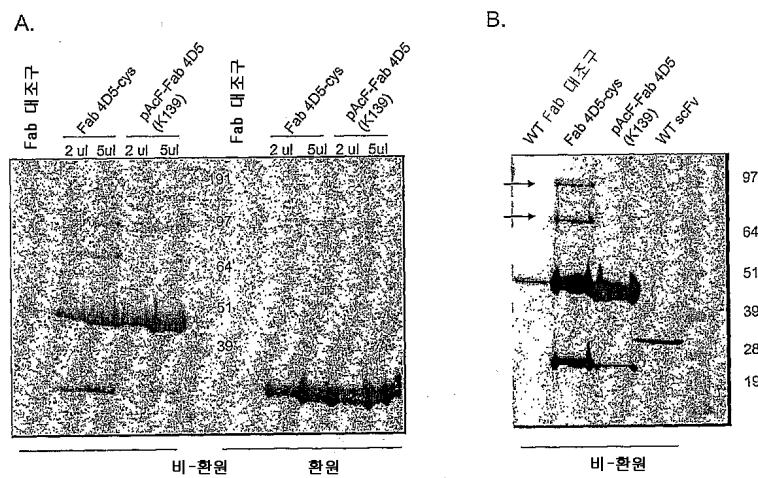
ErbB2에 대한 비파라트로픽(biparatropic) 황체 모델



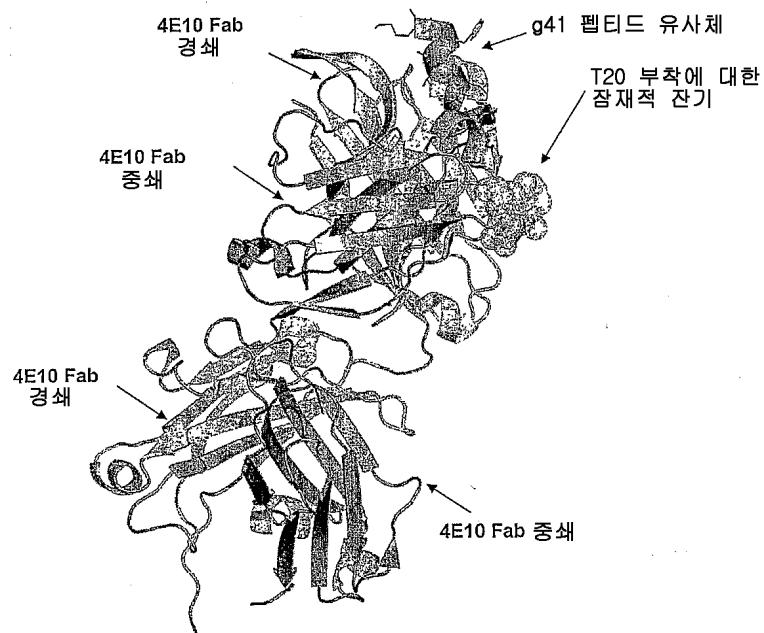
도면10



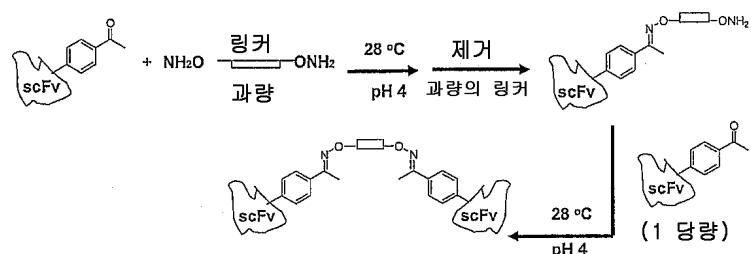
도면11



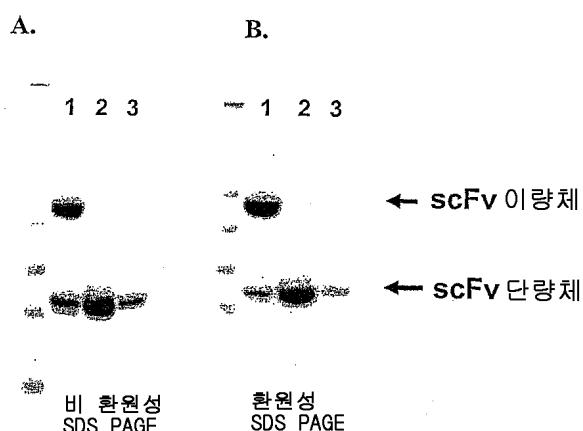
도면12



도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Cho, Ho Sung

Daniel, Thomas O.

