

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6054294号
(P6054294)

(45) 発行日 平成28年12月27日 (2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日 (2016.12.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 14/64 (2006.01)	C 0 7 K 14/64
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48

請求項の数 21 (全 217 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-524971 (P2013-524971)
(86) (22) 出願日	平成23年8月17日 (2011.8.17)
(65) 公表番号	特表2013-542715 (P2013-542715A)
(43) 公表日	平成25年11月28日 (2013.11.28)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/048157
(87) 国際公開番号	W02012/024452
(87) 国際公開日	平成24年2月23日 (2012.2.23)
審査請求日	平成26年8月14日 (2014.8.14)
(31) 優先権主張番号	61/374,582
(32) 優先日	平成22年8月17日 (2010.8.17)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	508048481
	アンブルックス、インコーポレイテッド
	Ambr x, Inc.
	アメリカ合衆国, 92037 カリフォル
	ニア州, ラ ホーヤ, スイート 100,
	ノース トーレイ パインズ ロード 1
	0975
	10975 North Torrey
	Pines Road, Suite 10
	0, La Jolla, Californ
	ia 92037, United Sta
	tes of America

(74) 代理人	100081422
	弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変レラキシンポリペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然ではコードされないアミノ酸を含む改変レラキシンポリペプチドであって、

(a) 前記レラキシンポリペプチドは、A鎖残基1、A鎖残基5、A鎖残基13、A鎖残基18およびB鎖残基7からなる群より選択される位置が天然ではコードされないアミノ酸で置換されている、配列番号4またはそれと少なくとも90%配列同一性のレラキシンA鎖ポリペプチドおよび配列番号5もしくは配列番号6またはそれらと少なくとも90%配列同一性のレラキシンB鎖ポリペプチドを含み、

(b) 前記天然ではコードされないアミノ酸は、ポリマーまたは水溶性ポリマーに連結されている、

改変レラキシンポリペプチド。

【請求項 2】

天然ではコードされないアミノ酸を含む改変レラキシンポリペプチドであって、

(a) 前記レラキシンポリペプチドは、A鎖残基1、A鎖残基5、A鎖残基13、A鎖残基18およびB鎖残基7からなる群より選択される位置が天然ではコードされないアミノ酸で置換されている、配列番号4のレラキシンA鎖ポリペプチドおよび配列番号5または配列番号6のレラキシンB鎖ポリペプチドを含み、前記A鎖および前記B鎖はそれぞれ、最大1つのさらなるアミノ酸置換を含み、

(b) 前記天然ではコードされないアミノ酸は、ポリマーまたは水溶性ポリマーに連結されている、

改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 3】

前記天然ではコードされないアミノ酸が、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基からなる群より選択される官能基を含む、請求項 1 または 2 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 4】

前記天然ではコードされないアミノ酸が、オキシム連結またはトリアゾール連結により、前記ポリマーまたは水溶性ポリマーに連結されている、請求項 1 または 2 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 5】

前記オキシム連結がカルボニル成分およびアミノオキシ成分の反応により形成されるか、または前記トリアゾール連結がアジド成分およびアルキン成分の反応により形成される、請求項 4 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 6】

前記天然ではコードされないアミノ酸が、フェニルアラニン類似体または誘導体であるか、または、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基もしくはアルキン基を含むパラ置換、オルト置換もしくはメタ置換フェニルアラニンから選択されるか、または、パラアセチル-L-フェニルアラニンもしくはパラアジド-L-フェニルアラニンである、請求項 1-5 のいずれかに記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリマーまたは水溶性ポリマーがオリゴ糖を含む、請求項 1-6 のいずれかに記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリマーまたは水溶性ポリマーがポリ（エチレングリコール）を含む、請求項 1-6 のいずれかに記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリ（エチレングリコール）が、0.1 kDa~100 kDa の平均分子量を有する、請求項 8 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 10】

前記改変レラキシシポリペプチドが、組換え型であるか、真核宿主細胞において産生されるか、非真核宿主細胞において産生されるか、またはインビトロ翻訳により産生される、請求項 1-9 のいずれかに記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 11】

前記改変レラキシシポリペプチドが、配列番号 4 および配列番号 5 からなるヒトレラキシシに比べて、インビボ半減期の増加を示す、請求項 1-10 のいずれかに記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 12】

前記半減期が、少なくとも 2 倍延長されている、請求項 11 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 13】

前記半減期が、少なくとも 10 倍延長されている、請求項 11 に記載の改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 14】

天然ではコードされないアミノ酸を含む改変レラキシシポリペプチドであって、
（a）前記レラキシシポリペプチドは、位置 A 鎖残基 1 が天然ではコードされないアミノ酸で置換されている、配列番号 4 のレラキシシ A 鎖ポリペプチドおよび配列番号 5 または配列番号 6 のレラキシシ B 鎖ポリペプチドを含み、
（b）前記天然ではコードされないアミノ酸は、ポリマーに連結されているパラアセチル-L-フェニルアラニンを含む、改変レラキシシポリペプチド。

【請求項 15】

前記天然ではコードされないアミノ酸が、カルボニル成分およびアミノオキシ（ヒドロキシルアミン）成分の反応により形成されるオキシム連結により、前記ポリマーに連結されている、請求項 14 に記載の改変レラキシンポリペプチド。

【請求項 16】

前記改変レラキシンポリペプチドが生物学的に活性である、請求項 1－15 のいずれかに記載の改変レラキシンポリペプチド。

【請求項 17】

医薬の製造のための請求項 1－16 のいずれかに記載の改変レラキシンポリペプチドの使用。

10

【請求項 18】

冠動脈疾患、拡張機能障害、収縮期高血圧、原発性高血圧、二次性高血圧から選択される疾患の処置のための；または、血管収縮またはNO産生を調節するための；またはエンドセリン-1（ET-1）媒介血管収縮の処置において使用するための；または、心不全またはうっ血性心不全の処置において使用するための、医薬の製造のための請求項 1－16 のいずれかに記載の改変レラキシンポリペプチドの使用。

【請求項 19】

A鎖残基1、A鎖残基5、A鎖残基13、A鎖残基18およびB鎖残基7からなる群より選択される位置が天然ではコードされないアミノ酸で置換されている、配列番号4またはそれと少なくとも90%配列同一性のレラキシンA鎖ポリペプチドおよび配列番号5もしくは配列番号6またはそれらと少なくとも90%配列同一性のレラキシンB鎖ポリペプチドを含む少なくとも1つのレラキシンポリペプチドをコードする単離核酸であって、前記核酸が、前記天然ではコードされないアミノ酸をコードする少なくとも1つのセクターコドンを含む、単離核酸。

20

【請求項 20】

前記セクターコドンが、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドンおよび4塩基コドンからなる群より選択される、請求項 19 に記載の単離核酸。

【請求項 21】

請求項 1－16 のいずれかに記載の改変レラキシンポリペプチドの作製方法であって、（1）前記レラキシンA鎖ポリペプチドおよび前記レラキシンB鎖ポリペプチドをコードし、前記天然ではコードされないアミノ酸をコードするセクターコドンを含むポリヌクレオチドまたは複数ポリヌクレオチド、（2）直交性RNAシンテターゼ、および（3）直交性tRNAを含む細胞を、前記天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドの発現を可能とする条件下で培養すること；および前記天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドを精製すること、を含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

40

本発明は、任意選択により、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸で改変されているレラキシンポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

成熟ヒトレラキシンは、出産前の生殖器官のリモデリングに関与し、従って、分娩過程を円滑化することがわかっている、約6000ダルトンのペプチドホルモンである。このタンパク質は、標的器官の結合組織の再構成を調節し、妊娠と出産の間の器官構造の必要な変化を生じさせると考えられている。Hisaw、F. L.、Proc. Soc. Exp. Biol. Med.、23：661－663（1926）；Schwabe、C.、

50

et al.、Biochem. Biophys. Res. Comm.、75:503-570 (1977); James, R. et al.、Nature、267:544-546 (1977)、を参照されたい。レラキシンの概説については、Sherwood、D. 生殖の生理機能 (Physiology of Reproduction)、16章、「レラキシン (Relaxin)」、Knobil, E. and Neill, J.、et al. (eds.)、(Raven Press Ltd.、New York)、pp. 585-673 (1988)に記載されている。レラキシンの血中循環濃度は、妊娠の全9ヶ月のあいだ高く、出産後急速に低下する。

【0003】

妊娠の主要ホルモンである一方で、レラキシンは、また、非妊娠女性ならびに男性中で検出されており (Bryant-Greenwood, G. D.、Endocrine Reviews、3:62-90 (1982) および Weiss, G.、Ann. Rev. Physiol.、46:43-52 (1984))、つい最近には、心不全の治療に有用であることがわかった。

10

【0004】

心不全は、人体組織の代謝要求の対応に必要な血液を、心臓ポンプで移送できないこととして定義されている。ポンピング能力の低下は、心筋組織の損失または損傷が原因であることが最も多い。その結果として、心室排出が抑えられ、これは、心室充満圧および心室壁応力の増加、および心拍出量の減少に繋がる。心拍出量の減少に対する生理的応答として、多くの神経内分泌反射神経が活性化され、これが、全身性の血管収縮、心臓および体液貯留の交感神経刺激を引き起こす。これらの反射応答は、最初は心拍出量を高める傾向があるが、長期的には、それらは有害である。生じた末梢抵抗の増加は、心臓の後負荷を高め、血液容量の増加が心室充満圧をさらに高める。これらの変化は、心臓の交感神経刺激の増加と相まって、残りの機能的な心筋への要求に対し、心臓がさらに代償不全になることが多くなる。

20

【0005】

多くの心血管障害の共通の終点であるうっ血性心不全は、心臓が末梢組織に適切に灌流することができない場合に生ずる。最近の推計では、米国の約4百万人がこの疾患であると診断され、これらの症例の内の50%超が、診断の5年以内に死に至る [Taylor, M. D. et al.、Annual Reports in Med. Chem. 22、85-94 (1987)]。

30

【0006】

現在のうっ血性心不全を含む心不全の治療は、心筋に対する過度の要求を起こさせないで、心拍出量を増加させることに焦点が置かれている。これらの目的を達成するためには、利尿薬、血管拡張剤および強心剤の種々の組み合わせを使用して、血液容量の低減、末梢抵抗の低減、および心収縮力の増加が行われる。従って、現在の治療は、個別患者の臨床的要求を満たすために、複数の薬剤の効果のバランスに依存しており、使用薬剤に対する有害反応に悩まされている。

【0007】

例えば、利尿剤は、カリウムおよびマグネシウムの血漿中濃度を低減させ、ジギタリス投与を受けている患者の不整脈の発生率を増加させる。利尿薬は、体液量欠乏により硝酸塩の循環効果を高め、心臓の充満圧、心拍出量および全身動脈圧の減少を生ずる可能性がある。

40

【0008】

α アドレナリン受容体遮断薬は、冠血管灌流を損なう全身動脈圧の顕著な低下を生じる可能性がある。

【0009】

アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、動脈圧に対し類似の効果を有し、さらに、カリウム血漿中濃度の過剰増加に繋がる可能性がある。

【0010】

50

正の収縮性を生ずる薬剤、例えば、ジギタリスや β アドレナリン受容体遮断薬は、不整脈を誘発する可能性がある。さらに、ジギタリスは、狭い治療指数を有し、カテコールアミン類似体は全て、受容体ダウンレギュレーションにより、有効性を急速に弱める傾向がある。

【0011】

このように、動脈および静脈拡張ならびに心臓収縮性に関する生理学的に統合された応答を生じる、現在の治療薬の持つ欠点のない治療薬に対する要求がある。

【0012】

レラキシンは、ブタ、マウス、ウマ、サメ、トラ、ラット、ホシザメおよびヒトを含む種々の種から精製されており、インスリンおよびインスリン様増殖因子に対し少なくとも1次および2次構造相同性を示すが、しかし、種間相同性は非常に低いと思われる。ヒトでは、レラキシンは、妊婦の黄体（CL）中にほとんどの量が存在するが、脳中の特定の核は、レラキシン受容体を有し、他の核は、レラキシン用のメッセンジャーRNAを含んでいる。レラキシン受容体を有するいくつかの細胞の核が、視床下部領域で見つっている。

【0013】

2つのヒト遺伝子型、（H1）と（H2）が特定されている。Hudson, P., et al., Nature, 301: 628-631 (1983); Hudson, P., et al., The EMBO Journal, 3: 2333-2339 (1984); および米国特許第4, 758, 516号および同4, 871, 670号。1つの遺伝子型（H2）のみが、CL中で転写されることがわかっている。（H1）型が別の組織部位で発現するか否か、または、それが疑似遺伝子を表すのかどうかは、不明確なままである。合成ヒトレラキシン（H2）および特定のヒトレラキシン類似体の生物活性の試験により、生物活性に必要なレラキシンコア、ならびに生物活性に影響しないメチオニンの特定のアミノ酸置換が明らかになった。Johnston, et al., ペプチド：構造と機能（Peptides: Structure and Function）、Proc. Ninth American Peptide Symposium, Deber, C. M., et al. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985)。

【0014】

レラキシンの作製方法は、また、米国特許第4, 835, 251号ならびに同時係属の米国出願第07/908, 766号（国際出願PCT US90/02085号）および同08/080, 354号（国際出願PCT US94/0699号）、に記載されている。心臓血管治療および神経変性疾患治療におけるレラキシンの使用方法は、米国特許第5, 166, 191号およびおよび米国出願第07/902, 637号（国際出願PCT US92/06927号）に記載されている。ヒトレラキシンの特定の処方は、承認米国出願第08/050, 745号に記載されている。

【0015】

組換え型ヒトレラキシン（H2）は、現在、強皮症患者のフェーズ1ヒト臨床試験中である。強皮症は、組織再構成の不均衡を伴い、コラーゲンの過剰産生を生じ、最終的に、皮膚（および罹患器官）の膨潤および硬化に繋がる疾患である。最近のレラキシンを投与する治療では、長期の繰り返し注入が必要である。

【発明の概要】

【0016】

本発明は、任意選択で、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸で改変されているレラキシンポリペプチドを提供する。本明細書は、いくつかの実施形態を提供するが、これらの実施形態は、本発明の例示のためのものであり、請求項で定められる本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことは理解されたい。

【0017】

本発明の別の態様では、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸を有するレ

10

20

30

40

50

ラキシシポリペプチドが、少なくとも1つの水溶性ポリマーに結合される。

【0018】

一態様では、本発明は、治療有効量のレラキシシを投与して、それを必要としている哺乳動物の血管新生を促進する方法に関する。別の実施形態では、レラキシシは、少なくとも約1 ng/mlの血清濃度を維持するために十分な量を投与される。さらなる実施形態では、レラキシシポリペプチドは、ヒトレラキシシ(hR2)である。

【0019】

本発明は、低下した動脈コンプライアンスの個体を有効量のレラキシシ受容体アゴニストを含む製剤を使って治療する方法を提供する。好ましい実施形態では、レラキシシ受容体アゴニストは、組換え型ヒトレラキシシ、例えば、ヒトH2レラキシシである。

10

【0020】

本発明の一実施形態では、本発明は、対象の動脈コンプライアンスを高める方法を提供し、前記方法は、測定前記対象の全体動脈コンプライアンスの測定、前記全体動脈コンプライアンスが健康な対象の全体動脈コンプライアンスと比べて、前記対象で低下していることの判定、および前記対象にレラキシシ含有医薬製剤を投与して前記対象の動脈コンプライアンスを増加させることを含む。全体動脈コンプライアンスは、一実施形態では、面積法を使って大動脈圧波形の拡張期崩壊から測定できる。別の実施形態では、全体動脈コンプライアンスは、パルス圧力に対する一回拍出量の比率として計算できる。ここで、一回拍出量は、心拍数に対する心拍出量の比率として定義される。

【0021】

20

関連実施形態では、対象の局所的動脈コンプライアンスまたは領域性動脈コンプライアンスは、全体動脈コンプライアンス測定に追加して、またはその代用として測定可能であり、局所または領域性動脈コンプライアンスが類似の状態の健康な個体で予期される局所または領域性動脈コンプライアンスに比べて低い場合には、その個体の動脈コンプライアンスを高めるためにレラキシシを投与できる。

【0022】

さらなる実施形態では、レラキシシが投与される対象は、1つまたは複数の以下の障害に罹患している：アテローム性動脈硬化、1型糖尿病、2型糖尿病、冠動脈疾患、強皮症、脳卒中、拡張機能障害、家族性高コレステロール血症、収縮期高血圧、原発性高血圧、二次性高血圧、左室肥大、長期喫煙関連動脈壁硬化、肥満症関連動脈壁硬化、年齢関連動脈壁硬化、全身性エリテマトーデス、子癇前症、および高コレステロール血症。関連実施形態では、本発明は、閉経期前後の、閉経期の、および閉経後の女性および1つの上述の障害の危険のある個体の動脈コンプライアンスを高める方法を提供する。

30

【0023】

さらなる本発明の実施形態では、レラキシシの投与は、投与前の測定動脈コンプライアンスに比べて、少なくとも10%、15%、20%またはそれ超、動脈コンプライアンスを高める。またさらなる実施形態では、本発明は、0.5~80 ng/mlのレラキシシ血清濃度を維持できるように、所定の速度で、動脈コンプライアンスの低下した個体へのレラキシシの投与を提供する。一実施形態では、レラキシシは、1つの天然ではコードされないアミノ酸を有する組換え型ヒトレラキシシである。また別の実施形態では、レラキシシは、2つ以上の天然ではコードされないアミノ酸を有するレラキシシである。さらに別の本発明の実施形態では、レラキシシは、水溶性ポリマーに結合した天然ではコードされないアミノ酸を有する。関連実施形態では、レラキシシは、注射可能製剤で、徐放製剤として、または持続点滴として毎日投与できる。

40

【0024】

別の態様では、本発明は、治療有効量のレラキシシを投与することによる感染症または虚血性創傷の治療に関する。特に、好ましい実施形態では、感染症または虚血性創傷は、障害が血行不良による酸素の欠乏から生じたものである。

【0025】

さらに別の本発明の態様では、感染症または虚血性創傷の治療用薬剤の製造のための、

50

または血管新生促進用薬剤の製造のための、本発明のレラキシンポリペプチドの使用方を提供する。別の態様では、本発明は、骨変性関節機能不全の治療に関し、また、別の態様では、骨変性関節機能不全の治療は、限定されないが、グルコサミン等の1つまたは複数のアジュバントに加えて、h R 2を含む。別の態様では、本発明は、アルツハイマー病の治療に関し、また、別の態様では、アルツハイマー病の治療は、限定されないが、エストロゲン等の1つまたは複数のアジュバントに加えて、h R 2を含む。別の実施形態では、本発明は、哺乳動物に治療有効量の本明細書の組成物を投与することを含む、哺乳動物の生殖生理を調節する方法に関する。

【0026】

本発明は、アンギオテンシンーII (Ang II) 媒介血管収縮を治療する方法をさらに提供する。これらの方法は、一般的に、Ang IIの血管収縮効果を戻す、抑制する、または低減するのに有効な量のレラキシンを含む製剤を投与することを含む。

【0027】

本発明は、エンドセリンー1 (ET-1) 媒介血管収縮を治療する方法をさらに提供する。これらの方法は、一般的に、ET-1の血管収縮効果を戻す、抑制する、または低減するのに有効な量のレラキシンを含む製剤を投与することを含む。一部の実施形態では、この方法は、レラキシンを個体に投与することにより、血管中の細胞のエンドセリンB型受容体活性を高めることを含む。

【0028】

本発明は、虚血状態の治療方法をさらに提供し、一般的に、血管新生および／または血管拡張を刺激、または促進するのに有効な量のレラキシンを含む製剤を投与し、それにより、虚血状態を治療することを含む。この方法は、種々の虚血状態の治療に有用である。一部の実施形態では、この方法は、心筋梗塞の結果生ずる虚血状態の治療のために提供される。他の実施形態では、この方法は、創傷に関連する虚血状態の治療のために提供される。従って、本発明は、創傷治癒を促進する方法をさらに提供する。

【0029】

本発明は、血管新生および／または血管拡張性サイトカイン発現を刺激する方法をさらに提供し、一般的に、血管拡張、および／または、血管新生サイトカイン産生を刺激または促進するのに有効な量のレラキシンを含む製剤を投与することを含む。一部の実施形態では、この方法は、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (b F G F) および／または血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) の発現の刺激を提供する。このような方法は、疾患部位またはその近くで血流を増やすことにより治療可能な各種疾患の治療に有用である。

【0030】

本発明は、腎臓血管拡張および超濾過を増やす方法をさらに提供し、一般的に、レラキシンを含む製剤を投与することを含む。これらの方法は、種々の腎臓病状の治療に有用である。従って、本発明は、血管収縮に関連した腎臓病状を治療する方法をさらに提供する。

【0031】

本発明は、肺高血圧を低下させる方法をさらに提供し、一般的に、レラキシンを含む製剤を投与することを含む。

【0032】

Connetics CorporationおよびBAS Medical Inc. に帰属する特許の、それぞれ、米国特許第6, 211, 147号および同6, 780, 836号 (両特許は、参照により本明細書に組み込まれる) では、レラキシンを使った血管新生促進方法が開示されている。Genentech, Inc. に帰属する、米国特許第5, 759, 807号 (参照により本明細書に組み込まれる) では、プロレラキシンからの原核生物のレラキシン産生プロセスが開示されている。米国特許第6, 251, 863号は、それぞれ状態に応じて、グルコサミン硫酸塩およびエストロゲンをさらに含むレラキシン薬剤の投与により、骨変性関節機能不全の治療方法およびアルツハイマー病の治療方法を開示する。この明細書も、また、参照によってその全体が本明細書に組み込まれ

10

20

30

40

50

る。

【0033】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、1つまたは複数の翻訳後修飾を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、リンカー、ポリマー、または生物学的分子に連結される。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、二官能性ポリマー、二官能性リンカー、または少なくとも1つの追加のレラキシシポリペプチドに連結される。

【0034】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、リンカーで水溶性ポリマーに連結されるか、または水溶性ポリマーに結合される。一部の実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は、二官能性ポリマーである。一部の実施形態では、二官能性ポリマーは、第2のポリペプチドに連結される。一部の実施形態では、第2のポリペプチドは、レラキシシポリペプチドである。

【0035】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む水溶性ポリマーに連結した少なくとも2つのアミノ酸を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、天然ではコードされないアミノ酸である。

【0036】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む水溶性ポリマーに連結した少なくとも2つのアミノ酸を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、天然ではコードされないアミノ酸である。

【0037】

一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシもしくはプロレラキシシポリペプチド、レラキシシ類似体、プロレラキシシ、レラキシシA鎖、レラキシシB鎖A1a1Aspレラキシシ、またはレラキシシポリペプチドのいずれかの1つまたは複数の以下の位置に組み込まれる：A鎖中の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25（すなわち、タンパク質のカルボキシル末端）、およびそれらのいずれかの組み合わせ（配列番号：4）および／またはB鎖中の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30（配列番号：5または配列番号：6の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシもしくはプロレラキシシポリペプチドのいずれかの1つまたは複数の以下の位置に組み込まれる：A鎖中の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、タンパク質のカルボキシル末端）、およびそれらのいずれかの組み合わせ（配列番号：1または配列番号：2もしくは3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシ中の1つまたは複数の以下の位置に組み込まれる：位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、7

10

20

30

40

50

8、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89（すなわち、配列番号：3のタンパク質のカルボキシル末端）。

【0038】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、A鎖中のアミノ酸の位置1に組み込まれる（配列番号4）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、A鎖中のアミノ酸の位置5に組み込まれる（配列番号4）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中のアミノ酸の位置7に組み込まれる（配列番号5または配列番号6）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、A鎖中のアミノ酸の位置2に組み込まれる（配列番号4）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、A鎖中のアミノ酸の位置13に組み込まれる（配列番号4）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中のアミノ酸の位置5に組み込まれる（配列番号5または配列番号6）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、A鎖中のアミノ酸の位置18に組み込まれる。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中のアミノ酸の位置5に組み込まれる。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中のアミノ酸の位置28に組み込まれる。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸位置1、2、5、13、18（配列番号4または配列番号1、配列番号2、配列番号3、または他の既知のレラキシシ配列の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸の位置1、2、5、13（配列番号4または配列番号1、配列番号2、配列番号3、または他の既知のレラキシシ配列の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸の位置1、2、5（配列番号4または配列番号1、配列番号2、配列番号3、または他の既知のレラキシシ配列の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸の位置2または5（配列番号4または配列番号1、配列番号2、配列番号3、または他の既知のレラキシシ配列の対応するアミノ酸）。

【0039】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：B鎖中のアミノ酸の位置5または7（配列番号5もしくは配列番号6、または配列番号：1、2、もしくは3の対応するアミノ酸位置）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中の位置7に組み込まれる（配列番号5もしくは配列番号6、または配列番号：1、2、もしくは3の対応するアミノ酸位置）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中の位置5に組み込まれる（配列番号5もしくは配列番号6、または配列番号：1、2、もしくは3の対応するアミノ酸位置）。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、B鎖中の位置7に組み込まれる（配列番号5もしくは配列番号6、または配列番号：1、2、もしくは3の対応するアミノ酸位置）。

【0040】

一実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸位置1、5、2、13、18（配列番号4または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）、B鎖中のアミノ酸位置7、5（配列番号5もしくは6、または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシシポリペプチド中の以下の位置の1つに組み込まれる：A鎖中のアミノ酸位置1、5、2、13、18（配列番号4または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）、B鎖中のアミノ酸位置7、5（配列番号5もしくは6、または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）。

【0041】

一部の実施形態では、限定されないが：A鎖中の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25（すなわち、タンパク質のカルボキシル末端）、およびいずれかのそれらの組み合わせ（配列番号4または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）および／またはB鎖中の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30（配列番号5もしくは6または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、限定されないが：A鎖中の1、2、5、13、18（配列番号1または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、限定されないが：A鎖中の1、2、5（配列番号1または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、限定されないが：A鎖中の2、5（配列番号1または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、限定されないが：A鎖中の2、5、13、18（配列番号1または既知のレラキシン配列の対応するアミノ酸）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、限定されないが：B鎖中の5、7（配列番号5もしくは6または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）の位置を含む1つまたは複数のこれらの位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、B鎖中の位置5の天然ではコードされないアミノ酸（配列番号5もしくは6または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）は、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施形態では、天然ではコードされないB鎖中の位置7のアミノ酸（配列番号5もしくは6または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）は、水溶性ポリマーに連結される。

【0042】

一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシンまたはプロレラキシンのポリペプチドのいずれかの中の1つまたは複数の以下の位置に組み込まれる：B鎖中の位置5、7（配列番号5もしくは6または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）およびA鎖中の位置1、5、2、13、18（配列番号4または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシンまたはプロレラキシンのポリペプチドのいずれかの中の1つまたは複数の以下の位置に組み込まれる：B鎖中の位置5、7（配列番号5もしくは6または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）およびA鎖中の位置1、5、2、13、18（配列番号4または配列番号1、2、3の対応するアミノ酸位置）。また、これらの天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。

【0043】

本発明の方法は、血管新生の促進、血管拡張の促進、非降圧性血管拡張の促進、限定されないが、腎臓高血圧症、肺高血圧症、および心臓高血圧症、等の高血圧症の治療に使用可能である（米国特許第6,723,702号；および同6,780,836号（両特許は参照によってその全体が組み込まれる）は、レラキシン類似体結晶の生成と使用について開示している）。

【0044】

製剤

本発明を幅広く実施する際には、また、製剤は、天然ではコードされないアミノ酸含有混合物の内の少なくとも1つの成分を有する、2つ以上のレラキシン、レラキシンダイマ

10

20

30

40

50

一、レラキシン類似体、アシル化レラキシン、またはアシル化レラキシン類似体の混合物を含んでもよいことが意図されている。本発明の別の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸を含む混合物の内の少なくとも1つの成分を有する2つ以上のレラキシン、レラキシン類似体、アシル化レラキシン、アシル化レラキシン類似体の混合物を含む製剤は、また、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸に結合された少なくとも1つの水溶性ポリマーを含む。

【0045】

本発明は、また、不均一混合物を含み、この場合、レラキシンポリペプチドおよびレラキシン類似体が発明で開示の方法により調製され、その後、混合されて、製剤がそれを必要としている患者に投与でき、その製剤は、例えば、25%のB鎖中の位置28に天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化されているレラキシンポリペプチド、25%のB鎖中の位置10に天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチド、水溶性ポリマーに結合した前記アミノ酸、および50%のレラキシンのB鎖中の位置31に天然ではコードされないアミノ酸（配列番号2；あるいは、配列番号4、6、8、10、または12）を有するレラキシンポリペプチドを含む。異なるパーセンテージのレラキシンポリペプチド変異体の全ての異なる混合物で、レラキシンポリペプチドは、（1）異なる大きさのPEGを有するか、または（2）PEGが配列中の異なる位置に含まれる、という多様性を含む。これは、例であり、本発明により可能となる製剤を限定するものと解釈されるべきでなく、また、当業者には明らかであろう。さらなる実施形態では、製剤混合物中に含まれるべきレラキシンポリペプチド変異体は、変動する解離時間により選択され、それを必要としている患者に、レラキシンの徐放を提供することができる。

【0046】

本発明の製剤は、グルカゴンを含んでもよい。

【0047】

吸入用の製剤を含む本発明の他の実施形態

さらなる本発明の実施形態では、肺への投与を介した患者の使用に対する強化された薬物動態学および薬力学的特性を有するレラキシン類似体の産生のために本明細書で開示の技術の使用が可能であり、投与後少なくとも6時間、さらに典型的には、少なくとも8、10、12、14、18、24時間以上持続するレラキシンの高められた血中濃度が得られる。別の本発明の実施形態は、吸入剤として患者に投与されるように計画された治療製剤に適するレラキシン類似体の有利な混合物を可能とする。

【0048】

一部の本発明の実施形態では、天然レラキシン分子中の以下の部位は、天然ではコードされないアミノ酸で置換されてもよく、さらに、任意選択で、水溶性ポリマー、例えば、PEGの共有結合によりさらに改変されてもよい：AおよびB鎖の2つのC末端、Arg22B、His10B、His5A、Glu4A、Glu17A、Glu13B、およびGlu21B。

【0049】

天然レラキシンに加えて、本発明は、1つまたは複数の水溶性ポリマー、例えば、PEGの組み込み用部位を提供することができるシグナル配列中に置換または挿入された1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を有する非天然のレラキシンポリペプチドおよびレラキシン類似体を提供する。この本発明の実施形態は、特に、レラキシン分子中に、例えば、改善された酵素分解耐性を有するPEG-レラキシンを形成するために、追加の、カスタマイズされたペグ化部位を導入するのに有用である。このような手法は、活性、安定性、溶解度、および薬理学的特性の間の所望のバランスを有する最適化レラキシンコンジュゲートの設計において、さらに大きな柔軟性を提供する。変異は、すなわち、レラキシン分子内の任意の番号の位置での部位特異的変異により行うことができる。本発明で使用するPEGは、直鎖、フォーク状、分岐、ダンベル型、等の種々の構造をとり得る。通常、PEGは、レラキシン分子上の所望の部位または複数部位に結合するのに適した活性化基で活性化される。活性化PEGは、レラキシンとの反応のために末端に反応基

を有する。代表的な活性化PEG誘導体およびこれらの薬剤をレラキシン等の薬剤にコンジュゲートする方法は当技術分野で既知であり、Zalipsky、S.、et al.、ポリエチレングリコール化学：バイオ技術および生物医学への応用（Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications）、中の「ポリペプチドの改変のための機能化ポリ（エチレングリコール）の使用（Use of Functionalized Poly（Ethylene Glycols）for Modification of Polypeptides）」J. M. Harris、Plenus Press、New York（1992）、およびAdvanced Drug Review、16：157-182（1995）にさらに記載されている。

10

【0050】

特定の本発明の実施形態では、コンジュゲートのPEG部分は、ポリマーまたはポリマーレラキシンコンジュゲートの水可溶性を大きく変えるのに効果的な1つまたは複数の親油性基が欠けている。すなわち、本発明のポリマーまたはコンジュゲートの非レラキシン部分は、親水性よりも親油性が大きいと考えられる原子の基（例えば、約2から8～12炭素原子を有する炭素鎖）を含むことができるが、しかし、このような基または複数基の存在が、ポリマーまたはコンジュゲートの親水性を大きく変えるのに有効でない場合は、このような成分を、本発明のコンジュゲート中に含むことができる。すなわち、レラキシン、レラキシンポリペプチド、およびレラキシン類似体の部位特異的変異により、本発明のレラキシンコンジュゲートそれ自体が、親油性または両親媒性ではなく、親水性を示してもよい。親油性成分が存在してもよい特定の本発明の実施形態では、その成分は、PEG鎖の末端に位置しないのが好ましい。

20

【0051】

本発明のコンジュゲートに使用される分岐PEGには、国際公開第96／21469号に記載のものが含まれる。この特許の内容は、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。通常、分岐PEGは、式 $R(PEG-OH)_n$ により表すことができ、ここで、Rは、中央の「コア」分子を表し、 n は、アームの数を表す。分岐PEGは、中央コアを有し、それから2つ以上の「PEG」アームが伸びている。分岐配置では、分枝高分子コアは、レラキシンに結合用の単一の反応部位を有する。本発明で使用する分岐PEGは、通常、4つ未満のPEGアームを含み、さらに好ましくは、3つ未満のPEGアームを含む。分岐PEGは、単一の反応部位を有する利点を提供し、直鎖PEGよりも大きな、より密度の高いポリマー雲で結合する。1つの特定のPEG分岐タイプは、 $(MeO-PEG)_pR-X$ で表すことができ、ここで、 p は2または3に等しく、Rは、中心コア構造、例えば、それに結合した2つまたは3つのPEGアームを有するリシンまたはグリセリンであり、Xは、レラキシンへの結合のために活性化しているか、または活性化されうる任意の適切な官能基を表す。1つの特に好ましい分岐PEGは、構造 $mPEG2$ -リシンスクシンイミドを有する $mPEG2-NHS$ （Shearwater Corporation、Alabama）である。

30

【0052】

さらに別の分岐構造では、「ペンダント型PEG」は、PEG鎖の末端よりはむしろPEG骨格に沿った位置のタンパク質結合用の反応基を有する。レラキシンとの結合のためにPEG骨格から伸びた反応基は、同じであっても、異なってもよい。ペンダント型PEG構造は、有用でありうるが、しかし、一般的には、特に、吸入のための組成物用としては、あまり好ましくない。

40

【0053】

あるいは、PEGレラキシンコンジュゲートのPEG部分は、ポリマー鎖の一端に分岐部分、およびレラキシンへの結合のために分岐部分に連結した2つ（または2の任意の倍数）の遊離反応基を有するフォーク型構造であってもよい。代表的フォーク型PEGは、国際公開第99／45964号に記載されている。この内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。フォーク型ポリエチレングリコールは、任意選択で、ポリマー鎖

50

の反対側の末端にアルキルまたは「R」基を含んでもよい。さらに具体的には、本発明によるフォーク型PEG-レラキシンコンジュゲートは、式： $R-PEG-L(Y-レラキシン)_n$ を有し、ここで、Rはアルキルであり、Lは加水分解的に安定な分岐点であり、Yはフォーク型ポリマーのレラキシンに対する化学結合を提供する結合基であり、nは2の倍数である。Lは、単一「コア」基、例えば、「 $-CH-$ 」を表してもよく、またはさらに長い原子鎖を含んでもよい。代表的L基には、リシン、グリセリン、ペンタエリスリトール、またはソルビトールが含まれる。通常、分岐部分内の特定の分岐部原子は炭素である。

【0054】

特定の本発明の実施形態では、フォーク型PEGのレラキシン分子に対する結合(Y)は、加水分解的に安定である。好ましい実施形態では、nは2である。レラキシン上の反応部位とのコンジュゲートの前に、適切なY部分には、限定されないが、活性エステル、活性炭酸塩、アルデヒド、イソシアナート、イソチオシアナート、エポキシド、アルコール、マレイミド、ビニルスルホン、ヒドラジド、ジチオピリジン、およびヨードアセトアミドが含まれる。適切な活性化基の選択は、所望のレラキシン分子への結合部位に依存し、当業者なら容易に決定できる。得られたPEG-レラキシンコンジュゲート中の対応するY基は、活性化フォーク型ポリマーのレラキシン上の適切な部位との反応から得られるものである。このような最終結合の特異的な固有の特性は、当業者には明らかであろう。例えば、反応性フォーク型PEGが、活性化エステル、例えば、スクシンイミドまたはマレイミドエステルを含む場合は、レラキシン上のアミン部位を介したコンジュゲーションは、対応するアミド結合の形成に繋がることになる。これらの特定のフォーク型ポリマーは、特に、魅力的である。理由は、それらが2:1以上のPEGに対するレラキシンのモル比率を有するコンジュゲートを提供するからである。このようなコンジュゲートは、レラキシン受容体部位をあまり遮断しそうにないが、それでも、酵素分解、例えば、レラキシン分解酵素に対しレラキシンを保護するための設計に対する柔軟性を提供する。

【0055】

関連実施形態では、フォーク型PEG-レラキシンコンジュゲートは、本発明で使用可能であり、式： $R-[PEG-L(Y-レラキシン)_2]_n$ で表される。この例では、Rは、それに結合した少なくとも1つのPEG-ジレラキシンコンジュゲートを有する天然ではコードされないアミノ酸を表す。具体的には、本発明の態様による好ましいフォーク型ポリマーは、nが、1、2、3、4、5、および6からなる群より選択されるものである。別の実施形態では、レラキシン内の非天然アミノ酸、レラキシンポリペプチド、またはレラキシン類似体およびポリマー分岐点の間の化学結合は、分解可能（すなわち、加水分解的に不安定）であってもよい。あるいは、1つまたは複数の分解可能結合がポリマー骨格に含まれ、インビボで最初に投与されたコンジュゲートより小さいPEG鎖を有するPEG-レラキシンコンジュゲートの生成を可能としてもよい。例えば、大きな、比較的不活性のコンジュゲート（すなわち、それに結合した1つまたは複数の高分子量PEG鎖、例えば、約10,000超の分子量を有する1つまたは複数のPEG鎖で、コンジュゲートが基本的に生物活性を持たない）が投与され、次に、肺中または血流中で、加水分解されて、元々存在するPEG鎖の部分を含む生理活性のコンジュゲートを生成することができる。加水分解的に分解可能な結合のインビボ切断に際し、遊離レラキシン（分解可能結合の位置に応じて）またはそれに結合された小さいポリエチレンタグを有するレラキシンが放出され、肺により、および/または血液中の循環により、より容易に吸収される。

【0056】

本発明のこの実施形態の1つの特徴では、全身性循環への放出の前のレラキシンの酵素分解とは対照的に、加水分解の前に、インタクトポリマー-コンジュゲートが投与時に最小に分解され、それにより、切断可能な結合の加水分解が、活性レラキシンの血流中への遅い放出速度を管理するのに有効となる。

【0057】

生理学的に切断可能な適切な結合には、限定されないが、エステル、炭酸塩エステル、カルバマート、硫酸塩、リン酸塩、アシルオキシアルキルエーテル、アセタール、およびケタールが含まれる。このようなコンジュゲートは、貯蔵および投与時に安定な生理学的に切断可能な結合を持たなくてはならない。例えば、PEG-切断可能結合-レラキシンコンジュゲートは、最終医薬組成物の製造時に、適切な送達媒体中の溶解時に、使用の場合には、経路に関わらず、投与時に、健全性を維持しなければならない。

【0058】

従って、別の本発明の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、単一鎖レラキシンまたは単一鎖レラキシン類似体に組み込まれる。

【0059】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、シグナル配列中の1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸の置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書内で開示のレラキシンまたはレラキシン類似体もしくはポリペプチドのいずれかのシグナル配列中の1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸の置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、シグナル配列中の1つまたは複数の天然でコードされるアミノ酸の置換、付加、または欠失、ならびに本明細書で開示のレラキシンまたはレラキシン類似体もしくはポリペプチドのいずれかのシグナル配列中の1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸の置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示のレラキシンまたはレラキシン類似体もしくはポリペプチドのいずれかの1つまたは複数の非天然アミノ酸がリーダーまたはシグナル配列中に組み込まれる。

【0060】

一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、限定されないが、タンパク質、ポリペプチド、小分子、または核酸を含む、レラキシンポリペプチド受容体または結合相手に対するレラキシンポリペプチドの親和性を調節する置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの安定性と比べた場合に、レラキシンポリペプチドの安定性を高める置換、付加、または欠失を含む。安定性および／または溶解度は、当業者には既知のいくつかの異なるアッセイを使って測定可能である。このようなアッセイには、限定されないが、SE-HPLCおよびRP-HPLCが含まれる。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの免疫原性と比べて、レラキシンポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの血清中半減期または循環時間に比べて、レラキシンポリペプチドの血清中半減期または循環時間を調節する置換、付加、または欠失を含む。