Wilson, Troy E.

Cujec, Thomas P.

Tian, Feng

Hays, Anna-Maria

Kimmel, Bruce E.

Ho, Lillian

<120> Novel Antigen-Binding Polypeptides and Their Uses

<130> AMBX-0038.00PCT

<150> 60/581,334

<151> 2004-06-18

<150> 60/648,222

<151> 2005-01-28

<150> 60/654,018

<151> 2005-02-17

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 1

cggcggttag ttacgcaggc cagaacggcg gactctaaat ccgcattggcg ctggttcaaa 60

tccggccgc cgaccca 77

<210> 2

<211> 88

<212> DNA

<213> Halobacterium sp. NRC-1

<400> 2

cccgaggtag ccaagctcg	ccaacggcga	cgactctaa	atccgttctc	gtaggagttc	60
gagggttcga atccctcccc	tgggacca				88

<210> 3

<211> 89

<212> DNA

<213> Halobacterium sp. NRC-1

<400> 3

gcgaggtag ccaagctcg	ccaacggcga	cgacttct	aatccgttct	cgtaggagt	60
cgagggttcg aatccctccc	ctcgacca				89

<210> 4

<211> 306

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 4

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr		
145	150	155
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
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 Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 5		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 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 Gly
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 6

<211> 305

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 6

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190
 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255
 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305
 <210> 7
 <211> 305
 <212> PRT

 <213> Methanococcus jannaschii
 <400> 7
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr

145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His

165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Val Val Cys Ile His Asn

180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys

195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys

210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile

225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu

260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn

275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

290 295 300

Leu

305

<210> 8

<211> 305

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 8

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr

145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His

165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn

180	185	190
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu 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
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg		
245	250	255
Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu		
260	265	270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn		
275	280	285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg		
290	295	300
Leu		
305		
<210> 9		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 9		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr		
20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85	90	95	
----	----	----	--

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys

100	105	110	
-----	-----	-----	--

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115	120	125	
-----	-----	-----	--

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130	135	140	
-----	-----	-----	--

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165	170	175	
-----	-----	-----	--

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180	185	190	
-----	-----	-----	--

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195	200	205	
-----	-----	-----	--

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210	215	220	
-----	-----	-----	--

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245	250	255	
-----	-----	-----	--

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260	265	270	
-----	-----	-----	--

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275	280	285	
-----	-----	-----	--

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290	295	300	
-----	-----	-----	--

Arg Leu

305

<210> 10

<211> 306

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 10

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		

275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 11		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 11		

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
15		
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu		
20	25	30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
80		
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
 145 150 155 160

 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 12
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 12

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 13

<211> 306

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 13

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His		
145	150	155
Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu 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
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 14		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 14		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu		
20	25	30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His

145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 15		
<211> 306		
<		
212> PRT		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 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 Ala		
20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50		
55		
60		
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
80		
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115		
120		
125		
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His		
145	150	155
160		
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 16

<211> 306

<

212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
 145 150 155 160
 Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305

<210> 17

<211> 306

<

212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 17

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 18

<211> 920

<

212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 18

accacaggc tcccatgcga ttca gta cga cgctggca ac ggccgctac g	60
ttactgca ag tcaggta a g cgcaggtt c agctgc a gca gtctggag ct gagctgtat g	120
agcctgggc ctc a g t gaa atatcctgca aggctactgg ctacacattc agtagttact	180
ggatagat g ggtaa a g cag aggccctggac atggccttga gtggat tgg a gat tttac	240
cggaa gta aaaaactaac tacaatgaga agttcaagg aaaggccaca ttca ctgc a g	300
atacatcctc caacacagcc tacatgcaat ttagcagcct gacatctgag gactctgcgc	360

tctattactg tgcaagat at tactat tagga acgac gacta tgg tattggac tactgggtc	420
aaggAACCTC agtc accg tgc tcctcaggcg gcccggctc cgg tgg tgg ggtatctggtg	480
ggggcggcag cggcgg tggc ggc a g t gaaa tcc a catgac aca gactaca tcctcc tigt	540
ctgcctctct ggg a gac a g a g t caccatca gttc a g t caggac atcaggaa att	600
at ttaa actg g t a t c a g c a g a a a c c t g a t g g a a c t g t t a a a c t c t g a t c t a t t a c a t	660
caacttaca tt caggagtc ccatcaagg tca g tggc a g cgg t ctggg a c a g a t t a t t	720

ctctcaccat cagcaacctg gaacctgaag atattgccac ttattattgt cagcagtata 780

gtaagattcc gtacacgttc acagggggga ccaagctgga aataaaacgg gctgatgctg 840

cagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat catcatacc 900

atcattaagg taccaaccaa 920

<210> 19

<211> 297

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 19

Met Arg Phe Ser Thr Thr Leu Ala Thr Ala Ala Thr Ala Leu Phe Phe

1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Val Ser Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala

20 25 30

Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr

35 40 45

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro

50 55 60

Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Lys Lys

65 70 75 80

Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp

85 90 95

Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu

100 105 110

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Arg Asn Asp Asp

115 120 125

Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Glu Ile His Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser

165	170	175
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp		
180	185	190
Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val		
195	200	205
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser		
210	215	220
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser		
225	230	235
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser		
245	250	255
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Thr Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
260	265	270
Ala Asp Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser		

275	280	285
Ala Val Asp His His His His His		
290	295	
<210> 20		
<211> 779		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> Synthetic construct		
<400> 20		
ccatggcca ccaccaccac caccaccagg ttcaagtgcg gcagtcgtga gctgagctga 60		
tgaaggctgg ggcctcagtg aagatatcct gcaaggctac tggctacaca ttcaagtgttt 120		
actggataga gtggtaaag cagaggcctg gacatggcct tgagtggatt ggagagattt 180		
taccggaaag taaaaaaact aactacaatg agaagttcaa gggaaaggcc acattcactg 240		

cagatacatc ctccaaacaca gcctacatgc aatttagcag cctgacatct gaggactctg 300		
ccgtctatta ctgtgcaaga tattactata ggaacgcacga ctatggatg gactactgg 360		
gtcaaggaac ctcagtccacc gtctcctcg gcccggcgg ctccgggtgt ggtggatctg 420		
gtggggcgg cagcggcggt ggcggcagtg aaatccacat gacacagact acatcctccc 480		
tgtctgcctc tctgggagac agagtcacca tcagttgcag tgcaagtcag gacatcgaga 540		

attattnaaa ctggtatcag cagaaacctg atggaactgt taaactcctg atctattaca 600
 catcaacttt acattcagga gtcccatcaa ggttcagttt cagcgggtct gggacagatt 660

attctctcac catcagcaac ctggaacctg aagatattgc cacttattat tgtcagcagt 720
 atagaat tccgtacacg ttcacagggg ggaccaagct gaaatataa aggtaccaa 779

<210> 21

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 21

Met Gly His His His His Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala

20	25	30
----	----	----

Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg

35	40	45
----	----	----

Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Lys

50	55	60
----	----	----

Lys Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser

85	90	95
----	----	----

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Arg Asn Asp

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Gly Gly Ser Glu Ile His Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln

165	170	175
Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr		
180	185	190
Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro		
195	200	205
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile		
210	215	220

Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr		
225	230	235
Ser Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Thr Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
245	250	255

<210> 22

<211> 1578

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

accacccgtc tcccatgaaa aaactgctgt tcgcgattcc gctggtggtg ccgttctata	60
gccatagcac catggagctc gaaatccaca tgacacagac tacatccctcc ctgtctgcct	120
ctctgggaga cagagtacc atcagttgca gtgcaagtca ggacatcagg aattatttaa	180

actggtatca gcagaaacct gatggaactg ttaaaactcct gatctattac acatcaactt	240
tacattcagg agtcccatca aggttcagtg gcagcgggtc tggacagat tattctctca	300
ccatcagcaa cctggaacct gaagatattt ccacttatta ttgtcagcag tatagtaaga	360
ttccgtacac gttcacaggg gggaccaagg tggaaataaa acgggctgtat gctgcaaagg	420
tttagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtttcat cttccgcctca tctgtatgagc	480
agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg	540
ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggtt taactcccag gagagtgtca	600

cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag	660
cagactacga gaaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtccac ccatcaggc ctgtcctcgc	720
ccgtcacaaa gagttcaac aggggagagt gttaagctgg ggatccctta gaggttgagg	780
tgatTTATG AAAAAGAATA tcgcatttct tcttgcatct atgttcgttt tttctattgc	840
tacaaacgctcgtcagg ttcaagctgtct cgagcagggtt cagctgcagc agtctggagc	900

tgagctgatg aagcctgggg cctcagtcaa gatatcctgc aaggctactg gctacacatt 960
 cagtagttac tggatagagt gggtaaagca gaggcctgga catggccttg agtggattgg 1020