【0061】

一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの水溶解度に比べて、レラキシンポリペプチドの水溶解度を高める置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの溶解度に比べて、宿主細胞中で産生されたレラキシンポリペプチドの溶解度を高める置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンの発現または合成に比べて、宿主細胞中でのレラキシンポリペプチドの発現を増やすか、またはインビトロでの合成を増やす置換、付加、または欠失を含む。この置換を含むレラキシンポリペプチドは、アゴニスト活性を保持し、宿主細胞中での発現レベルの保持、または改善を行う。一部の実施形態では、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンのプロテアーゼ抵抗性に比べて、レラキシンポリペプチドは、レラキシンポリペプチドのプロテアーゼ抵抗性を高める置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシンポリペプチドとの相互作用に対する受容体の活性に比べて、レラキシン受容体のシグナル伝達活性を調節

する置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシシポリペプチドの結合に比べて、別の分子、例えば、受容体への結合を調節する置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシシポリペプチドの抗ウイルス活性に比べて、抗ウイルス活性を調節する置換、付加、または欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシシポリペプチドのブドウ糖代謝活性に比べて、ブドウ糖代謝活性を高める置換、付加、または欠失を含む。

【0062】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、置換、付加、または欠失のない対応するレラキシシの適合性に比べて、レラキシシポリペプチドの医薬品防腐剤（例えば、m-クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール）との適合性を高める置換、付加、または欠失を含む。この高められた適合性は、貯蔵中のタンパク質の生理化学的特性および生物活性を維持する保存用医薬製剤の調製を可能にするであろう。

【0063】

一部の実施形態では、1つまたは複数の操作された結合が、1つまたは複数の非天然アミノ酸を使って作られる。分子内の結合は、多くの方法で作ることができ、これには、限定されないが、タンパク質中の2つのアミノ酸の間の適切な条件下での反応（片方または両方のアミノ酸が、非天然アミノ酸であってよい）；それぞれが天然でコードされるものでも、または天然ではコードされないものでもよい2つのアミノ酸のリンカー、ポリマー、または他の分子との適切な条件下での反応；等が含まれる。

【0064】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸の置換は、1つまたは複数の天然に存在する、または天然ではコードされないアミノ酸を使って行うことができる。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチド中のアミノ酸の置換は、天然に存在する、または天然ではコードされないアミノ酸を使って行うことができる。ただし、少なくとも1つの置換が天然ではコードされないアミノ酸を使って行われる場合に限る。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸置換は、1つまたは複数の天然に存在するアミノ酸、および追加で、少なくとも1つの置換は、天然ではコードされないアミノ酸を使って行うことができる。

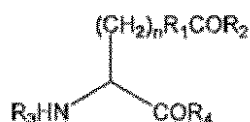
【0065】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、カルボニル基、アセチル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。

【0066】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、カルボニル基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、構造：

【化1】



を有する。

【0067】

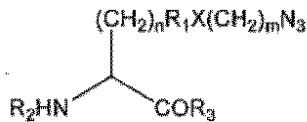
式中、nは0～10であり；R1はアルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり；R2はH、アルキル、アリール、置換アルキル、および置換アリールであり；R3はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり；さらに、R4はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

【0068】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、アミノオキシ基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、ヒドラジド基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、ヒドラジン基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸残基は、セミカルバジド基を含む。

【0069】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸残基は、アジド基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、構造：



10

を有する。

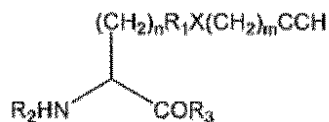
式中、nは0～10であり；R1はアルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、または存在せず；XはO、N、Sであるか、または存在せず；mは0～10であり；R2はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基、およびR3はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

【0070】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、アルキン基を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、構造：

20

【化3】



を有する。

式中、nは0～10であり；R1はアルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり；XはO、N、Sであるか、または存在せず；mは0～10であり；R2はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、およびR3はH、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

30

【0071】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、レラキシンポリペプチドアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆アゴニストである。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆アゴニストは、水溶性ポリマーに連結された天然ではコードされないアミノ酸を含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆アゴニストは、天然ではコードされないアミノ酸および1つまたは複数の翻訳後修飾、リンカー、ポリマー、または生物学的活性分子を含む。

40

【0072】

本発明は、また、ストリンジェント条件下、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および12のレラキシンポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。本発明は、また、ストリンジェント条件下、配列番号1および2のレラキシンポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。本発明は、また、ストリンジェント条件下、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および12で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたは複数ポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供し、ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのセクターコドンを含む。本発明は、また、ストリンジェント条件下、

50

配列番号 1 および 2 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたは複数ポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供し、ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つのセクターコドンを含む。本発明は、配列番号 1 および 2 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。本発明は、また、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および 12 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。本発明は、1 つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を有する配列番号 1 および 2 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。本発明は、また、1 つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を有する配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および 12 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸を提供する。いくつかの異なるポリヌクレオチドが、本発明のいずれかのポリペプチドをコードできることは、当業者には、容易に明らかになることである。

10

【0073】

一部の実施形態では、セクターコドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドン、5 塩基コドン、および 4 塩基コドンからなる群より選択される。

【0074】

本発明は、また、水溶性ポリマーに連結されたレラキシシポリペプチドの作製方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、天然ではコードされないアミノ酸を含む単離レラキシシポリペプチドを天然ではコードされないアミノ酸と反応する成分を含む水溶性ポリマーと接触させることを含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸が、それ以外の 20 の共通アミノ酸のいずれとも反応しない水溶性ポリマーと反応する。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸が、それ以外の 20 の共通アミノ酸のいずれとも反応しないリンカー、ポリマー、または生物学的に活性な分子と反応する。

20

【0075】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーに連結されたレラキシシポリペプチドは、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチドを、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基を含むポリ（エチレングリコール）分子と反応させることにより生成される。一部の実施形態では、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基は、アミド結合を介してポリ（エチレングリコール）分子に連結される。一部の実施形態では、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基は、カルバマート結合を介して、ポリ（エチレングリコール）分子と連結される。

30

【0076】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーに連結されたレラキシシポリペプチドは、カルボニル基を含むポリ（エチレングリコール）分子を、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基を含む天然ではコードされないアミノ酸含有ポリペプチドと反応させることにより作られる。

【0077】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーに連結されたレラキシシポリペプチドは、アルキン含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチドを、アジド部分を含むポリ（エチレングリコール）分子と反応させることにより作られる。一部の実施形態では、アジドまたはアルキン基は、アミド結合を介して、ポリ（エチレングリコール）分子に連結される。

40

【0078】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーに連結されたレラキシシポリペプチドは、アジド含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチドを、アルキン部分を含むポリ（エチレングリコール）分子と反応させることにより作られる。一部の実施形態では、アジドまたはアルキン基は、アミド結合を介して、ポリ（エチレングリコール）分子に連結される。

【0079】

50

一部の実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は、約0.1 kDa～約100 kDaの分子量を有する。一部の実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は、0.1 kDa～50 kDaの分子量を有する。

【0080】

一部の実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は、分枝高分子である。一部の実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分枝高分子の各分岐部は、1 kDa～100 kDa、または1 kDa～50 kDaの分子量を有する。

【0081】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに連結された水溶性ポリマーは、ポリアルキレングリコール部分を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸残基は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸残基は、カルボニル部分およびアミノオキシ、ヒドラジド、ヒドラジン、またはセミカルバジド部分含有水溶性ポリマーを含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸残基は、アルキン部分およびアジド部分含有水溶性ポリマーを含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸残基は、アジド部分およびアルキン部分含有水溶性ポリマーを含む。

10

【0082】

本発明は、また、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシシポリペプチドおよび薬学的に許容可能なキャリアーを含む組成物を提供する。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結される。

20

【0083】

本発明は、また、レラキシシポリペプチドをコードするセクターコドン含有ポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。一部の実施形態では、この細胞は、天然ではコードされないアミノ酸をレラキシシポリペプチド中へ置換するために、直交性RNAシンテターゼおよび／または直交tRNAを含む。

【0084】

本発明は、また、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシシポリペプチドを作る方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、レラキシシポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは複数ポリヌクレオチド、直交性RNAシンテターゼおよび／または直交tRNAを含む細胞を、レラキシシポリペプチドの発現を可能とする条件下で培養し、レラキシシポリペプチドを細胞および／または培地から精製することを含む。

30

【0085】

本発明は、また、レラキシシポリペプチドの治療の半減期、血清中半減期または循環時間を増加させる方法を提供する。本発明は、また、レラキシシポリペプチドの免疫原性を調節する方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、天然レラキシシポリペプチド中のいずれか1つまたは複数のアミノ酸を、天然ではコードされないアミノ酸で置換する、および／またはレラキシシポリペプチドを、リンカー、ポリマー、水溶性ポリマー、または生物学的に活性な分子に連結することを含む。

40

【0086】

本発明は、また、有効量の本発明のレラキシシ分子を使って、これによる治療を必要としている患者を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシシポリペプチドおよび薬学的に許容可能なキャリアーを含む治療有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、グリコシル化されている。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、グリコシル化されていない。

【0087】

50

本発明は、また、少なくとも1つのアミノ酸が、配列番号1および2で示される配列、または天然ではコードされないアミノ酸で置換されていることを除いた、いずれかの他のレラキシシポリペプチド配列（これらの非制限的例は、配列番号3～12であろう）を含むレラキシシポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）成分を含む。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。

【0088】

本発明は、また、薬学的に許容可能なキャリアー、および配列番号1～12で示される配列、または少なくとも1つのアミノ酸が天然ではコードされないアミノ酸で置換されているいずれかの他のレラキシシポリペプチド配列を含むレラキシシポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。本発明は、また、薬学的に許容可能なキャリアー、およびAおよびB鎖（例えば、配列番号1、2、および3；配列番号4および5または4および6は、レラキシシを作るであろう）、または少なくとも1つのアミノ酸が天然ではコードされないアミノ酸で置換されているいずれかの他のレラキシシポリペプチド配列を含むレラキシシポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。本発明は、また、薬学的に許容可能なキャリアー、および配列番号1、2、および／または3で示される配列を含むレラキシシポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。本発明は、また、薬学的に許容可能なキャリアー、および配列番号1～3で示される配列を含むレラキシシポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、サッカライド成分を含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、サッカライド成分を介してポリペプチドに連結される。一部の実施形態では、リンカー、ポリマー、または生物学的に活性な分子が、サッカライド成分を介してレラキシシポリペプチドに連結される。

【0089】

本発明は、また、単一アミノ酸の位置で、レラキシシポリペプチドに共有結合で連結された水溶性ポリマーを含むレラキシシポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）成分を含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーに共有結合で連結されたアミノ酸は、ポリペプチド中の天然ではコードされないアミノ酸である。

【0090】

本発明は、少なくとも1つのリンカー、ポリマー、または生物学的に活性な分子を含むレラキシシポリペプチドを提供し、前記リンカー、ポリマー、または生物学的に活性な分子は、リボソームによりポリペプチドに組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸の官能基を介してポリペプチドに結合される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、モノペグ化されている。本発明は、また、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸に結合されたリンカー、ポリマー、または生物学的に活性な分子を含むレラキシシポリペプチドを提供し、前記天然ではコードされないアミノ酸は、リボソームによりポリペプチドの事前選択した部位に組み込まれる。

【0091】

レラキシシリーダーまたはシグナル配列は、本発明の範囲に含まれ、これらの配列の一例は、プロインスリンとして認めることができる。選択された異種のリーダーまたはシグナル配列は、例えば、宿主細胞分泌系により認識および処理され、宿主細胞により分泌され、および可能ならシグナルペプチダーゼにより切断されるものでなければならない。本発明のレラキシシまたはレラキシシポリペプチドまたは類似体による状態または障害の治療方法は、シグナルまたはリーダーペプチドのある場合、または無い場合のレラキシシによる治療を含むことを意味する。

【0092】

本発明は、また、ブドウ糖代謝の増加を誘導する方法を提供し、前記方法は、ブドウ糖代謝活性の増加を誘導するのに有効な量のレラキシシを前記細胞に投与することを含む。

【0093】

別の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドの、限定されないが、PEGを含む別の分子へのコンジュゲーションは、非天然アミノ酸とのコンジュゲーションに使われる唯一の化学反応により、実質的に精製されたレラキシンを提供する。1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンの、PEG等の別の分子へのコンジュゲーションは、実質的に純粋なレラキシンを与えるためのコンジュゲーションステップの前に、または後に行われる他の精製技術で行ってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】図1は、置換のために選択された一部のアミノ酸残基位置に沿って示されたレラキシンの結晶構造のモデルである。

【図2】図2は、置換のために選択された一部のアミノ酸残基位置に沿って示されたレラキシンの結晶構造のモデルである。

【図3】図3は、置換のために選択された一部のアミノ酸残基位置に沿って示されたレラキシンの結晶構造のモデルである。

【図4】図4は、ヒトレラキシンのAおよびB鎖の構造図である。

【図5】図5は、鎖B1のアミノ酸をAlaとし、また、バリンを置換してA鎖の13番目のアミノ酸位置のパラアセチルフェニルアラニンとした方法により産生したプロレラキシンのSDS-PAGEゲルを示す。

【図6A】図6Aは、レーン1の分子量マーカーの隣に非ペグ化レラキシンV13pAFならびにレーン3および7（非還元（NR）および還元（R））の組換えおよび非組換えWTレラキシンのSDS-PAGEゲルを示す。Bは、レーン1の分子量マーカーの脇のレーン3および4（非還元（NR）および還元（R））のペグ化レラキシンV13pAFのSDS-PAGEゲルを示す。

【図7】図7は、種々のペグ化AVI3および野性型レラキシンポリペプチドに対するSDラット血清レラキシン濃度（ng/mL）の経時グラフを示す。

【図8A】図8Aは、実施例40の全PEG-RLX皮下投与群に対する群平均血清濃度VS時間の比較グラフである。単回注射用量を各動物に投与した。各群あたりN=5。記号は、群の血清濃度VS時間の平均±SDを示す。

【図8B】図8Bは、0.5mg/kgの20KPEG-AQ1-RLX皮下投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図9A】図9Aは、0.5mg/kgのPEG20-AA5-RLX皮下投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図9B】図9Bは、0.5mg/kgのPEG20-AR18-RLX皮下投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図10A】図10Aは、0.5mg/kgのPEG20-BV7-RLX静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回静脈内用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図10B】図10Bは、0.5mg/kgのPEG20-BW28-RLX静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回静脈内用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図11】図11は、0.5mg/kgのPEG20-AV13-RLX静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度-時間曲線のグラフである。単回静脈内用量を各動物に投与した。各群、N=5動物。

【図12A】図12Aは、皮下投与wtrhレラキシンに対する群平均血清濃度VS時間の比較のグラフである。単回注射用量を各動物に投与した。群あたりN=5動物。

10

20

30

40

50

【図12B】図12Bは、0.5mg/kgのwtrhレラキシン静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度－時間曲線のグラフである。単回静脈内用量を各動物に投与した。各群当たり、N＝5動物。

【図13A】図13Aは、皮下または静脈内投与全PEG－RLX群に対する群平均血清濃度VS時間の比較のグラフである。単回注射用量を各動物に投与した。群あたりN＝3～5動物。

【図13B】図13Bは、0.25mg/kgの20KPEG－AQ1－RLX静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度－時間曲線のグラフである。単回静脈内用量を各動物に投与した。各群当たり、N＝4動物。

【図14A】図14Aは、0.5mg/kgのPEG20－AQ1－RLX皮下投与SDラットの個別動物血清濃度－時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群当たり、N＝5動物。

【図14B】図14Bは、0.25mg/kgのPEG20－AQ1－RLX皮下投与SDラットの個別動物血清濃度－時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群当たり、N＝3動物。

【図15】図15は、0.125mg/kgのPEG20－AQ1－RLX静脈内投与SDラットの個別動物血清濃度－時間曲線のグラフである。単回皮下用量を各動物に投与した。各群当たり、N＝5動物。

【図16A】図16Aは、平均PEG－レラキシン消失半減期VS投与量のグラフである。エラーバー＝SD。

【図16B】図16Bは、平均PEG－レラキシンAUC_{inf}VS投与量のグラフである。エラーバー＝SD。

【図17A】図17Aは、平均PEG－レラキシンC_{max}VS投与量のグラフである。エラーバー＝SD。

【図17B】図17Bは、平均PEG－レラキシンクリアランスVS投与量の得グラフである。エラーバー＝SD。

【図18A】図18Aは、平均PEG－レラキシン量分布VS投与量のグラフである。エラーバー＝SD。

【図18B】図18Bは、0.25mg/kgの20KPEG－AQ1レラキシン単回静脈内または皮下注射後の、血清濃度－時間の比較グラフである。

【図19A】図19のパートA～Fは、実施例43のフェーズI由来のデータを示す。図19Aは、水摂取量と尿量に与える野性型レラキシンのIV注入の効果を示す。

【図19B】図19Bは、フェーズIの－16～0時間のロングエバンスラット各群に対するベースライン尿量を示す。

【図19C】図19Cは、ヘマトクリットに対する野性型レラキシンIV注入の効果を示す。

【図19D】図19Dは、雌ロングエバンスラットにおける血漿BUNに対する野性型レラキシンIV注入の効果を示す。

【図19E】図19Eは、フェーズIの0～6時間のロングエバンスラット各群に対する水摂取量を示す。

【図19F】図19Fは、フェーズIの0～6時間のロングエバンスラット各群に対する尿量を示す。

【図20A】図20のパートA～Iは、実施例43の、ピークル（対照群）および位置1のPEGに結合したpAFにより置換されたA鎖を有する20KPEG－レラキシン変異体の0.1X、0.3Xおよび1X投与を含む試験群への投与後のフェーズII由来のデータを示す。図20Aは、水摂取量および尿量に対する効果を示す。

【図20B】図20Bは、注射後のロングエバンスラット各群の血漿ナトリウム変化レベルに対する効果を示す。

【図20C】図20Cは、注射後のロングエバンスラット各群の血漿ナトリウムレベルに対する効果を示す。

10

20

30

40

50

【図 20D】図 20D は、PEG-レラキシンの血漿容量オスモル濃度に対する効果を示す。

【図 20E】図 20E は、PEG-レラキシンの IV 注入の血漿容量オスモル濃度変化に対する効果を示す。

【図 20F】図 20F は、PEG-レラキシンの投与の BUN レベルに対する効果を示す。

【図 20G】図 20G は、フェーズ II の 0～6 時間の PEG-レラキシンの投与のロングエバンスラット各群の水摂取量に対する効果を示す。

【図 20H】図 20H は、フェーズ II の -16～0 時間のベースラインのロングエバンスラット各群の尿量を示す。

【図 20I】図 20I は、フェーズ II の 0～6 時間のロングエバンスラット各群の尿量に対する PEG-レラキシンの投与の効果を示す。

10

【0095】

定義

本発明は、本明細書記載の特定の方法、プロトコル、細胞株、構築物、および試薬に限定されず、変更してもよいことは理解されよう。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためのものであり、本発明の範囲を制限する意図はなく、本発明の範囲は、添付の請求項のみにより限定されることは理解されよう。

【0096】

本明細書および添付の請求項で使われる、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈から明確に別義が示されなければ、複数の参照を含む。従って、例えば、「レラキシ」または「レラキシポリペプチド」ならびに種々のハイフンで結んだおよびハイフンで結ばない形への参照は、1 つまたは複数のこのようなタンパク質への参照であり、当業者に既知のその等価物を含む、等々。

20

【0097】

特に断らなければ、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者に通常理解されているのと同じ意味を有する。本明細書記載のものに類似または等価ないずれかの方法、装置、および物質は、本発明の実施または試験に使用可能であるが、好ましい方法、装置および物質は、以降で記載される。

【0098】

本明細書で取り上げられる全ての出版物および特許は、出版物に記載されている、例えば、本発明に関連して使用できる可能性がある構築物や方法の説明および開示の目的で、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で考察される出版物は、本出願の出願日の前のそれらの開示の目的のみで提供される。本明細書中のどのような内容も、発明者が、先行発明の理由またはいずれかの他の理由で、このような開示に先行する権利がないことを承認するものと解釈されるべきではない。

30

【0099】

用語の「実質的に精製された」は、実質的にまたは基本的に、天然環境中、すなわち、組換え産生レラキシポリペプチドの場合には、天然の細胞、または宿主細胞中で、認められる、通常、タンパク質に随伴するまたは相互に混じり合う成分を含まないレラキシポリペプチドを意味する。実質的に細胞材料を含まないレラキシポリペプチドは、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、または約 1% 未満（乾燥重量で）の混入タンパク質を有するタンパク質調製物を含む。レラキシポリペプチドまたはその変異体が、宿主細胞により組換え産生される場合は、タンパク質は、細胞の乾燥重量の約 30%、約 25%、約 20%、約 15%、約 10%、約 5%、約 4%、約 3%、約 2%、または約 1% もしくはそれ未満で存在してもよい。レラキシポリペプチドまたはその変異体が、宿主細胞により組換え産生される場合は、タンパク質、培地中で、細胞の乾燥重量の約 5 g/L、約 4 g/L、約 3 g/L、約 2 g/L、約 1 g/L、約 750 mg/L、約 500 mg/L、約 250 mg/L、約 100 mg/L、約 50 mg/L、約 10 mg/L、または約 1 mg/L もしくはそれ未満で存在してもよい。従って、適切な方法、例えば、SDS/

40

50

PAGE分析、RP-HPLC、SEC、およびキャピラリー電気泳動法により測定して、本発明の方法により産生される「実質的に精製された」レキシシンポリペプチドは、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度レベル、特に、少なくとも約75%、80%、85%、およびそれ超の純度レベル、特に、少なくとも約90%の純度レベル、少なくとも約95%の純度レベル、少なくとも約99%以上の純度レベルであってもよい。

【0100】

「組換え型宿主細胞」または「宿主細胞」は、挿入に使用される方法、例えば、直接取込、形質導入、f-接合(f-mating)、または当分野で既知の組換え型宿主細胞を形成する他の方法にかかわらず、外因性のポリヌクレオチドを含む細胞を意味する。外因性のポリヌクレオチドは、非組込み型ベクター、例えば、プラスミドとして保持されてもよく、あるいは、宿主ゲノム中に組み込まれてもよい。

10

【0101】

本明細書で使用される用語の「培地(medium)」または「培地(media)」は、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳類宿主細胞、CHO細胞、原核生物宿主細胞、大腸菌、またはシュドモナス宿主細胞、等のいずれかの宿主細胞、および細胞含有物を支持または含むことができるいずれかの培地、溶液、固形、半固形、または剛体支持体を含む。従って、この用語は、増殖ステップの前または後の培地を含む、その中で宿主細胞が増殖する培地、例えば、その中にレキシシンポリペプチドが分泌された培地、を包含してもよい。この用語は、また、例えば、レキシシンポリペプチドが細胞内で産生され、宿主細胞が溶解されるか、または破壊されて、レキシシンポリペプチドを放出する場合の、宿主細胞ライセートを含む緩衝液または試薬を包含してもよい。

20

【0102】

タンパク質リフォールディングに関連して本明細書で使われる「還元剤」は、還元状態でスルフヒドリル基を持ち、分子内または分子間ジスルフィド結合を還元するいずれかの化合物または材料と定義される。適切な還元剤には、限定されないが、ジチオトレイトール(DTT)、2-メルカプトエタノール、ジチオエリスリトール、システイン、システアミン(2-アミノエタンチオール)、および還元グルタチオンが含まれる。各種の還元剤が本発明の方法および組成物での使用に適切であることは、当業者には自明であろう。

30

【0103】

タンパク質リフォールディングに関連して本明細書で使われる「酸化剤」は、酸化される化合物から電子を取り除くことができるいずれかの化合物または材料と定義される。適切な酸化剤には、限定されないが、酸化グルタチオン、シスチン、シスタミン、酸化ジチオトレイトール、酸化エリスリトール、および酸素が含まれる。各種の酸化剤が本発明の方法および組成物での使用に適切であることは、当業者には自明であろう。

【0104】

本明細書で使用される「変性剤(Denaturing agent)」または「変性剤(denaturant)」は、タンパク質の可逆的アンフォールディングを起こすいずれかの化合物または材料と定義される。変性剤(Denaturing agent)または変性剤(denaturant)の強さは、特定の変性剤(Denaturing agent)または変性剤(denaturant)の特性と濃度の両方により測定される。適切な変性剤(Denaturing agent)または変性剤(denaturant)は、カオトロープ、洗浄剤、有機溶剤、水混和性溶剤、リン脂質、またはこのような薬剤の2つ以上の組み合わせであってもよい。適切なカオトロープには、限定されないが、尿素、グアニジン、およびナトリウムチオシアナートが含まれる。有用な洗浄剤には、限定されないが、強力洗浄剤、例えば、ナトリウムドデシル硫酸塩、またはポリオキシエチレンエーテル(例えば、ツイーンまたはトリトン洗浄剤)、サルコシル、マイルド非イオン性洗浄剤(例えば、ジギトニン)、マイルド陽イオン洗浄剤、例えば、N-(

40

50

2、3-オレイルオキシ)-プロピル-N、N、N-トリメチルアンモニウム、マイルドイオン洗浄剤（例えば、コール酸ナトリウムまたはデオキシコール酸ナトリウム）または限定されないが、スルホベタイン（両性界面活性剤）、3（（3-コールアミドプロピル）ジメチルアミノ）-1-プロパンスルホナート（CHAPS）、および3-（（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ）-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホナート（CHAPSO）等の双性イオン洗浄剤を含んでもよい。有機、水混和性溶剤、例えば、アセトニトリル、低級アルカノール（特に、C2～C4アルカノール、例えば、エタノールまたはイソプロパノール）、または低級アルカンジオール（特に、C2～C4アルカンジオール、例えば、エチレングリコール）は、変性剤として使用可能である。本発明に有用なリン脂質は、天然リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルイノシトールまたは合成リン脂質誘導体もしくは変異体、例えば、ジヘキサノイルホスファチジルコリンまたはジヘプタノイルホスファチジルコリンであってもよい。

10

【0105】

本明細書で使われる「リフォールディング」は、ジスルフィド結合含有ポリペプチドを、ジスルフィド結合を基準にして、不適切な折り畳み、または折り畳まれていない状態から、天然のまたは正しい折り畳み高次構造に変換するいずれかのプロセス、反応または方法を意味する。

【0106】

本明細書で使われる「コフォールディング」は、特に、相互に作用する少なくとも2つのポリペプチドを用いて、折り畳まれていない、または不適切な折り畳みポリペプチドを天然の、正しい折り畳みのポリペプチドへの変換を行うリフォールディングプロセス、反応、または方法を意味する。

20

【0107】

本明細書で使われる用語の「プロインスリン」は、式：B-C-Aの適切なクロスライントタンパク質であり、

式中：

Aは、レラキシンのA鎖またはその機能性誘導体であり；

Bは、レラキシンのB鎖またはε-アミノ基を有するその機能性誘導体であり；さらに

Cは、プロインスリンの連結ペプチドである。好ましくは、プロインスリンは、ヒトレラキシンのA鎖、ヒトレラキシンのB鎖であり、また、Cは、天然連結ペプチドである。プロインスリンが天然配列の場合は、プロインスリンは、3つの遊離アミノ基：フェニルアラニン（1）（α-アミノ基）、リシン（29）（ε-アミノ基）およびリシン（64）（ε-アミノ基）を有する。

30

【0108】

本明細書で使われる用語の「レラキシン類似体」は、式：A-Bのレラキシン活性を示す適切なクロスライントタンパク質であり、

式中：

Aは、レラキシンのA鎖、またはレラキシンA鎖の機能性誘導体であり；また、Bは、レラキシンのB鎖またはε-アミノ基を有するレラキシンB鎖の機能性誘導体であり、少なくともAまたはBの内の1つが、天然配列からのアミノ酸改変を含む。

40

【0109】

本明細書では、用語レラキシンが複数の、または一般的な感覚で使われる場合はいつでも、天然インスリンならびにそのレラキシン類似体および誘導体が包含されることが意図されている。本明細書で使われる「レラキシンポリペプチド」は、Cys^{A7}およびCys^{B7}の間、ならびにCys^{A20}およびCys^{B19}の間にジスルフィド架橋、ならびにCys^{A6}およびCys^{A11}の間に内部ジスルフィド架橋を含む、ヒトレラキシンに類似の分子構造を持ち、レラキシン活性を有する化合物を意味する。

【0110】

本明細書で使われる用語の「レラキシン」は、ヒトレラキシンを指し、そのアミノ酸配

50

列および空間構造は、よく知られている。ヒトレラキシンは、ジスルフィド結合で架橋した21アミノ酸のA鎖および30アミノ酸のB鎖から構成される。適切に架橋したレラキシンは、3つのジスルフィド架橋を含み：1つはA鎖の位置7およびB鎖の位置7の間、2つめは、A鎖の位置20およびB鎖の位置19の間、および3つめは、A鎖の位置6および11の間、である[Nicol, D. S. H. W. and Smith, L. F., Nature, 187, 483-485 (1960)]。

【0111】

レラキシンペプチドは、限定されないが、レラキシン、ヒト；レラキシン、ブタ；IGF-1、ヒト；レラキシン様増殖因子II(69-84)；プロレラキシン様増殖因子II(68-102)、ヒト；プロレラキシン様増殖因子II(105-128)、ヒト；[AspB28]-レラキシン、ヒト；[LysB28]-レラキシン、ヒト；[LeuB28]-レラキシン、ヒト；[ValB28]-レラキシン、ヒト；[AlaB28]-レラキシン、ヒト；[AspB28, ProB29]-レラキシン、ヒト；[LysB28, ProB29]-レラキシン、ヒト；[LeuB28, ProB29]-レラキシン、ヒト；[ValB28, ProB29]-レラキシン、ヒト；[AlaB28, ProB29]-レラキシン、ヒト；[GlyA21]-レラキシン、ヒト；[GlyA21GlnB3]-レラキシン、ヒト；[AlaA21]-レラキシン、ヒト；[AlaA21Gln^{B3}]-レラキシン、ヒト；[GlnB3]-レラキシン、ヒト；[GlnB30]-レラキシン、ヒト；[GlyA21GluB30]-レラキシン、ヒト；[GlyA21GlnB3GluB30]-レラキシン、ヒト；[GlnB3GluB30]-レラキシン、ヒト；B22~B30レラキシン、ヒト；B23~B30レラキシン、ヒト；B25~B30レラキシン、ヒト；B26~B30レラキシン、ヒト；B27~B30レラキシン、ヒト；B29~B30レラキシン、ヒト；ヒトレラキシンのA鎖、およびヒトレラキシンのB鎖、を含む。

【0112】

用語の「レラキシン類似体」は、実質的にヒトレラキシンのそれぞれA鎖および／またはB鎖と同じアミノ酸配列を有するが、レラキシン類似体のレラキシン活性を破壊しない1つまたは複数のアミノ酸欠失、1つまたは複数のアミノ酸置換、および／または1つまたは複数のアミノ酸付加を有する点で、ヒトレラキシンのA鎖およびB鎖とは異なるA鎖およびB鎖を有するタンパク質を意味する。レラキシンの等電点「より高い」等電点を有するレラキシン類似体は、レラキシン類似体の1つの型である。別の型のレラキシン類似体は、「モノマーレラキシン類似体」である。

【0113】

「モノマーレラキシン類似体」は、ヒトレラキシンの速効性類似体であり、例えば、位置B28のProが、Asp、Lys、Leu、Val、またはAlaで置換され、位置B29のLysがLysであるか、またはProで置換されているヒトレラキシンを含む。des(B27)ヒトレラキシンとしても知られる別のモノマーレラキシン類似体は、B鎖位置27のThrが、欠失しているヒトレラキシンである。モノマーレラキシン類似体は、Chance, R. E., et al., 米国特許第5, 514, 646号(1996年5月7日発行)；Brems, D. N., et al. Protein Engineering, 5, 527-533(1992)；Brange, J. J. V., et al., 欧州特許第214, 826号(1987年3月18日発行)；およびBrange, J. J. V., et al., Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940(1991)、に記載されている。本製剤に採用されるモノマーレラキシン類似体は、ヒトレラキシンと同じ位置で適切に架橋している。

【0114】

レラキシンペプチドは、限定されないが、レラキシン、ヒト；レラキシン、ブタ；IGF-I、ヒト；レラキシン様増殖因子II(69~84)；プロレラキシン様増殖因子II(68~102)、ヒト；プロレラキシン様増殖因子II(105~128)、ヒト；

[A s p B 2 8] -レラキシン、ヒト；[L y s B 2 8] -レラキシン、ヒト；[L e u B 2 8] -レラキシン、ヒト；[V a l B 2 8] -レラキシン、ヒト；[A l a B 2 8] -レラキシン、ヒト；[A s p B 2 8、P r o B 2 9] -レラキシン、ヒト；[L y s B 2 8、P r o B 2 9] -レラキシン、ヒト；[L e u B 2 8、P r o B 2 9] -レラキシン、ヒト；[V a l B 2 8、P r o B 2 9] -レラキシン、ヒト；[A l a B 2 8、P r o B 2 9] -レラキシン、ヒト；[G l y A 2 1] -レラキシン、ヒト；[G l y A 2 1 G l n B 3] -レラキシン、ヒト；[A l a A 2 1] -レラキシン、ヒト；[A l a A 2 1 G l n^{B 3}] -レラキシン、ヒト；[G l n B 3] -レラキシン、ヒト；[G l n B 3 0] -レラキシン、ヒト；[G l y A 2 1 G l u B 3 0] -レラキシン、ヒト；[G l y A 2 1 G l n B 3 G l u B 3 0] -レラキシン、ヒト；[G l n B 3 G l u B 3 0] -レラキシン、ヒト；B 2 2-B 3 0レラキシン、ヒト；B 2 3-B 3 0レラキシン、ヒト；B 2 5-B 3 0レラキシン、ヒト；B 2 6-B 3 0レラキシン、ヒト；B 2 7-B 3 0レラキシン、ヒト；B 2 9-B 3 0レラキシン、ヒト；ヒトレラキシンA鎖、およびヒトレラキシンB鎖を含む。

10

【0115】

さらなる態様では、本発明は、変異体タンパク質をコードする組換え核酸、変異体核酸を含む発現ベクター、変異体核酸および／または発現ベクターを含む宿主細胞、および変異体タンパク質を産生する方法、を提供する。さらなる態様では、本発明は、医薬品キャリアを、通常、含む治療有効量の変異体タンパク質を患者に投与することによるレラキシン応答性障害の治療を提供する。さらなる態様では、本発明は、MHC C l a s s I I エピトープを変えることにより、レラキシンポリペプチドの免疫原性を調節する（特に、免疫原性を低減させる）方法を提供する。

20

【0116】

用語の「レラキシンポリペプチド」は、また、薬学的に許容可能な塩ならびにプロドラッグ、および塩のプロドラッグ、多形、水和物、溶媒和物、生物学的に活性な断片、生物学的に活性な変異体および天然レラキシンの立体異性体、ならびに天然レラキシンのアゴニスト、擬態性、およびアンタゴニスト変異体、およびそのポリペプチド融合体を含む。アミノ末端、カルボキシル末端、またはその両方に追加のアミノ酸を含む融合体は、用語の「レラキシンポリペプチド」に包含される。代表的融合体は、限定されないが、例えば、リーダーまたはシグナルペプチドまたはその一部を欠いたメチオニンが、成熟型のレラキシンの組換え体発現から得られたレラキシンのN末端に連結されているメチオニルレラキシン（メチオニンが結合した組換え体発現から得られたレラキシンのN末端に連結される）、のための融合体（限定されないが、ポリヒスチジンまたは親和性エピトープへの精製を含む）、血清アルブミン結合ペプチドとの融合体および血清タンパク質、例えば、血清アルブミンとの融合体、を含む。米国特許第5, 750, 373号（参照によって本明細書に組み込まれる）は、新規タンパク質、例えば、成長ホルモンおよびそれぞれの受容体分子に対する改変された結合特性を有する抗体断片変異体、を選択する方法を記載している。この方法は、対象タンパク質をコードする遺伝子を、繊維状ファージM13の遺伝子I I Iコートタンパク質のカルボキシル末端ドメイン、レラキシンを含むキメラ分子および1つまたは複数の他の分子に融合することを含む。キメラ分子は、レラキシンまたは他の分子の片方または両方の特異的領域または断片を含むことができる。いずれかのこのような断片は、標準的な生化学的方法により、または断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることにより、タンパク質から調製できる。レラキシン、またはその断片は、人血清アルブミン（HSA）、Fc、またはそれらの一部を含む融合タンパク質として産生可能である。このような融合構築物は、レラキシン、またはその断片の、真核生物宿主細胞中での発現強化のために適している。代表的HSA部分は、N末端ポリペプチド（アミノ酸1～369、1～419、およびアミノ酸1から始まる中間の長さ）を含む（米国特許第5, 766, 883号、および国際公開第97/24445号に記載。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる）。他のキメラポリペプチドは、HSAのC末端側およびN末端側終端のそれぞれに結合した、レラキシンを有するHSAタンパク質、ま

30

40

50

たはその断片を含んでもよい。このようなH S A構築物は、米国特許第5, 876, 969号に開示されている。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。他の融合体は、レラキシンを、a) 免疫グロブリンのFc部；b) 免疫グロブリンのFc部の類似体；およびc) 免疫グロブリンのFc部の断片、と融合することにより作製できる。

【0117】

種々の文献により、ポリマーコンジュゲーションまたはグリコシル化によるポリペプチドの改変について開示されている。用語の「レラキシシポリペプチド」は、ポリマー、例えば、PEGにコンジュゲートされたポリペプチドを含み、さらに、システイン、リシン、または他の残基の1つまたは複数の追加の誘導体化から構成されてもよい。さらに、レラキシシポリペプチドは、リンカーまたはポリマーを含んでもよく、この場合、リンカーまたはポリマーがコンジュゲートされるアミノ酸は、本発明による非天然アミノ酸であっても、またはリシンまたはシステインへの結合等の当技術分野で既知の技術を利用して、天然でコードされるアミノ酸にコンジュゲートしてもよい。

10

【0118】

用語の「レラキシシポリペプチド」は、また、グリコシル化レラキシシ、例えば、限定されないが、いずれかのアミノ酸位置でグリコシル化されたポリペプチド、N結合またはO結合グリコシル化型のポリペプチドを含む。単一ヌクレオチド変化を含む変異体もまた、レラキシシポリペプチドの生物学的に活性な変異体と見なされる。さらに、スプライス変異体も含まれる。また、用語の「レラキシシポリペプチド」は、いずれか1つまたは複数のレラキシシポリペプチドのレラキシシポリペプチドヘテロダイマー、ホモダイマー、ヘテロマルチマー、またはホモマルチマー、またはいずれかの他のポリペプチド、タンパク質、炭水化物、ポリマー、小分子、リンカー、リガンド、または化学手段により連結された、または融合タンパク質として発現された他の生物学的に活性な任意の型の分子、ならびに例えば、特異的欠失または生物活性を維持している他の改変を含むポリペプチド類似体、を含む。

20

【0119】

用語の「レラキシシポリペプチド」または「レラキシシ」は、1つまたは複数のアミノ酸置換、付加または欠失を含むレラキシシポリペプチドを包含する。本発明のレラキシシポリペプチドは、1つまたは複数の非天然アミノ酸の改変と併せて、1つまたは複数の天然アミノ酸の改変から構成されてもよい。限定されないが、医薬品安定性を調節する置換、1つまたは複数のレラキシシポリペプチド生物活性を調節する置換、例えば、限定されないが、アゴニスト活性の増加、ポリペプチドの溶解度の増加、プロテアーゼ感受性の減少、ポリペプチドのアンタゴニストへの変換、等、を含む天然レラキシシポリペプチド中の種々のアミノ酸位置の代表的置換が報告されており、これらは、用語の「レラキシシポリペプチド」に包含される。一部の実施形態では、レラキシシアンタゴニストは、レラキシシ分子の受容体結合領域に存在する水溶性ポリマーに連結された天然ではコードされないアミノ酸を含む。

30

【0120】

一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、レラキシシポリペプチドの生物活性を調節する付加、置換または欠失をさらに含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、レラキシシポリペプチドの抗ウイルス活性を調節する付加、置換または欠失をさらに含む。一部の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、レラキシシポリペプチドの抗ウイルス活性を高める付加、置換または欠失をさらに含む。例えば、付加、置換または欠失は、1つまたは複数のレラキシシの特性または活性を調節してもよい。例えば、付加、置換または欠失は、レラキシシ受容体の親和性の調節、循環半減期の調節、治療半減期の調節、ポリペプチド安定性の調節、プロテアーゼによる切断の調節、用量の調節、放出またはバイオアベイラビリティの調節、精製の促進、または特定の投与経路を改善または変更ができる。同様に、レラキシシポリペプチドは、プロテアーゼ切断配列、反応基、抗体結合ドメイン（限定されないが、FLAGまたはポリHisを含む）または他の親和性に基づく配列（限定されないが、FLAG、ポリHis、GST、等を含む）または検出