agagattta ccggaaagta aaaaaactaa ctacaatgag aagttcaagg gaaaggccac 1080
 attcaactgca gatacatcct ccaacacagc ctacatgcaa tttagcagcc tgacatctga 1140
 ggactctgcc gtctattact gtgcaagata ttactatagg aacgacgact atggatgga 1200
 ctactgggtt caaggaacct cagtcaccgt ctccctcagcg ggcccatcgg tcttccccct 1260
 ggcacctcc tccaagagca cctctgggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaaggaa 1320
 ctactcccc gaaccggta cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca 1380
 caccttcccg gcgtcctac agtcctcagg actctactcc cttagcagcgc tggtgactgt 1440

gcctcttagc agcttggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 1500
 caccaagggtg gacaagaaag ttgagccaa atcttgtac aaacatcatc atcatcatca 1560
 ttagggtacc accataac 1578

<210> 23

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 23

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser

1 5 10 15

His Ser Thr Met Glu Leu Glu Ile His Met Thr Gln Thr Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser

35 40 45

Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Thr Leu His Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100	105	110	
Tyr Ser Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Thr Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
115	120	125	
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
130	135	140	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
145	150	155	160
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
165	170	175	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
180	185	190	
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
195	200	205	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
210	215	220	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
225	230	235	240
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
245			
<210> 24			
<211> 235			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic construct			
<400> 24			
Gln Val Gln Leu Leu Glu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu			
1	5	10	15
Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly			
20	25	30	
Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly			
35	40	45	
His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Lys Lys Thr			

50	55	60	
Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr			
65	70	75	80
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
85	90	95	
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Arg Asn Asp Asp Tyr			
100	105	110	
Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala			
115	120	125	
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly			
130	135	140	
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro			
145	150	155	160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr			
165	170	175	
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
180	185	190	
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
195	200	205	
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro			
210	215	220	
Lys Ser Cys Asp Lys His His His His His His			
225	230	235	
<210> 25			
<211> 863			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic construct			
<400> 25			
accacaggc tcccatgcga ttcaagtacga cgctggcaac ggccgctacg gcactttct 60			
ttactgcaag tcaggttaagc gcgaaatgc aactggttga atctggtggc ggtctggtc 120			
aaccagggtgg ttctctgcgt ctgtcttgcg ccgcgtccgg tttcaacatt aaagacacct 180			

acattcactg ggtgcgccag gctccggta agggctgga atgggtggcc cgcatatc 240

caacgaatgg ctacacccgc tacgcggatt ccgtgaaagg ccgtttacg attagcgctg 300

ataccagcaa gaacaccgct tatctgaaa tgaacagcct gegtgcgaa gacaccgcg 360

tgtactattg tagccgttgg ggccgtgatg gctttacgc gatggactac tggggccagg 420

gtacgcttgt cacggttct tctggcggcg gcggctccgg tgggtggta tctggtgggg 480

gcggcagcgg cggtgccgc agtgatattc aaatgactca atcccttcc tctctgtctg 540

caagcgttgg tgatcgtgt accatcacct gtcgcgcata ccaggatgta aataccgcag 600

tagcgtggta tcagcagaag ccggtaaag cacaaaaact gctgatttat tccgcgagct 660

ttctgtatag cggcgatcca agccgttta gcggttctcg tagcggtact gatttaccc 720

tgaccatctc ctctctgcag cctgaggatt ttgcgaccta ttattgccag cagcattata 780

cgacgccccc tacgttggc cagggtacta aggtggaaat taaaagcggc catcatcatc 840

accatcatta aggtacccaa cca 863

<210> 26

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

Met Arg Phe Ser Thr Thr Leu Ala Thr Ala Ala Thr Ala Leu Phe Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Ala Ser Gln Val Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

20	25	30
----	----	----

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

35	40	45
----	----	----

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp

85	90	95
----	----	----

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

100	105	110
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr		
115	120	125
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly		
145	150	155
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
165	170	175
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val		
180	185	190
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
195	200	205
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg		
210	215	220
Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
225	230	235
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr		
245	250	255
Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly		
260	265	270
His His His His His His		
275		
<210> 27		
<211> 869		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220><223> Synthetic construct		
<400> 27		
accacaggc tcccatgcga ttca gta cga cgctggcaac ggccgctacg gcactttct 60		
ttactgcaag tcaggtaagc gcgggccacc accaccacca ccactcttgtt gaagttaaac 120		
tgggtgaatc tggtgccggt ctggtgcaac caggtggttc tctgcgtctg tcttgcccg 180		

cgtccggttt caacattaaa gacacctaca ttcactgggt gcgccaggct ccgggtaagg 240
 gtctggaatg ggtggcccgc atttatccaa cgaatggcta caccgctac gcggattcg 300