40

50

(限定されないが、G F Pを含む)、精製またはポリペプチドの他の特性を改善する連結分子(限定されないが、ビオチンを含む)を含んでもよい。

【0121】

用語の「レラキシンポリペプチド」は、また、同じまたは異なる天然ではコードされないアミノ酸側鎖に、天然でコードされるアミノ酸側鎖に、またはリンカーを介して間接的に連結(限定されないが、天然ではコードされないアミノ酸側鎖を介して直接連結されたものを含む)されるホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、およびヘテロマルチマーを包含する。代表的リンカーには、限定されないが、小分子有機化合物、種々の長さの水溶性ポリマー、例えば、ポリ(エチレングリコール)またはポリデキストラン、または種々の長さのポリペプチドが含まれる。

10

【0122】

「天然ではコードされない(non-naturally encoded)アミノ酸」は、20共通アミノ酸またはピロールリジンまたはセレノシステインの内の1つではないアミノ酸を指す。用語「天然ではコードされない(non-naturally encoded)アミノ酸」と同義に使うことができる他の用語は、「非天然(non-natural)アミノ酸」「非天然(unnatural)アミノ酸」「天然に存在しない(non-naturally-occurring)アミノ酸」ならびに、それらの様々な位置にハイフォン挿入した、およびハイフォン挿入のないバージョンである。用語の「天然ではコードされないアミノ酸」は、また、限定されないが、天然でコードされるアミノ酸(限定されないが、20共通アミノ酸またはピロールリジンおよびセレノシステインを含む)の改変(例えば、翻訳後修飾)により生成されるアミノ酸であるが、翻訳複合体により成長するポリペプチド鎖中に天然で組み込まれるものではないアミノ酸を含む。このような天然に存在しないアミノ酸の例には、限定されないが、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-トレオニン、およびO-フォスフォチロシンが含まれる。

20

【0123】

「アミノ末端修飾基」は、ポリペプチドのアミノ末端に結合可能ないずれかの分子を指す。同様に、「カルボキシ末端修飾基」は、ポリペプチドのカルボキシ末端に結合可能ないずれかの分子を指す。末端修飾基には、限定されないが、種々の水溶性ポリマー、ペプチドまたはタンパク質、例えば、血清アルブミン、またはペプチド血清半減期を延長する他の成分が含まれる。

30

【0124】

用語の「官能基」、「活性成分」、「活性化基」、「脱離基」、「反応部位」、「化学反応基」および「化学反応成分」は、当技術分野および本明細書で使用される分子の別々の、限定できる部分またはユニットを指す。この用語は、化学技術分野では幾分同義語的であり、本明細書では、一部の機能または活性を示し、他の分子と反応する分子の一部を指す。

【0125】

本明細書で使われる用語の「結合」または「リンカー」は、通常、化学反応の結果形成され、典型的には、共有結合である基または結合を指すのに使われる。加水分解的に安定な結合は、結合が、水中で実質的に安定であり、限定されないが、場合によっては、永遠も含む長期間、生理学的条件下等で、有用なpH値で水と反応しないことを意味する。加水分解的に不安定または分解可能な結合は、結合が例えば、血液中を含む水中または水溶液中で分解可能であることを意味する。酵素的に不安定または分解可能な結合は、結合が1つまたは複数の酵素により分解されうることを意味する。当技術分野で理解されているように、PEGおよび関連ポリマーは、ポリマー骨格またはポリマー骨格と1つまたは複数のポリマー分子の末端官能基の間のリンカー基中に分解可能な結合を含むことができる。例えば、PEGカルボン酸または活性化PEGカルボン酸と、生理活性物質上のアルコール基との反応により形成されたエステル結合は、通常、生理学的条件下で加水分解して、薬剤を放出する。他の加水分解により分解可能な結合には、限定されないが、炭酸塩結

40

50

合；アミンとアルデヒドの反応により得られるイミン結合；アルコールとリン酸基の反応により形成されるリン酸塩エステル結合；ヒドラジドとアルデヒドの反応生成物であるヒドラゾン結合；アルデヒドとアルコールの反応生成物であるアセタール結合；蟻酸塩とアルコールの反応生成物であるオルトエステル結合；アミン基（限定されないが、ポリマー、例えば、PEGの末端にあるものを含む）とペプチドのカルボキシル基により形成されるペプチド結合；およびホスホラミダイト基（限定されないが、ポリマーの末端にあるものを含む）とオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基により形成されるオリゴヌクレオチド結合、が含まれる。

【0126】

本明細書で使われる場合の用語の「生物学的に活性な分子」、「生物学的に活性な成分」または「生理活性物質」は、生物学系、経路、分子、または生物に関する相互作用のいずれかの物理的または生化学的特性に影響を及ぼすことができるいずれかの物質を意味し、限定されないが、ウイルス、細菌、バクテリオファージ、トランスポゾン、プリオン、昆虫、真菌、植物、動物、およびヒトを含む。本明細書で使われるように、特に、生物学的に活性な分子は、限定されないが、ヒトまたは他の動物の疾患の診断、治癒、軽減、治療、または予防のための、またはそれ以外には、ヒトまたは動物の肉体的または精神的な満足な状態を高めるためのいずれかの物質を含む。生物学的に活性な分子の例には、限定されないが、ペプチド、タンパク質、酵素、小分子薬剤、ワクチン剤、免疫原、ハードドラッグ、ソフトドラッグ、炭水化物、無機原子または分子、色素、脂質、ヌクレオシド、放射性核種、オリゴヌクレオチド、トキシノイド、毒素、原核および真核細胞、ウイルス、多糖類、ウイルス、細菌、昆虫、動物またはいずれかの他の細胞もしくは細胞型から得られたまたはそれら由来核酸およびその一部、リボソーム、微小粒子およびミセルが含まれる。レラキシンポリペプチドは、ミセル製剤で添加してもよい；米国特許第5,833,948号参照。本特許は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適する生理活性物質の種類には、限定されないが、薬剤、プロドラッグ、放射性核種、造影剤、ポリマー、抗生物質、殺菌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗腫瘍薬、心血管治療薬、抗不安薬、ホルモン、増殖因子、ステロイド剤、微生物由来毒素、等、が含まれる。

【0127】

「二官能性ポリマー」は、特異的に他の成分（限定されないが、アミノ酸側鎖を含む）と反応して、共有結合または非共有結合を形成できる2つの別々の官能基を含むポリマーを指す。特定の生物学的に活性な成分上の基と反応する1つの官能基、および第2の生物学的成分上の基と反応する別の基を有する二官能性リンカーは、第1の生物学的に活性な成分、二官能性リンカーおよび第2の生物学的に活性な成分を含むコンジュゲートを形成するために使用できる。種々の化合物のペプチドへの結合のための多くの方法とリンカー分子が知られている。例えば、欧州特許第188,256号；米国特許第4,671,958号、同4,659,839号、同4,414,148号、同4,699,784号；同4,680,338号；および同4,569,789号を参照されたい。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。「多官能性ポリマー」は、特異的に他の成分（限定されないが、アミノ酸側鎖を含む）と反応し、共有結合または非共有結合を形成できる2つ以上の別々の官能基を含むポリマーを指す。二官能性ポリマーまたは多官能性ポリマーは、いずれか所望の長さまたは分子量であってもよく、また、レラキシンに連結された1つまたは複数の分子およびその受容体またはレラキシンの間に特定の所望の間隔または高次構造を与えるように選択されてもよい。

【0128】

置換基が、左から右への記述による従来の化学式により指定される場合は、それらは、右から左への構造の記述から得られるであろう化学的に等価な置換基を同様に包含する。例えば、構造 CH_2O は、構造 —OCH_2 に等価である。

【0129】

用語の「置換基」は、限定されないが、「非干渉置換基」を含む。「非干渉置換基」は

10

20

30

40

50

、安定な化合物を得る基である。適切な非干渉置換基またはラジカルには、限定されないが、ハロ、C1～C10アルキル、C2～C10アルケニル、C2～C10アルキニル、C1～C10アルコキシ、C1～C12アラルキル、C1～C12アルカリル、C3～C12シクロアルキル、C3～C12シクロアルケニル、フェニル、置換フェニル、トルオイル、キシレニル、ビフェニル、C2～C12アルコキシアルキル、C2～C12アルコキシアリール、C7～C12アリールオキシアルキル、C7～C12オキシアリール、C1～C6アルキルスルフィニル、C1～C10アルキルスルホニル、 $-(CH_2)_m-O-$ (C1～C10アルキル) (mは1～8)、アリール、置換アリール、置換アルコキシ、フルオロアルキル、ヘテロ環式ラジカル、置換ヘテロ環式ラジカル、ニトロアルキル、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-NRC(O)-$ (C1～C10アルキル)、 $-C(O)-$ (C1～C10アルキル)、C2～C10アルキルチオアルキル、 $-C(O)O-$ (C1～C10アルキル)、 $-OH$ 、 $-SO_2$ 、 $=S$ 、 $-COOH$ 、 $-NR_2$ 、カルボニル、 $-C(O)-$ (C1～C10アルキル) $-CF_3$ 、 $-C(O)-CF_3$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-(C_1\sim C_{10}アリール)-S-$ (C6～C10アリール)、 $-C(O)-$ (C1～C10アリール)、 $-(CH_2)_m-O-$ ($-(CH_2)_m-O-$ (C1～C10アルキル) (各mは1～8))、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(S)NR_2$ 、 $-SO_2NR_2$ 、 $-NRC(O)NR_2$ 、 $-NRC(S)NR_2$ 、それらの塩、等が含まれる。本明細書で使われる各Rは、H、アルキルまたは置換アルキル、アリールまたは置換アリール、アラルキル、またはアルカリルである。

10

20

【0130】

用語の「ハロゲン」は、フッ素、塩素、ヨウ素、および臭素を含む。

【0131】

それ自身としての、または別の置換基の一部としての用語の「アルキル」は、特に指定のない限り、直鎖もしくは分岐鎖、または環式炭化水素基、またはそれらの組み合わせを意味し、完全飽和でも、モノまたは多価不飽和であってもよく、また、ジーおよび多価ラジカルを含んでもよく、指定された数の炭素原子を有する（すなわち、C1～C10は、1～10炭素を意味する）。飽和炭化水素基の例には、限定されないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシル、(シクロヘキシル)メチル、シクロプロピルメチル、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルの相同体および異性体、等の基が含まれる。不飽和アルキル基は、1つまたは複数の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例には、限定されないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2、4-ペンタジエニル、3-(1、4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、およびさらに高級相同体および異性体が含まれる。用語の「アルキル」は、特に指定のない限り、また、下記でさらに詳細に定義される「ヘテロアルキル」等のアルキル誘導体を含むことが意図されている。炭化水素基に限定されているアルキル基は、「ホモアルキル」と命名されている。

30

【0132】

それ自身としての、または別の置換基の一部としての用語の「アルキレン」は、限定されないが、構造 $-CH_2CH_2-$ および $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ により例示されるように、アルカン由来の二価ラジカルを意味し、「ヘテロアルキレン」として下に記載される基をさらに含む。通常、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24炭素原子を有し、10以下の炭素原子を有する基は、本明細書記載の方法および組成物の特定の実施形態である。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、より短い鎖のアルキルまたはアルキレン基で、通常は、8以下の炭素原子を有する。

40

【0133】

用語の「アルコキシ」、「アルキルアミノ」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）は、それらの従来の意味で使われ、それぞれ、酸素原子、アミノ基、または硫黄

50

原子、を介して分子の残りの部分に結合したアルキル基を指す。

【0134】

用語の「ヘテロアルキル」は、それ自身として、または別の用語と組み合わせて、特に指定のない限り、安定な直鎖もしくは分岐鎖、または環式炭化水素基、またはそれらの組み合わせを意味し、指定された数の炭素原子およびO、N、S i およびS からなる群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子から構成され、窒素および硫黄原子は、任意選択で、酸化されてもよく、また、窒素ヘテロ原子は、任意選択で、四級化されてもよい。ヘテロ原子O、N およびS およびS i は、ヘテロアルキル基のいずれの内部位置に置かれてもよく、または、アルキル基が分子の残りに結合される位置に置かれてもよい。限定されないが、例には、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{S i}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、および $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ が含まれる。例えば、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ および $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{S i}(\text{CH}_3)_3$ のように、2つまでのヘテロ原子が連続配置できる。同様に、用語の「ヘテロアルキレン」は、それ自身として、または別の置換基の一部として、ヘテロアルキル由来の二価ラジカルを意味し、限定されないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ で例示される。ヘテロアルキレン基に対しては、同じまたは異なるヘテロ原子は、また、鎖末端の片方または両方を占めることができる（限定されないが、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノ、アミノオキシアルキレン、等を含む）。またさらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン結合基に対しては、結合基の式が記述される方向からは、結合基の配向は示されない。例えば、式 $\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ は、 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ および $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ の両方を表す。

【0135】

用語の「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」、特に指定のない限り、それ自身として、または別の用語と組み合わせて、それぞれ、環式バージョンの「アルキル」および「ヘテロアルキル」を表す。従って、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルは、飽和、部分不飽和および完全不飽和環式結合を含む。さらに、ヘテロシクロアルキルに対しては、ヘテロ原子は、ヘテロ環が分子の残りの部分に結合している位置を占めることができる。シクロアルキルに例には、限定されないが、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチル、等が含まれる。ヘテロシクロアルキルの例には、限定されないが、1-(1、2、5、6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルフォリニル、3-モルフォリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、等が含まれる。さらに、この用語は、二環式および三環式構造を包含する。同様に、用語の「ヘテロシクロアルキレン」は、それ自身として、または別の置換基の一部として、ヘテロシクロアルキル由来の二価ラジカルを意味し、用語の「シクロシクロアルキレン」は、それ自身として、または別の置換基の一部として、シクロアルキル由来の二価ラジカルを意味する。

【0136】

本明細書で使われる用語の「水溶性ポリマー」は、水性溶剤に可溶のいずれかのポリマーを指す。水溶性ポリマーのレラキシンポリペプチドへの結合には、限定されないが、非改変型に比べて、延長されたもしくは調節された血清半減期、または延長されたもしくは調節された治療半減期、調節された免疫原性、調節された物理的関連特性、例えば、凝集およびマルチマー形成、変更された受容体結合、1つまたは複数の結合相手に対する変更された結合、および変更された受容体ダイマー化またはマルチマー化、等の変化をもたらすことができる。水溶性ポリマーは、それ自身の生物活性を持っても、持たなくてもよく、レラキシンを、限定されないが、1つまたは複数のレラキシンポリペプチド、または1

つまたは複数の生物学的に活性な分子を含む他の物質に結合するためのリンカーとして利用されてもよい。適切なポリマーには、限定されないが、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、それらのモノC1～C10アルコキシまたはアリールオキシ誘導体（米国特許第5,252,714号に期さされている。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる）、モノメトキシポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸、ジビニルエーテルマレイン酸無水物、N-（2-ヒドロキシプロピル）-メタクリルアミド、デキストラン、デキストラン硫酸塩等のデキストラン誘導体、ポリプロピレングリコール、ポリ酸化プロピレン／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリン断片、多糖類、オリゴ糖、グリカン、セルロースおよび限定されないがメチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体、デンプンおよびデンプン誘導体、ポリペプチド、ポリアルキレングリコールおよびその誘導体、ポリアルキレングリコールの共重合体およびその誘導体、ポリビニルエチルエーテル、およびアルファ-ベータポリ〔（2-ヒドロキシエチル）-DL-アスパルトアミド、等、またはそれらの混合物が含まれる。このような水溶性ポリマーの例には、限定されないが、ポリエチレングリコールおよび血清アルブミンが含まれる。

【0137】

本明細書で使われる用語の「ポリアルキレングリコール」または「ポリ（アルケングリコール）」は、ポリエチレングリコール（ポリ（エチレングリコール））、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール、およびそれらの誘導体を指す。用語の「ポリアルキレングリコール」は、直鎖および分枝高分子の両方および0.1kDa～100kDaの平均分子量を包含する。他の代表的実施形態は、例えば、市販品サプライヤーのカタログ、例えば、Shearwater Corporationのカタログ「生物医学への適用のためのポリエチレングリコールと誘導体（Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications）」（2001）、に挙げられている。

【0138】

用語の「アリール」は、特に指定のない限り、一緒に縮合、または共有結合した単一環でも、複数環（限定されないが、1～3環を含む）でもよい多価不飽和、芳香族炭化水素置換基を意味する。用語の「ヘテロアリール」は、N、O、およびSから選択される1～4ヘテロ原子を含むアリール基（または環）を指し、ここで、窒素および硫黄原子は、任意選択で、酸化されてもよく、また、窒素原子は、任意選択で、四級化されてもよい。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残りの部分に結合できる。アリールおよびヘテロアリール基の非制限的例には、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ピフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンゾイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが含まれる。上記アリールおよびヘテロアリール環系のそれぞれに対する置換基は、下記に記載の受容可能な置換基群から選択される。

【0139】

簡略のために、用語の「アリール」は、他の用語（限定されないが、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキルを含む）と組み合わせて使われる場合は、上記で定義のアリールおよびヘテロアリール環の両方を含む。従って、用語の「アリールアルキル」は、炭素原子（限定されないが、メチレン基を含む）が、例えば、酸素原子により置換されたアルキル基（限定されないが、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3

10

20

30

40

50

ー（１－ナフチルオキシ）プロピル、等を含む）を含むアルキル基に、アリール基（限定されないが、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチル、等を含む）が結合されているラジカルを含むことが意図されている。

【0140】

上記用語のそれぞれ（限定されないが、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」を含む）は、指定されたラジカルの置換および未置換型の両方を含むことが意図されている。ラジカルの各タイプに対する代表的置換基は、以下に示される。

【0141】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル（限定されないが、アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルと呼ばれることが多い基を含む）に対する置換基は、限定されないが、下記から選択される１つまたは複数の種々の基であってもよい： $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $NR'C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'-NR-C(NR'R''R''')=NR''$ 、 $NRC(NR'R'')=NR''$ 、 $-S(O)R'-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $NRSO_2R'$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ 。置換数はゼロから $(2m'+1)$ の範囲（ m' は、このラジカルの炭素原子の合計数）の数であり、 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は、それぞれ独立に、水素、置換または未置換ヘテロアルキル、置換または未置換アリールを指し、限定されないが、１～３ハロゲン、置換または未置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基で置換されたアリールを含む。本発明の化合物が、２つ以上の R 基を含む場合、例えば、２つ以上のこれらの基が存在する場合は、 R 基のそれぞれが R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基として独立に選択される。 R' および R'' が同じ窒素原子に結合されている場合は、それらは、窒素原子と組み合わせられて、５－、６－、また７－員環を形成できる。例えば、 $-NR'R''$ は、限定されないが、１－ピロリジニルおよび４－モルフォリニルを含むことが意図される。上記置換基の考察から、当業者なら、用語の「アルキル」が、水素基以外の基、例えば、ハロアルキル（限定されないが、 $-CF_3$ および $-CH_2CF_3$ を含む）およびアシル（限定されないが、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ 、等を含む）に結合された炭素原子を含む基を含むことが意図されていることが理解されよう。

【0142】

アルキルラジカルに関し記載された置換基と同様に、アリールおよびヘテロアリール基に対する置換基は、種々あり、限定されないが、下記から選択される：ハロゲン、 OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $NR'C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R''R''')=NR''$ 、 $NRC(NR'R'')=NR''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $NRSO_2R'$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ（ $C1\sim C4$ ）アルコキシ、およびフルオロ（ $C1\sim C4$ ）アルキル。置換数は、ゼロから芳香族環系の開放原子価の合計数の範囲の数であり、 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は、独立に、水素、アルキル、ヘテロアルキル、アリールおよびヘテロアリールから選択される。本発明の化合物が２つ以上の R 基を含む場合は、例えば、２つ以上のこれらの基が存在する場合、それぞれの R 基は独立に R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基としてそれぞれ選択される。

【0143】

本明細書で使用される用語の「調節された血清半減期」は、非改変型に比べて、改変レラキシンの循環半減期の正のまたは負の変化を意味する。血清半減期は、レラキシン投与後の種々の時点で血液サンプルを採取して、各試料中の分子濃度を求めることにより測定

10

20

30

40

50

される。血清濃度と時間の相関により、血清半減期の計算が可能となる。延長された血清半減期は、少なくとも約2倍であることが望ましいが、例えば、それにより、納得のいく投与計画が可能となるか、または毒作用が避けられる場合は、さらに短い延長も有用である可能性がある。一部の実施形態では、延長は少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、または少なくとも約10倍である。

【0144】

本明細書で使われる用語の「調節された治療半減期」は、非改変型に比べて、治療有効量のレキサシンの半減期の正のまたは負の変化を意味する。治療半減期は、投与後の種々の時点での分子の薬物動態学および／または薬力学的特性の測定により求められる。延長された治療の半減期により、特段の有益な投与計画、特段の有益な全用量が可能となるか、または望ましくない作用が避けられるのが望ましい。一部の実施形態では、延長された治療半減期により、増加した効力、増加または減少した改変分子の標的への結合、プロテアーゼ等の酵素による分子の増加または減少した分解、または非改変分子の別の作用パラメータもしくは機序の増加または減少または分子受容体媒介クリアランスの増加または減少が生ずる。

【0145】

用語の「単離された」は、核酸またはタンパク質に適用される場合、核酸またはタンパク質が、天然状態では随伴している少なくとも一部の細胞成分を含まない、または核酸またはタンパク質が、そのインビボまたはインビトロで産生時の濃度より高いレベルに濃縮されていることを意味する。それは、均質の状態であってもよい。単離された物質は、乾燥または半乾燥状態であってもよく、または限定されないが、水溶液を含む溶液状態でもよい。それは、追加の薬学的に許容可能なキャリアーおよび／または賦形剤を含む医薬組成物の成分であってもよい。純度と均一性は、通常、分析化学技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法または高速液体クロマトグラフィーを使って測定される。製剤中に存在する主要種であるタンパク質は、実質的に精製される。特に、単離遺伝子は、遺伝子に隣接し、対象遺伝子以外のタンパク質をコードする読み枠から分離される。用語の「精製された」は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲル中で実質的に1つのバンドを生ずることを意味する。特に、それは、核酸またはタンパク質が、少なくとも85%純粋、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも99%またはそれ超純粋であることを意味してよい。

【0146】

用語の「核酸」は、単鎖または二重鎖型のデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを指す。特に限定されなければ、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドに類似の方式で代謝される天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。特に別段の限定がなければ、この用語は、また、PNA（ペプチド核酸）、アンチセンス技術で使われるDNA類似体（ホスホロチオアート、ホスホロアミダート、等）を含むオリゴヌクレオチド類似体を指す。特段の記載が無ければ、特定の核酸配列は、また、保存的に改変されたその変異体（限定されないが、縮重コドン置換を含む）、相補的配列ならびに明示的に示された配列を暗黙的に含む。特に、縮重コドン置換は、第3の位置の1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンが混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することにより行うことができる（Batzere et al.、核酸Res. 19:5081（1991）；Ohtsuka et al.、J. Biol. Chem. 260:2605-2608（1985）；Rossolini et al.、Mol. Cell. Probes 8:91-98（1994））。

【0147】

用語の「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では同義に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。すなわち、ポリペプチドに関する記述は、ペプチドの記述およびタンパク質の記述に等しく適用でき、逆もまた同じである。この用語は、天然アミノ酸ポリマー、ならびに、1つまたは複数のアミノ酸残基が天然ではコード

されないアミノ酸であるアミノ酸ポリマーに適用できる。本明細書で使われるこの用語は、アミノ酸残基が、共有結合のペプチド結合で連結されている任意の長さのタンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。

【0148】

用語の「アミノ酸」は、天然に存在する、および天然に存在しないアミノ酸、ならびにアミノ酸類似体および天然アミノ酸に類似の方式で機能するアミノ酸模倣体を指す。天然でコードされるアミノ酸は、20共通アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）ならびに、ピロールリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち、水素に結合した炭素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルフォキシド、メチオニンメチルスルホニウムを有する化合物を指す。このような類似体は、改変R基（例えば、ノルロイシン）または改変ペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸への参照は、例えば、天然タンパク新生L-アミノ酸；D-アミノ酸、化学的改変アミノ酸、例えば、アミノ酸変異体および誘導体；天然非タンパク新生アミノ酸、例えば、 β -アラニン、オルニチン、等；および当技術分野でアミノ酸の特徴であるとわかっている特性を有する化学的合成化合物を含む。非天然アミノ酸の例には、限定されないが、 α -メチルアミノ酸（例えば、 α -メチルアラニン）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、2-アミノヒスチジン、 β -ヒドロキシヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジンおよび α -メチルヒスチジン）、側鎖に追加のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、および側鎖のカルボン酸官能基が、スルホン酸基（例えば、システイン酸）で置換されているアミノ酸が含まれる。合成非天然アミノ酸、置換アミノ酸、または1つまたは複数のD-アミノ酸を含む非天然アミノ酸の本発明のタンパク質への組み込みは、いくつかの異なる方式の中で有利である可能性がある。D-アミノ酸含有ペプチド、等は、L-アミノ酸含有対応物に比べて、増加したインビトロまたはインビボ安定性を示す。従って、D-アミノ酸を組み込むペプチド等の作製は、より大きな細胞内安定性が所望または必要な場合、特に有用でありうる。さらに具体的には、D-ペプチド等は、内在性ペプチダーゼおよびプロテアーゼ抵抗性であり、それにより、必要に応じ、分子の改善された生物学的利用率、および延長されたインビボ寿命を与える。さらに、D-ペプチド、等は、ヘルパーT細胞に対する主要組織適合抗原クラスII拘束性提示に対し効率的に処理できず、従って、全生物で液性免疫応答を誘発しそうにない。

【0149】

本明細書では、アミノ酸は、よく知られている3文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会推奨の1文字記号で参照される。ヌクレオチドは、同様に、一般に受け入れられている1文字コードで参照される。

【0150】

「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用できる。特定の核酸配列に関して、「保存的に改変された変異体」は、同じまたは基本的に同じアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、基本的に同じ配列を指す。遺伝暗号縮退のために、多数の機能的に同じ核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全て、アミノ酸のアラニンをコードする。従って、アラニンがコドンにより指定される全ての位置で、コードされるポリペプチドを変えることなく、コドンを上記対応するコドンのいずれかに変更できる。このような核酸のバリエーションは、「サイレントバリエーション」であり、これは、保存的改変バリエーションの一種である。本明細書のポリペプチドをコードする全ての核酸配列は、また、全ての可能な核酸のサイレントバリエーションを表している。当業者なら、核酸の各コドン（通常、メチオニン用の唯一のコドンであるAUG、および通常、トリプトファン用の唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同じ

分子を得ることができることを理解するであろう。従って、核酸のポリペプチドをコードする各サイレントバリエーションは、各記載配列中に必然的に含まれている。

【0151】

アミノ酸配列に関して、当業者は、単一アミノ酸または少量のパーセンテージのコード化配列中でのアミノ酸の変更、付加、削除を行う、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列へのそれぞれ置換、欠失または付加は、変更が化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加またはアミノ酸の置換をもたらす場合は、「保存的に改変された変異体」であることをわかるであろう。機能的に類似のアミノ酸を与える保存的置換表は、当業者には既知である。このような保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子に追加されるものであり、これらを排除するものではない。

10

【0152】

機能的に類似のアミノ酸を与える保存的置換表は、当業者には既知である。下記の8群は、それぞれ、相互に保存的置換されるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、トレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

20

【0153】

(例えば、Creighton、タンパク質：構造と分子特性 (Proteins: Structures and Molecular Properties) (W H Freeman & Co. ; 2nd edition (December 1993、を参照のこと)。

【0154】

用語の「同じ」またはパーセント「同一性」は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の存在下では、2つ以上の同じ配列または部分列を指す。下記の配列比較アルゴリズム (または他の当業者に利用可能なアルゴリズム) の1つを使って、またはマニュアル整理と目視検査により測定して、比較ウィンドウまたは指定領域全体で、最大一致を得るために比較し整理させた場合に、それらが、あるパーセンテージ (すなわち、指定領域全体で約60%同一性、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%同一性) 同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する場合は、配列は、「実質的に同じ」である。この定義は、また、試験配列の相補配列を指す。同一性は、少なくとも約50アミノ酸もしくはヌクレオチド長さの領域にわたって、または75~100アミノ酸またはヌクレオチド長さの領域にわたって、または指定されない場合は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全体配列にわたって存在してもよい。ヒト以外の種由来の相同体を含む本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識プローブを使って、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でライブラリーを選別し、完全長cDNAおよび前記ポリヌクレオチド配列を含むゲノムクローンを単離するステップを含むプロセスにより得ることができる。このようなハイブリダイゼーション技術は、当業者にはよく知られている。

30

40

【0155】

配列比較のために、典型的には、1つの配列が参照配列として使用して、これに対し、試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使う場合には、試験および参照配列を、コンピュータに入力し、必要に応じ、部分列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用しても、または代わりにパラメータを指定してもよい。次に、配列比較アルゴリズムにより、プログラムパラメ

50

ータに基づき、参照配列に比較して、試験配列のパーセント配列同一性が計算される。

【0156】

本明細書で使われる「比較ウィンドウ」は、2つの配列が任意選択で整列された後で、配列を同じ数の近接位置の参照配列と比較できる、20～600、普通は約50～約200、さらに普通には約100～約150、からなる群より選択される近接位置の数のいずれか1つのセグメントに対する参照を含む。比較のための配列の整列方法は、当業者には既知である。比較のための配列の最適整列化は、限定されないが、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局地的相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性整列アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性探索方法、これらのアルゴリズムの計算機による実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI、のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、またはマニュアル整列化と目視検査による方法 (例えば、Ausubel et al.、分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (1995付録) を参照) 等によって行うことができる。

10

【0157】

パーセント配列同一性および配列類似性の測定に適切なアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これは、Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410、にそれぞれ記載されている。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) から公的に入手可能であり、これは、ncbi.nlm.nih.govからWWWで入手可能である。BLASTアルゴリズムパラメータのW、T、およびXは、整列化の感度と速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとして、単語長 (W): 11、期待値 (E): 10、M=5、N=-4および両鎖の比較、を使用する。アミノ酸配列に対してのBLASTPプログラムは、デフォルトとして、単語長: 3、および期待値 (E): 10、およびBLOSUM62スコアリング行列 (Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915、を参照)、アライメント (B): 50、期待値 (E): 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較、を使用する。BLASTアルゴリズムは、通常、「低複雑度」フィルター: オフで行われる。

20

30

【0158】

BLASTアルゴリズムは、また、2つの配列の間の類似性の統計的分析を行う (例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787、参照)。BLASTアルゴリズムにより得られる類似性の1つの測定値は、最小和確率 (P(N)) で、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間のマッチングが偶然に起こる確率の指標を与える。例えば、試験核酸の参照核酸に対する比較で、最小和確率が約0.2未満、または約0.01未満、または約0.001未満の場合、核酸は、参照配列に類似であると見なされる。

40

【0159】

語句の「～に選択的に (または特異的に) ハイブリダイズする」は、その配列が複合物 (限定されないが、全細胞性またはライブラリーDNAもしくはRNA) 中に存在する場合に、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下での、特定のヌクレオチド配列のみへの分子の結合、二重鎖化、またはハイブリダイズを指す。

【0160】

50

語句の「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、当技術分野で知られているような、低イオン強度および高温度の条件下、DNA、RNA、PNA、もしくは他の核酸模倣体、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションを指す。典型的には、ストリンジェント条件下で、プローブが核酸複合混合物（限定されないが、全細胞性またはライブラリーDNAもしくはRNAを含む）中の標的部分列にハイブリダイズするが、複合混合物中の他の配列にはハイブリダイズしない。ストリンジェント条件は、配列依存性であり、異なる環境では、違ったものになるであろう。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションへの広範囲なガイドは、Tijssen、生化学と分子生物学における研究技術－核酸プローブを使ったハイブリダイゼーション（Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology－Hybridization with Nucleic Probes）、「ハイブリダイゼーションの原理の概要と核酸アッセイ戦略（Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays）」（1993）、に認められる。通常、ストリンジェント条件は、規定イオン強度とpHで、特異的配列に対して融解温度（ T_m ）より約5～10℃低くなるように選択される。 T_m は、（規定イオン強度、pH、および核酸濃度下）平衡状態で50%の標的に対し相補的なプローブが標的配列にハイブリダイズする温度である（標的配列は、 T_m で過剰に存在するので、平衡時に50%のプローブが占有される）。ストリンジェント条件は、塩濃度がpH7.0～8.3で、約1.0Mナトリウムイオン未満の濃度、典型的には約0.01～1.0Mナトリウムイオン濃度（または他の塩）であり、短いプローブ（限定されないが、10～50ヌクレオチドを含む）に対して、温度は少なくとも約30℃および長いプローブ（限定されないが、50ヌクレオチドより長い、等）に対しては少なくとも約60℃であってもよい。ストリンジェント条件は、また、不安定化剤、例えば、フォルムアミドの添加により達成してもよい。選択的または特異的ハイブリダイゼーションに対して、ポジティブシグナルは、少なくともバックグラウンドの2倍、任意選択でバックグラウンドの10倍のハイブリダイゼーションであってもよい。代表的ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、以下のものであってもよい：50%フォルムアミド、5XSSC、および1%SDS、42℃で培養、または5XSSC、1%SDS、65℃で培養、0.2XSSCおよび0.1%SDSを使い65℃で洗浄。このような洗浄を、5、15、30、60、120分、またはそれより長い時間行ってもよい。

【0161】

本明細書で使われる用語の「真核生物」は、系統学的ユーカリアドメイン、例えば、動物（限定されないが、哺乳類、昆虫類、爬虫類、鳥類、等を含む）、纖毛虫類、植物（限定されないが、単子葉類、双子葉類、藻類、等を含む）、真菌類、酵母、鞭毛虫類、微孢子虫類、原生生物、等に属する生物を指す。

【0162】

本明細書で使われる用語の「非真核生物」は、非真核の生物を指す。例えば、非真核の生物は、真正細菌（限定されないが、大腸菌、高度好熱菌、バチルス・ステアロサーモフィルス、蛍光菌、緑膿菌、プチダ菌、等を含む）系統学的ドメイン、またはアーケア（限定されないが、メタノコッカスジャナスキー、メタノバクテリウム・サーモアウトトロフィクス、ハロバクテリウム、例えば、ハロフェラックス・ボルカニおよびハロバクテリウム種NR-1、アーケオグロブス・フルギダス、パイロコッカス・フリオサス、パイロコッカス・ホリコシイ、アエロパイラム・ペルニクス、等を含む）系統学的ドメインに属する。

【0163】

本明細書で使われる用語の「対象」は、治療、観察または実験の対象である動物、一部の実施形態では、哺乳動物、および他の実施形態では、ヒトを指す。動物は、ペット動物（例えば、イヌ、ネコ、等）、家畜（例えば、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、等）または

実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、等）であってもよい。

【0164】

本明細書で使われる用語の「有効量」は、1つまたは複数の治療されるべき疾患の症状、状態または障害を、ある程度軽減すると思われる改変非天然アミノ酸ポリペプチドの投与量を指す。本明細書記載の改変非天然アミノ酸ポリペプチドを含む組成物は、予防、強化、および／または治療処置のために投与できる。

【0165】

用語の「強化する」または「強化」は、所望の効果の効力または持続期間を増やすか、または延長することを意味する。従って、治療薬の効果の強化に関して、用語「強化」は、効力または持続期間に関し、系に対する他の治療薬の効果を増やすか、または延長する能力を指す。本明細書で使われる「強化有効量」は、所望の系の別の治療薬の効果強化するのに適切な量を指す。患者に使用される場合は、この使用に対し有効な量は、重症度および疾患、障害、または状態の経過、前治療、患者の健康状態および薬剤に対する応答、ならびに治療医師の判断に依存することになる。

10

【0166】

本明細書で使われる用語の用語「改変された」は、所与のポリペプチドになされた何らかの変化、例えば、ポリペプチドの長さ、アミノ酸配列、化学構造の変化、ポリペプチドの翻訳時修飾、または翻訳後修飾、を指す。「（改変された）」の形の用語は、考察対象ポリペプチドは任意選択で改変されてもよい、すなわち、考察しているポリペプチドは、改変されても、されなくてもよいことを意味する。

20

【0167】

用語の「翻訳後修飾により改変された」は、ポリペプチド鎖中に組み込まれた後で、アミノ酸に発生する天然または非天然アミノ酸のいずれかの改変を指す。この用語は、例としてではあるが、インビボ翻訳時修飾、インビトロ翻訳時修飾（例えば、細胞のない翻訳系中での）、インビボ翻訳後修飾およびインビトロ翻訳後修飾、を包含する。

【0168】

予防への適用では、レラキシンポリペプチドを含む組成物は、特定の疾患、障害または状態に罹りやすい、あるいはその危険がある患者に投与される。このような場合の量は、「予防有効量」と定義される。この使い方でも、正確な量は、また、患者健康状態、体重、等に依存する。ルーチン的な実験（例えば、漸増投与臨床試験）により、当業者の技能範囲内でこのような予防有効量が決められるようにうまく考えられている。

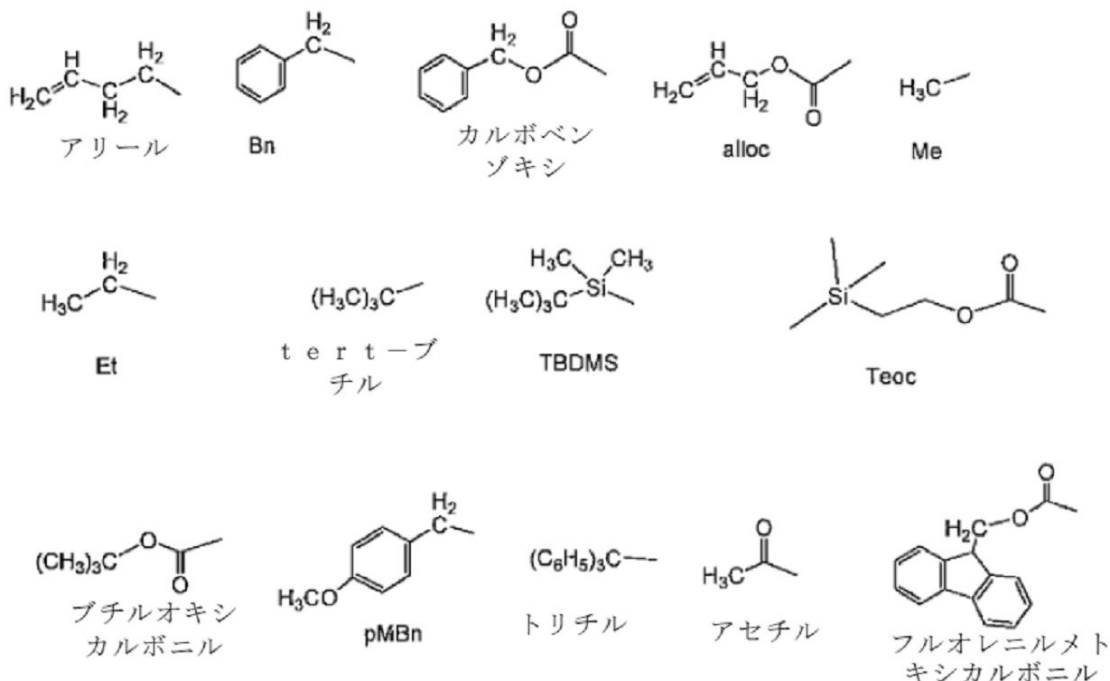
30

【0169】

用語の「保護された」は、特定の反応条件下で化学的反応性官能基の反応を防ぐ「保護基」または成分の存在を指す。保護基は、保護される化学反応基のタイプに応じて変わる。例えば、化学反応基がアミンまたはヒドラジドの場合は、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル（t-Boc）および9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）の群から選択できる。化学的反応基がチオールの場合は、保護基は、オルトピリジルジスルフィドであってよい。化学的反応基がカルボン酸、例えば、ブタン酸またはプロピオン酸、またはヒドロキシル基の場合は、保護基は、ベンジルまたはアルキル基、例えば、メチル、エチル、またはtert-ブチルであってよい。感光性基、例えば、NvocおよびMeNvocを含む当技術分野で既知の他の保護基も、また、本明細書記載の方法および組成物中またはこれらと共に使用可能である。当技術分野で既知の他の保護基も、また、本明細書記載の方法および組成物中またはこれらと共に使用可能である。例としてではあるが、ブロッキング／保護基は、下記から選択できる：

40

【化 4】



10

20

【0170】

他の保護基は、Greene and Wuts、有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis)、3rd Ed.、John Wiley & Sons、New York、NY、1999、に記載されている。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0171】

治療への適用では、改変非天然アミノ酸ポリペプチドを含む組成物は、治療または少なくとも部分的に疾患、障害または状態の症状を停止するのに十分な量で、既に疾患、状態または障害に罹患している患者に投与される。このような量は、「治療有効量」と定義され、重症度および疾患、障害または状態の経過、前治療、患者の健康状態および薬剤に対する応答、ならびに治療医師の判断に依存する。ルーチン的な実験（例えば、漸増投与臨床試験）により、当業者の技能範囲内でこのような予防有効量が決められるようにうまく考えられている。