tgaaaggccg ttacacgatt agcgctgata ccagcaagaa caccgcttat ctgcaaatga 360
 acagcctgctg tcggagaagac accggcgtgt actattgttag cgcttgggc ggtatggct 420
 ttacgcgt ggactactgg ggccaggta cgctggcac ggtttcttct ggcggcggcg 480
 gctccggtg gggtggatct ggtggggcg gcagcggcgg tggcggcagt gatattcaaa 540
 tgactcaatc tccttcctct ctgtctgcaa gcgttggta tcgtgtgacc atcacctgtc 600
 gcgcatccca ggtatgtaaat accgcagtag cgtggatca gcagaagccg gtaaagcac 660
 caaaactgct gatatttcc gcgagcttc tgtatagccg cgtaccaagc cgtttagcg 720

gttctcgtag cggtactgtat ttaccctga ccatctccctc tctgcagcct gaggatttg 780
 cgacctatta ttgccagcag cattatacga cgccgcctac gttggccag ggtactaagg 840
 tggaaattaa aagctaaggt acccaacca 869

<210> 28

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 28

Met Arg Phe Ser Thr Thr Leu Ala Thr Ala Ala Thr Ala Leu Phe Phe

1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Val Ser Ala Gly His His His His His Ser Gly

20 25 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

35 40 45

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

50 55 60

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

65 70 75 80

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

85 90 95

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

100	105	110
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
115	120	125
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
130	135	140
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
145	150	155
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met		
165	170	175
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		
180	185	190
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr		
195	200	205
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser		
210	215	220
Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly		
225	230	235
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
245	250	255
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln		
260	265	270
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser		
275	280	

<210> 29

<211> 1538

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 29

atgaaaaaac	tgcgttcgc	gatccgctg	gtggcgct	tctatagcca	tagcaccatg	60
gagctcgata	ttcaaatgac	tcaatctct	tcctctctgt	ctgcaagcgt	tggtgatcgt	120
gtgaccatca	cctgtcgcc	atcccaggat	gtaaataccg	cagtagcgtg	gtatcagcag	180

aagccggta aagcacaaa actgctgatt tattccgcga gcttctgt a tagcggcgta 240
 ccaagccgtt ttacggttc tcgttagcggt actgattttt ccctgaccat ctcctctgt 300
 cagcctgagg atttgcgac ctattattgc cagcagcatt atacgacgcc gcctacgtt 360

ggccagggtta ctaaggtgga aattaaaaag cttgagatca aacgaactgt ggctgcacca 420
 tctgtcttca tcttcccgc acatgtatgag cagttgaaat ctggaaactgc ctctgttg 480
 tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgaaaggt ggataacgcc 540
 ctccaatcggtt gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600
 agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 660
 tgcgaagtca cccatcaggg cctgtcccg cccgtcacaa agagcttcaa cagggagag 720
 tgttaagctg gggatcctct agaggttgag gtgatttat gaaaaagaat atcgatttc 780

ttcttgcatc tatgttcgtt ttttctattt ctacaaacgc gtacgctcag gttcagctgc 840
 tcgaggaagt tcaactgggtt gaatctggtg gcggtctggt gcaaccagggt ggttctctgc 900
 gtctgtcttg cgccgcgtcc ggtttcaaca ttaaagacac ctacattcac tgggtgcgcc 960
 aggctccggg taagggtctg gaatgggtgg cccgcattta tccaacgaat ggctacaccc 1020
 gctacgcgga ttccgtgaaa ggccgtttca cgattagcgc tgataccagc aagaacacgg 1080
 cttatctgca aatgaacagc ctgcgtgcgc aagacaccgc cgtgtactat tgtagccgtt 1140
 gggcgggtga tggctttac gcgtatggact actggggcca gggtacgctg gtcacggtt 1200

cttctggggc ccaatcggtc ttccccctgg caccctccca caagagcacc tctggggca 1260
 cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtacg gtgtcgtgga 1320
 actcaggcgc cctgaccaggc ggcgtgcaca cttccggc tgtcctacag tcctcaggac 1380
 tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc cagacctaca 1440
 tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagccaaat 1500
 cttgtgacaa acatcatcat catcatcatt aaggtacc 1538

<210> 30

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 31

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic construct

<400> 31

Gln Val Gln Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

20 25 30

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr

50 55 60

Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr

65 70 75 80

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala

100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala

115 120 125

Gln Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

210 215 220

Ser Cys Asp Lys His His His His His

225 230