30

【0172】

本発明のレラキシンポリペプチドは、血管収縮、NO産生、ET-1、Ang II、および血小板凝集を調節するのに使用できる。本発明の一実施形態では、治療を必要としている患者は、治療を求めている状態のベースラインに対し、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%超、150%、150%超、200%、200%超だけ患者の血管収縮が減少すると想定される治療量の本発明のレラキシンポリペプチド投与を受ける。別の本発明の実施形態は、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%超、150%、150%超、200%、200%超だけ、NO産生を増やすために治療有効量のレラキシンポリペプチドを投与することによる、それを必要としている患者のNO産生を増加させるための治療方法である。

40

【0173】

本発明の一実施形態は、治療量の本発明レラキシンポリペプチドを使って患者の血小板凝集を10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、

50

100%超、150%、150%超、200%、200%超、だけ低減するそれを必要としている患者の治療方法である。別の本発明の実施形態は、治療量のレラキシンポリペプチドを使って、それを必要としている患者の肥大を減らすための治療方法である。別の本発明の実施形態は、治療量のレラキシンポリペプチドを使って、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%超、150%、150%超、200%、200%超、だけ患者のCF刺激タンパク質合成を減らすための、それを必要としている患者の治療方法である。別の本発明の実施形態は、治療有効量のレラキシンポリペプチドを投与して、NO産生を、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%超、150%、150%超、200%、200%超、だけ増やし、患者のANP発現を増やすための、それを必要としている患者の治療方法である。

10

【0174】

本方法により、本発明のpegレラキシンは、野性型レラキシンに比べて、AUCが10倍；15倍増加；15倍超増加；20倍増加；20倍超増加；25倍増加；25倍超増加；30倍増加；30倍超増加；35倍増加；35倍超増加；40倍増加；40倍超増加；45倍増加；45倍超増加；50倍増加；50倍超増加；55倍増加；55倍超増加；60倍増加；60倍超増加；65倍増加；65倍超増加；70倍増加；70倍超増加；75倍増加；75倍超増加；80倍増加；80倍超増加；85倍増加；85倍超増加；90倍増加；90倍超増加；95倍増加；95倍超増加；100倍増加；100倍超増加する。

20

【0175】

用語の「治療」は、予防および／または治療の処置を指すために使用される。

【0176】

本明細書の天然ではコードされないアミノ酸ポリペプチドは、天然に通常認められる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子で置換された1つまたは複数の原子を有する同位体標識化合物を含んでもよい。本発明の化合物化合物中に組み込み可能な同位体の例には、水素、炭素、窒素、酸素、フッ素および塩素の同位体、例えば、それぞれ、2H、3H、13C、14C、15N、18O、17O、35S、18F、36Clが含まれる。本明細書記載の特定の同位体標識化合物、例えば、放射性同位元素、例えば、3Hおよび14Cが組み込まれた化合物は、薬剤および／または基質組織分布アッセイに有用となりうる。さらに、同位体、例えば、重水素、すなわち、2Hによる置換は、より大きな代謝安定性、例えば、インビボ半減期の増加または投与量要求の低減から生じる特定の治療上の利点を提供できる。

30

【0177】

限定されないが、ジアステレオマー、鏡像異性体、およびこれらの混合物を含む全ての異性体は、本明細書記載の組成物の一部と見なされる。追加の、またはさらなる実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸ポリペプチドは、後で所望の治療効果を含む所望の効果を生み出すために使用される代謝物の産生が必要な生物に投与して、代謝される。追加の、またはさらなる実施形態は、天然ではコードされないアミノ酸ポリペプチドの活性代謝物である。

40

【0178】

一部の状況では、天然ではコードされないアミノ酸ポリペプチドは、互変異性体として存在してもよい。さらに、本明細書記載の天然ではコードされないアミノ酸ポリペプチドは、非溶媒和型として存在しても、薬学的に許容可能な溶剤、例えば、水、エタノール、等との溶媒和型として存在してもよい。溶媒和型も、また、本明細書で開示されているとみなされる。当業者は、本明細書の一部の化合物は、いくつかの互変異性型として存在可能であることに気付くであろう。全てのこのような互変異性型は、本明細書記載の組成物の一部であると見なされる。

50

【0179】

特段の指示がなければ、従来の質量分析、NMR、HPLC、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術および薬理学の方法が、当業者の技能範囲内で、採用される。

【発明を実施するための形態】

【0180】

発明の詳細な説明

I. 緒言

少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むレラキシンポリペプチドが本発明で提供される。本発明の特定の実施形態では、少なくとも1つの非天然アミノ酸を有するレラキシンポリペプチドは、少なくとも1つの翻訳後修飾を含む。一実施形態では、少なくとも1つの翻訳後修飾が、限定されないが、下記を含む分子の結合を含む：標識、色素、ポリマー、水可溶性ポリマー、ポリエチレングリコール誘導体、光架橋剤、放射性核種、細胞障害性化合物、薬剤、親和標識、光親和標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質またはポリペプチドまたはポリペプチド類似体、抗体または抗体断片、金属キレート剤、補助因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、サッカライド、水可溶性デンドリマー、シクロデキストリン、抑制性リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、フルオロフォア、金属含有成分、放射性成分、新規官能基、他の分子と共有結合または非共有結合で相互作用する基、フォトケージ化成分、光化学作用照射励起成分、光異性化可能な成分、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、重原子組込み成分、化学的切断可能な基、光切断可能な基、延長側鎖、炭素結合型糖、レッドックス活性剤、アミノチオ酸、毒成分、同位体標識成分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度基、磁性基、インターカレート基、発色団、エネルギー遷移剤、生理活性物質、検出可能標識、小分子、量子ドット、ナノトランスミッター、放射性核種標識ヌクレオチド、放射性核種標識トランスミッター、中性子捕獲剤、もしくはいずれかの上記の組み合わせ、または、特定の反応基に適切であると当業者にわかる化学的方法を利用して少なくとも1つの第1の反応基を含む非天然アミノ酸に対する第2の反応基を含む、任意の他の望ましい化合物または物質。例えば、第1の反応基が、アルキニル成分（限定されないが、非天然アミノ酸の、プロパルギル基がアセチレン成分とも呼ばれることがあるp-プロパルギルオキシフェニルアラニンを含む）であり、第2の反応基がアジド成分であり、[3+2]付加環化化学方法が利用される。別の例では、第1の反応基は、アジド成分（限定されないが、非天然アミノ酸の、p-アジド-L-フェニルアラニンを含む）であり、第2の反応基がアルキニル成分である。特定の本発明の改変レラキシンポリペプチドの実施形態では、少なくとも1つの少なくとも1つの翻訳後修飾を含む非天然アミノ酸（限定されないが、ケト官能基を含む非天然アミノ酸を含む）が、使用され、この場合、少なくとも1つの翻訳後修飾は、サッカライド成分を含む。特定の実施形態では、翻訳後修飾は、インビボで真核細胞中で行われるか、または非真核細胞で行われる。リンカー、ポリマー、水溶性ポリマー、または他の分子は、その分子をポリペプチドに結合させることができる。分子は、直接ポリペプチドに結合してもよい。

【0181】

特定の実施形態では、タンパク質は、ある宿主細胞によりインビボで行われる少なくとも1つの翻訳後修飾を含み、その翻訳後修飾は、通常は、別の宿主細胞型によっては行われない。特定の実施形態では、タンパク質は、真核細胞によりインビボでおこなわれる少なくとも1つの翻訳後修飾を含み、その翻訳後修飾は、通常は、非真核細胞によっては行われない。翻訳後修飾の例には、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミチン酸化、パルミタート付加、リン酸化、糖脂質結合修飾、等が含まれる。

【0182】

一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミチン酸化、パルミタート付加、リン酸化、または糖脂質結合修飾のための1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含む。一部の

実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化のための1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミチン酸化、パルミタート付加、リン酸化、または糖脂質結合修飾のための1つまたは複数の天然でコードされるアミノ酸を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化のための1つまたは複数の天然でコードされるアミノ酸を含む。

【0183】

一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチドのグリコシル化を強化する1つまたは複数の欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチド中の異なるアミノ酸のグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチド中の異なるアミノ酸のグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチド中の天然でコードされるアミノ酸のグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチド中の天然でコードされるアミノ酸のグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。一部の実施形態では、レラキシシンポリペプチドは、ポリペプチド中の天然でコードされるアミノ酸のグリコシル化を強化する1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸付加および／または置換を含む。

【0184】

一実施形態では、翻訳後修飾は、GlcNAc-アスパラギン結合によるオリゴ糖のアスパラギンへの結合を含む（限定されないが、オリゴ糖が（GlcNAc-Man）₂-Man-GlcNAc-GlcNAc、等を含む場合を含む）。別の実施形態では、翻訳後修飾は、オリゴ糖（限定されないが、Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc、等を含む）のGalNAc-セリン、GalNAc-トレオニン、GlcNAc-セリン、またはGlcNAc-トレオニン結合によるセリンまたはトレオニンへの結合を含む。特定の実施形態では、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、分泌または局在化配列、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジンタグ、GST融合体、等を含んでもよい。分泌シグナル配列の例には、限定されないが、原核生物分泌シグナル配列、真核生物分泌シグナル配列、細菌発現向け5'-最適化真核生物分泌シグナル配列、新規分泌シグナル配列、ペクチン酸リアーゼ分泌シグナル配列、OmpA分泌シグナル配列、およびファージ分泌シグナル配列が含まれる。分泌シグナル配列の例には、限定されないが、STII（原核生物）、FdGIIIおよびM13（ファージ）、Bg12（酵母）、ならびにトランスポゾン由来のシグナル配列b1a、が含まれる。いずれかのこのような配列は、限定されないが、1つのシグナル配列を異なるシグナル配列で置換、リーダー配列を異なるリーダー配列で置換、等の改変がなされて、ポリペプチドに所望の結果を提供できる。

【0185】

対象のタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10以上の非天然アミノ酸を含んでもよい。非天然アミノ酸は、同じでも、または異なってもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、

10

20

30

40

50

9、10またはそれ超の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質中の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ超の異なる部位であってもよい。特定の実施形態では、天然型のタンパク質中に存在する内の、全部よりも少ないが、少なくとも1つの特定のアミノ酸が、非天然アミノ酸で置換される。

【0186】

本発明は、少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンをベースにした方法および組成物を提供する。少なくとも1つの天然ではコードされないアミノ酸のレラキシンへの導入により、限定されないが、共通20アミノ酸とは反応しないが、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸との反応を含む、特異的化学反应を伴うコンジュゲーション化学の適用が可能となる。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンは、天然ではコードされないアミノ酸の側鎖を介して、水溶性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）に、連結される。本発明は、PEG誘導体によるタンパク質の選択的改変のための高度に効率的な方法を提供し、この方法は、限定されないが、20天然に組み込まれたアミノ酸中には認められない官能基または置換基（限定されないが、ケトン、アジドまたはアセチレン成分）を含むアミノ酸等の遺伝的にコードされないアミノ酸の、セクターコドンに応答した、タンパク質中への選択的組み込み、およびその後のこれらのアミノ酸の適切な反応性PEG誘導体による改変を含む。一旦組み込まれると、アミノ酸側鎖は、天然ではコードされないアミノ酸中に存在する特定の官能基または置換基に対し適切な、当業者には既知の化学的方法を利用することにより改変できる。既知の広範囲の化学的方法は、水溶性ポリマーをタンパク質中に組み込むための本発明での使用に適している。このような方法には、限定されないが、限定されないが、それぞれアセチレンまたはアジド誘導体等を使った、Huisgen [3+2] 付加環化反応が含まれる（例えば、Padwa, A.、総合有機合成（Comprehensive Organic Synthesis）、Vol. 4、（1991）Ed. Trost, B. M.、Pergamon, Oxford、p. 1069-1109；およびHuisgen, R.、1、3-双極子付加環化（Dipolar Cycloaddition）、（1984）Ed. Padwa, A.、Wiley, New York、p. 1-176、を参照）。

【0187】

Huisgen [3+2] 付加環化方法は、求核置換反応よりはむしろ、付加環化を伴うので、タンパク質は、極端に高い選択性で改変できる。この反応は、室温の水性の条件下、触媒量のCu(I)塩の反応混合物への添加により、優れた位置選択性（1、4>1、5）で実行できる。例えば、Tornøe, et al.、（2002）J. Org. Chem. 67：3057-3064；および、Rostovtsev, et al.、（2002）Angew. Chem. Int. Ed. 41：2596-2599；および国際公開第03/101972号、を参照されたい。[3+2] 付加環化により本発明のタンパク質に付加できる分子には、限定されないが、アジドまたはアセチレン誘導体を含む実質的に適切な官能基または置換基を有するいずれかの分子が含まれる。これらの分子は、それぞれ、限定されないがp-プロパルギルオキシフェニルアラニンを含むアセチレン基、または限定されないがp-アジドフェニルアラニンを含むアジド基、を有する非天然アミノ酸に付加できる。

【0188】

Huisgen [3+2] 付加環化から得られる5員環は、通常は、還元環境中で可逆的ではなく、水性環境下で長時間、加水分解に対し安定である。結果的に、各種物質の物理的および化学的特性は、厳しい水性の条件下で、本発明の活性PEG誘導体を使って、変更できる。またさらに重要なことに、アジドおよびアセチレン成分は相互に特異的（しかも、例えば、遺伝的にコードされた20共通アミノ酸のいずれとも反応しない）であるため、タンパク質は、1つまたは複数の特異的部位で、極端に高い選択性で改変できる。

【0189】

本発明は、また、1つまたは複数のアセチレンまたはアジド成分を有するPEG誘導体

および関連親水性高分子の水溶性かつ加水分解的に安定な誘導体を提供する。アセチレン成分を有する PEG ポリマー誘導体は、セクターコドンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアジド成分との結合に対し高度に選択的である。同様に、アジド成分を含む PEG ポリマー誘導体は、セクターコドンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアセチレン成分との結合に対し、高度に選択的である。

【0190】

さらに具体的には、アジド成分は、限定されないが、アルキルアジド、アリールアジドおよびこれらのアジドの誘導体を含む。アルキルおよびアリールアジドの誘導体は、アセチレン特異的反応性が維持される限り、他の置換基を含んでもよい。アセチレン成分は、アルキルおよびアリールアセチレン、およびそれぞれの誘導体を含む。アルキルおよびアリールアセチレンの誘導体は、アジド特異的反応性が維持される限り、他の置換基を含んでもよい。

10

【0191】

本発明は、各種の官能基、置換基または成分を有する物質と、限定されないが、次のものを含む他の物質とのコンジュゲートを提供する：標識；色素；ポリマー；水可溶性ポリマー；ポリエチレングリコールの誘導体；光架橋剤；放射性核種；細胞障害性化合物；薬剤；親和標識；光親和標識；反応性化合物；樹脂；第2のタンパク質またはポリペプチドまたはポリペプチド類似体；抗体または抗体断片；金属キレート剤；補助因子；脂肪酸；炭水化物；ポリヌクレオチド；DNA；RNA；アンチセンスポリヌクレオチド；サッカライド；水可溶性デンドリマー；シクロデキストリン；抑制性リボ核酸；生体材料；ナノ粒子；スピン標識；フルオロフォア、金属含有成分；放射性成分；新規官能基；共有結合でまたは非共有結合で他の分子と相互作用する基；フォトケージ化成分；光化学作用照射励起性成分；光異性化可能な成分；ビオチン；ビオチン誘導体；ビオチン類似体；重原子を組み込んだ成分；化学的切断可能な基；光切断可能な基；延長側鎖；炭素結合型糖；レッドックス活性剤；アミノチオ酸；毒成分；同位体標識成分；生物物理学的プローブ；リン光基；化学発光基；高電子密度基；磁性基；インターカレート基；発色団；エネルギー遷移剤；生理活性物質；検出可能標識；小分子；量子ドット；ナノトランスミッター；放射性核種標識ヌクレオチド；放射性核種標識トランスミッター；中性子捕獲剤；もしくはいずれかの上記の組み合わせ、またはいずれかの他の望ましい化合物または物質。本発明は、また、アジドまたはアセチレン成分を有する物質と、対応するアセチレンまたはアジド成分を有する PEG ポリマー誘導体とのコンジュゲートを含む。例えば、アジド成分を含む PEG ポリマーは、遺伝的にコードされないアミノ酸を有するタンパク質中の位置のアセチレン官能性を有する生物学的に活性な分子に結合できる。PEG および生物学的に活性な分子が連結される結合には、限定されないが、Huisgen [3+2] 付加環化生成物が含まれる。

20

30

【0192】

PEG が、生体材料の表面を改質するために使用できることは、当技術分野で充分確立されている（例えば、米国特許第 6,610,281 号；Mehvar、R.、J. Pharm Pharm Sci.、3 (1)：125-136 (2000) を参照。これらの文献は、参照によって本明細書に組み込まれる）。本発明は、また、Huisgen [3+2] 付加環化結合を介して表面に結合した 1 つまたは複数の反応性アジドまたはアセチレン部位および 1 つまたは複数の本発明のアジドまたはアセチレン含有ポリマーを有する表面を含む生体材料を含む。生体材料および他の物質は、また、アジドまたはアセチレン結合以外の結合によって、例えば、カルボン酸、アミン、アルコールまたはチオール成分を含む結合によってアジドまたはアセチレン活性化ポリマー誘導体に結合し、その後の反応で利用できるアジドまたはアセチレン成分を残すことができる。

40

【0193】

本発明は、本発明のアジドおよびアセチレン含有ポリマーの合成方法を含む。アジド含有 PEG 誘導体の場合には、アジドは、ポリマーの炭素原子に直接結合できる。あるいは、アジド含有 PEG 誘導体は、1 つの末端にアジド成分を有する連結剤を従来法の活性化

50

ポリマーに結合させ、それにより、得られたポリマーの末端にアジド成分を持たせることにより調製できる。アセチレン含有PEG誘導体の場合には、アセチレンを、ポリマーの炭素原子に直接結合させることができる。あるいは、アセチレン含有PEG誘導体は、1つの末端にアセチレン成分を有する連結剤を従来法の活性化ポリマーに結合させ、それにより、得られたポリマーの末端にアセチレン成分を持たせることにより調製できる。

【0194】

さらに具体的には、アジド含有PEG誘導体の場合には、少なくとも1つの活性ヒドロキシル成分を有する水溶性ポリマーが反応して、さらに反応性の高い成分、例えば、メシラート、トレシラート、トシラートまたはハロゲン脱離基、を有する置換ポリマーを生成する。ハロゲン化スルホニル酸、ハロゲン原子および他の脱離基含有PEG誘導体の調製と使用は、当業者には既知である。得られた置換ポリマーは、次に、反応して、ポリマーの末端でより反応性の高い成分をアジド成分に置換する。あるいは、少なくとも1つの活性求核または求電子成分を有する水溶性ポリマーが末端にアジドを有する連結剤と反応してPEGポリマーと連結剤の間に共有結合を形成し、アジド成分がポリマーの末端に配置される。アミン、チオール類、ヒドラジド、ヒドラジン、アルコール、カルボキシラート、アルデヒド、ケトン、チオエステルチオエステル、等の求核および求電子成分が、当業者には知られている。

10

【0195】

さらに具体的には、アセチレン含有PEG誘導体の場合には、少なくとも1つの活性ヒドロキシル成分を有する水溶性ポリマーが反応して、アセチレン成分を含む前駆物質からハロゲンまたは他の活性化脱離基を置換する。あるいは、少なくとも1つの活性求核または求電子成分を有する水溶性ポリマーが末端にアセチレンを有する連結剤と反応し、PEGポリマーと連結剤の間に共有結合を形成して、アセチレン成分がポリマーの末端におかれる。有機合成に関するハロゲン成分、活性化脱離基、求核および求電子成分の使用と調製、ならびにPEG誘導体の使用は、当技術分野の実務担当者の間では十分に確立されている。

20

【0196】

本発明は、また、他の物質の付加によるタンパク質の選択的改変を行い、改変タンパク質に変える方法を提供し、この物質には、限定されないが、水溶性ポリマー、例えば、アジドまたはアセチレン成分を含むPEGおよびPEG誘導体が含まれる。アジドおよびアセチレン含有PEG誘導体は、表面および分子の特性を改変するために使用できる。この表面および分子の特性の改変は、生体適合性、安定性、溶解度および免疫原性低減にとって重要であり、また一方で、当技術分野で従来既知のものよりPEG誘導体のタンパク質との結合に対する選択性の高い手段を提供する。

30

【0197】

本発明で使用する組換え核酸の一般的作製方法

多くの本発明の実施形態では、対象レラキシンポリペプチドをコードする核酸は、単離され、クローン化され、また、しばしば組換え方法を使って改変される。このような実施形態は、限定されないが、タンパク質発現のため、または変異体、誘導体、発現カセット、またはレラキシンポリペプチド由来の他の配列の生成の間等に、使用される。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする配列は、異種のプロモーターに機能的に連結されている。

40

【0198】

レラキシンポリペプチドをコードする天然ではコードされないアミノ酸を含むヌクレオチド配列は、限定されないが、配列番号1および配列番号2で示されるアミノ酸配列を有し、効果関連アミノ酸残基の挿入（すなわち、組み込みまたは置換）または除去（すなわち、欠失または置換）を起こさせるようにヌクレオチド配列を変える、等により、親ポリペプチドのアミノ酸配列をベースに合成できる。ヌクレオチド配列は、従来法の部位特異的変異誘発により都合よく改変できる。あるいは、ヌクレオチド配列は、限定されないが、オリゴヌクレオチドシンセサイザーを使う等の化学合成により調製でき、この場合、オ

50

リボヌクレオチドが所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき設計され、好ましくは、組換えポリペプチドが産生される宿主細胞に適したコドンが選択される。

【0199】

本発明は、組換え遺伝学の分野のルーチン技術を利用する。本発明で使用される一般的方法を開示する基本的な内容は、Sambrook et al.、分子クローニング、実験マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) (3rd ed. 2001); Kriegl er、遺伝子導入と発現：実験マニュアル (Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual) (1990); および、分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (Ausubel et al., eds., 1994))、に含まれる。

10

【0200】

分子生物学的技術を記載する一般的な内容は、Berger and Kimrnel、分子クローニング技術ガイド、酵素学による方法 (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology), volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al.、分子クローニング、実験マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (「Sambrook」) および分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)、F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1999から追補) (「Ausubel」))、に含まれる。これらの文献は、変異誘発、ベクター、プロモータの使用および、限定されないが、非天然アミノ酸、直交tRNA、直交性シンテターゼ、およびそれらの対を含むタンパク質の産生用セレクトターコドンを含む遺伝子またはポリヌクレオチドの生成、等に関連した多くの関連トピックスについて記載している。

20

30

【0201】

限定されないが、新規シンテターゼまたはtRNAを産生するため、tRNA分子を変異させるため、シンテターゼをコードするポリヌクレオチドを変異させるため、tRNAのライブラリー構築のため、シンテターゼのライブラリー構築のため、セレクトターコドン生成のため、対象タンパク質またはポリペプチド中に非天然アミノ酸をコードするセレクトターコドンを挿入するため、等の種々の目的のために、種々の型の変異誘発が本発明で使用される。これらには、限定されないが、部位特異的、ランダム点変異誘発、相同組換え、DNAシャフリングまたは他の再帰的変異誘発、キメラ構築、ウラシル含有テンプレート使用変異誘発、オリゴヌクレオチド指定変異誘発、ホスホロチオエート改変DNA変異誘発、ギャップ二重鎖DNA等使用変異誘発、PCT媒介変異誘発、またはこれらのいずれかの組み合わせが含まれる。さらなる適切な方法には、ポイントミスマッチ修復、修復欠損宿主株使用変異誘発、制限選択および制限精製、欠失変異誘発、全遺伝子合成による変異誘発、二重鎖切断修復、等が含まれる。限定されないが、キメラ構築物を含む変異誘発もまた、本発明に含まれる。一実施形態では、変異誘発は、限定されないが、配列、配列比較、物理学的性質、2次、3次、4次構造、結晶構造、等の天然分子または改変もしくは変異天然分子の既知の情報により導かれうる。

40

【0202】

本明細書で認められる説明と例は、これらの手続きを記載している。追加の情報は、下記の出版物およびそこに引用された文献から見付けられる：Ling et al., DNA変異誘発方法 (Approaches to DNA mutagenesis);

50

概説 (overview)、Anal Biochem. 254 (2) : 157-178 (1997); Dale et al.、ホスホロチオエート法を使ったオリゴヌクレオチド指定ランダム変異誘発 (Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method)、Methods Mol. Biol. 57: 369-374 (1996); Smith、インビトロ変異誘発 (Invitro mutagenesis)、Ann. Rev. Genet. 19: 423-462 (1985); Botstein & Shortle、インビトロ変異誘発の戦略と応用 (Strategies and applications of invitro mutagenesis)、Science 229: 1193-1201 (1985); Carter、部位特異的変異誘発 (Site-directed mutagenesis)、Biochem. J. 237: 1-7 (1986); Kunkel、Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987) 中の、オリゴヌクレオチド定方向変異誘発の効率 (The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis); Kunkel、表現型の選択を伴わない迅速および効率的部位特異的変異誘発 (Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985); Kunkel et al.、表現型の選択を伴わない迅速および効率的部位特異的変異誘発 (Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection)、酵素学による方法 (Methods in Enzymol)、154、367-382 (1987); Bass et al.、新規DNA結合特異性を有する変異Trpサプレッサー (Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities)、Science 242: 240-245 (1988); Zoller & Smith、M13由来ベクターを使ったオリゴヌクレオチド指定変異誘発: 任意のDNA断片中の点変異の産生のための効率的および一般的手法 (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、M13ベクターに挿入されたDNA断片のオリゴヌクレオチド指定変異誘発、酵素学による方法 (Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors、Methods in Enzymol)、100: 468-500 (1983); Zoller & Smith、オリゴヌクレオチド指定変異誘発: 2つのオリゴヌクレオチドプライマーおよび単鎖DNAテンプレートを使った簡便法、酵素学による方法 (Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template、Methods in Enzymol). 154: 329-350 (1987); Taylor et al.、制限酵素反応におけるニックの入ったDNA調製のためのホスホロチオエート修飾DNAの使用 (The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA)、Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al.、ホスホロチオエート修飾DNAを使ったオリゴヌクレオチド指定変異の高頻度迅速生成 (The r

10

20

30

40

50

apid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA)、Nucl. Acids Res. 13:8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein、ホスホロチオエート基による制限エンドヌクレアーゼ Nci I 切断の抑制およびオリゴヌクレオチド指定変異誘発への適用 (Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis)、Nucl. Acids Res. 14:9679-9698 (1986); Sayers et al.、ホスホロチオエートベースオリゴヌクレオチド指定変異誘発における5'-3'エキソヌクレアーゼ (5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis)、Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayers et al.、臭化エチジウムの存在下の制限エンドヌクレアーゼとの反応によるホスホロチオエート含有DNAの鎖特異的切断 (Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide)、(1988) Nucl. Acids Res. 16:803-814; Kramer et al.、オリゴヌクレオチド指定変異形成向けギャップ二重鎖DNA手法 (The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction)、Nucl. Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramer & Fritz、ギャップ二重鎖DNAを介したオリゴヌクレオチド指定変異形成、酵素学による方法 (Oligonucleotide-directed construction of mutations via a gapped duplex DNA、Methods in Enzymol). 154:350-367 (1987); Kramer et al.、オリゴヌクレオチド指定変異形成向けギャップ二重鎖DNA手法における改良酵素インビトロ反応 (Improved enzymatic invitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations)、Nucl. Acids Res. 16:7207 (1988); Fritz et al.、オリゴヌクレオチド指定変異形成: インビトロ酵素反応を使わないギャップ二重鎖DNA法 (Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions invitro)、Nucl. Acids Res. 16:6987-6999 (1988); Kramer et al.、大腸菌のメチル指定DNAミスマッチ修復系により、異なる塩基/塩基ミスマッチが異なる効率で修正される (Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of E. coli)、Cell 38:879-887 (1984); Carter et al.、M13ベクターを使った改良オリゴヌクレオチド部位指定変異誘発 (Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors)、Nucl. Acids Res. 13:4431-4443 (1985); Carter、M13ベクターを使った改良オリゴヌクレオチド指定変異誘発、酵素学による方法 (Improved oligonucleotide-directed

10

20

30

40

50

mutagenesis using M13 vectors、Methods in Enzymol). 154:382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff、大きな欠失を生成するためのオリゴヌクレオチドの使用 (Use of oligonucleotides to generate large deletions)、Nucl. Acids Res. 14:5115 (1986) ; Wells et al.、スブチリシンの遷移状態を安定化における水素結合形成の重要性 (Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin)、Phil. Trans. R. Soc. Lond. A317:415-423 (1986) ; Nambiar et al.、リボヌクレアーゼSタンパク質をコードする遺伝子の全合成およびクローニング (Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein)、Science 223:1299-1301 (1984) ; Sakmar and Khorana、ウシ桿体外節グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (トランスデュシン) のアルファサブユニットに対する遺伝子の全合成および発現 (Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin))、Nucl. Acids Res. 14:6361-6372 (1988) ; Wells et al.、カセット変異導入: 指定部位での複数変異生成のための効率的な方法 (Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites)、Gene 34:315-323 (1985) ; Grundstrom et al.、微小規模「ショットガン」遺伝子合成によるオリゴヌクレオチド指定変異誘発

(Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis)、Nucl. Acids Res. 13:3305-3316 (1985) ; Mandeck i、大腸菌プラスミド中のオリゴヌクレオチド指定二重鎖切断修復: 部位特異的変異誘発法 (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、特異な環境に対するタンパク質工学 (Protein engineering for unusual environments)、Current Opinion in Biotechnology、4:450-455 (1993) ; Sieber、etal.、Nature Biotechnology、19:456-460 (2001) ; W. P. C. Stemmer、Nature 370、389-91 (1994) ; および、I. A. Lorimer、I. Pastan、Nucleic Acids Res. 23、3067-8 (1995)。上記方法の中の多くに対する追加の詳細は、酵素学による方法、Volume 154、で見つけることができる。これには、また、種々の変異誘発法に伴うトラブルシューティング問題に対する有用な制御手段を記載している。

【0203】

例えば、本発明の変異誘発、例えば、シンテターゼの変異ライブラリー、またはtRNAの改変、に使用するためのオリゴヌクレオチドは、通常、例えば、Needham-VanDevanter et al.、Nucleic Acids Res.、12:6159-6168 (1984) に記載の自動化シンセサイザーを使って、Beauche and Caruthers、Tetrahedron Letts. 22 (20

) : 1859-1862、(1981)に記載されている固相ホスホラミダイトトリエステル法により化学的に合成される。

【0204】

本発明は、また、真核生物宿主細胞、非真核生物宿主細胞、および直交 tRNA/R S 対を介した、非天然アミノ酸のインビボ組み込み用の生物に関する。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチド、限定されないが、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであってもよい本発明のベクター等を含む本発明のポリヌクレオチドまたは構築物で、遺伝的に操作（限定されないが、形質転換、形質導入、または形質移入、を含む）されている。例えば、直交 tRNA、直交 tRNA シンテターゼのコーディング領域、および誘導体化されるタンパク質は、所望の宿主細胞中で機能する遺伝子発現調節領域に機能的に連結される。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、バクテリア、ウイルス、裸のポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドコンジュゲートの形であってもよい。ベクターは、細胞および/または微生物中に、次記を含む標準的な方法で導入される：電気穿孔（Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)）、ウイルスベクターによる感染、小ビーズまたは粒子のマトリックス中または表面上に核酸を含む小粒子を使った高速弾道貫入（Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)）、等。核酸を細胞中へインピトロで導入する適切な技術には、リポソーム、微量注入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、等の使用が含まれる。インビボ遺伝子導入技術には、限定されないが、ウイルス（通常、レトロウイルス）ベクターを使ったトランスフェクションおよびウイルスコートタンパク質リポソーム媒介トランスフェクションが含まれる [Dzau et al., Trends in Biotechnology 11: 205-210 (1993)]。一部の状況では、細胞表面膜タンパク質または標的細胞特異的抗体、標的細胞上の受容体に対するリガンド、等の標的細胞をターゲットとする薬剤を含む核酸ソースを提供することが望ましい場合もある。リポソームが採用される場合には、ターゲティングのため、および/または取込を促進するために、エンドサイトーシスに参与する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が使用できる。このタンパク質としては、例えば、特定細胞型指向性カプシドタンパク質またはその断片、循環で内部移行するタンパク質に対する抗体、細胞内の局在部位を標的とし、細胞内半減期を延長するタンパク質、等がある。

【0205】

操作された宿主細胞は、例えば、選別ステップ、プロモーターの活性化または形質転換体の選択、等の作用に適切となるように改良された通常の栄養素培地中で培養できる。これらの細胞は、任意選択で、形質転換体中で培養してもよい。他の有用な文献には、限定されないが、細胞単離および培養に対して（例えば、その後の核酸単離のために）下記が含まれる：Freshney (1994) 動物細胞の培養、基本技術マニュアル (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique)、第3版、Wiley-Liss、New York およびそこに引用された文献；Payne et al. (1992) 植物細胞および液体系中での組織培養 (Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems)、John Wiley & Sons、Inc. New York、NY；Gamborg and Phillips (eds.) (1995) 植物細胞、組織および器官培養 (Plant Cell, Tissue and Organ Culture)；Fundamental Methods Springer Lab Manual、Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) および Atlas and Parks (eds.) 微生物培地ハンドブック (The Handbook of Microbiological Media) (1993) CRC Press、Boca Raton、FL。

【0206】

いくつかのよく知られた標的核酸を細胞中に導入する方法が利用可能であり、その内の

10

20

30

40

50

いずれも本発明で利用できる。これらには、：レシピエント細胞のDNA含有細菌プロトプラストとの融合体、電気穿孔、微粒子銃、およびウイルスベクターによる感染（後でさらに考察）、等が含まれる。細菌細胞は、本発明のDNA構築物を含むプラスミドの数を増幅するために使用できる。細菌は、対数期まで成長し、細菌中のプラスミドは、当技術分野で既知の種々の方法で単離できる（例えば、Sambrook参照）。さらに、細菌からプラスミドを精製するキットが市販されている（例えば、Easy Prep（登録商標）、Flexi Prep（登録商標）、＜両方共Pharmacia Biotech＞；StrataClean（登録商標）＜Stratagene＞；および、QIAprep（登録商標）＜Qiagen＞を参照）。単離および精製プラスミドは、次に、さらに操作されて他のプラスミドを生成し、細胞に形質移入するために使用されるか、または生物に感染させるために関連ベクター中に組み込まれる。典型的ベクターは、転写および翻訳ターミネーター、転写および翻訳開始配列、ならびに特定の標的核酸の発現調節に有用なプロモーターを含む。ベクターは、任意選択で、少なくとも1つの独立したターミネーター配列、真核生物もしくは原核生物または両方でカセットの複製を可能とする配列（限定されないが、シャトルベクターを含む）および原核生物および真核生物系両方用の選択マーカーを含む遺伝子発現カセットを含む。ベクターは、原核生物、真核生物、または両方中での複製および組込みに適している。Gillam & Smith、Gene 8：81（1979）；Roberts、et al.、Nature、328：731（1987）；Schneider、E.、et al.、Protein Expr. Purif. 6（1）：10-14（1995）；Ausubel、Sambrook、Berger（全て、前出）を参照されたい。クローニングに有用な細菌およびバクテリオファージのカatalogは、例えば、ATCCにより、例えば、細菌およびバクテリオファージのATCCカatalog（The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage）（1992）Ghera et al.（eds）published by the ATCC、として提供されている。追加のシーケンシング、クローニングおよび他の分子生物学の態様のための基本的方法ならびに基礎理論的考察は、また、Watson et al.（1992）組換えDNA（Recombinant DNA）Second Edition Scientific American Books、NY、で見つけられる。さらに、基本的にいずれの核酸（および、標準品でも、非標準品でも、実質的にいずれの標識核酸でも）も、種々の市販業者、例えば、Midland Certified Reagent Company（Midland、TX：World Wide Webのmcrc.comから利用可能）、The Great American Gene Company（Ramona、CA：World Wide Webのgenco.comから利用可能）、ExpressGen Inc.（Chicago、IL：World Wide Webのexpressgen.comから利用可能）、Operon Technologies Inc.（Alameda、CA）およびその他の多くの業者のいずれかにカスタムオーダー、または標準的オーダーができる。

【0207】

セレクトターコドン

本発明のセレクトターコドンは、タンパク質生合成機構の遺伝子コドンフレームワークを拡張する。例えば、セレクトターコドンは、限定されないが、ユニーク3塩基コドン、ナンセンスコドン、例えば、限定されないが、アンバーコドン（UAG）、オーカーコドンまたはオパールコドン（UGA）等の停止コドン、非天然コドン、4つ以上の塩基コドン、レアコドン、等を含む。所望の遺伝子またはポリヌクレオチド中に導入可能なセレクトターコドンの数は、限定されないが、少なくとも一部のレラキシシポリペプチドをコードする単一ポリヌクレオチド中の、1つ以上、2つ以上、3つ以上、4、5、6、7、8、9、10以上を含む広範囲に及ぶことは、当業者には容易に明らかである。また、所望の遺伝子またはポリヌクレオチド中に導入可能なセレクトターコドンの数は、限定されないが、少なくとも一部のレラキシシポリペプチドをコードするA鎖およびB鎖ポリヌクレオチド中

の、1つ以上、2つ以上、3つ以上、4、5、6、7、8、9、10以上の合計数を含む
広範囲に及ぶことは、当業者には容易に明らかである。

【0208】

一実施形態では、方法は、1つまたは複数の非天然アミノ酸のインビボ組み込みのための
の停止コドンであるセクターコドンの使用を含む。例えば、限定されないが、UAGを
含む停止コドンを認識するO-tRNAが産生され、所望の非天然アミノ酸を使ってO-
RSによりアミノアシル化される。このO-tRNAは、天然宿主のアミノアシル-tR
NAシンテターゼには認識されない。通常部位特異的変異誘発は、対象ポリペプチドの
対象部位に、限定されないが、TAGを含む停止コドンを導入するために使用できる。例
えば、Sayers, J. R., et al. (1988)、ホスホロチオエートベース
オリゴヌクレオチド指定変異誘発における5'-3'エキソヌクレアーゼ (5'-3' E
xonucleases in phosphorothioate-based ol
igonucleotide-directed mutagenesis). Nuc
leic Acids Res, 16:791-802、を参照されたい。O-RS、O-tR
NAおよび対象ポリペプチドをコードする核酸が、インビボで組み合わせられる場合、非天
然アミノ酸が、UAGコドンに応答して組み込まれ、指定位置に非天然アミノ酸を含むポ
リペプチドが生成する。

10

【0209】

非天然アミノ酸のインビボ組み込みは、真核生物宿主細胞の大きな変化もなく実行でき
る。例えば、UAGコドンに対する抑制効率は、限定されないが、アンバーサプレッサー
tRNAを含むO-tRNA、および真核生物終結因子（限定されないが、eRFを含む
）（これが停止コドンに結合し、成長しているペプチドのリボソームからの放出を開始す
る）の間の競合に依存するため、抑制効率は、限定されないが、O-tRNAの発現レベ
ル、および／またはサプレッサーtRNAの増加により調節できる。

20

【0210】

非天然アミノ酸は、また、レアコドンでコードすることもできる。例えば、インビトロ
タンパク質合成反応でのアルギニン濃度が低い場合、レアアルギニンコドンのAGGが、
アラニンでアシル化された合成tRNAによるAlaの挿入に対し、効果的であるとわか
る。例えば、Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (199
3)を参照されたい。このケースでは、合成tRNAは、マイナーな大腸菌種として存在
する天然tRNA Argと競合する。一部の生物は、全てのトリプレットコдонは使わな
い。ミクロコッカスルテウスの未割り付けコдонAGAは、インビトロ転写／翻訳抽出物
中へのアミノ酸の挿入に利用されている。例えば、Kowal and Oliver,
Nuc l. Acid. Res., 25:4685 (1997)を参照されたい。本発明の
成分は、これらのレアコドンインビボで使って生成できる。

30

【0211】

セクターコдонは、また、拡張コдон、限定されないが、4以上の塩基コдон、例え
ば、4、5、6、または7以上の塩基コдонを含む。4塩基コдонの例には、限定されな
いが、AGGA、CUAG、UAGA、CCCU、等が含まれる。5塩基コдонの例には
、限定されないが、AGGAC、CCCCU、CCCU C、CUAGA、CUACU、U
AGGC、等が含まれる。本発明の特徴には、フレームシフト抑制に基づく拡張コдонの
使用が含まれる。4以上の塩基コдонは、限定されないが、ひとつまたは複数の非天然ア
ミノ酸、等を同じタンパク質中に挿入できる。例えば、限定されないが、アンチコドンル
ープ、例えば、少なくとも8~10 ntアンチコドンループを有する特異的フレームシフ
トサプレッサーtRNA、等の変異O-tRNAの存在下、4以上の塩基コдонが単一ア
ミノ酸として読み取られる。他の実施形態では、アンチコドンループは、限定されないが
、少なくとも4塩基コдон、少なくとも5塩基コдон、または少なくとも6塩基コдон以
上等をデコードできる。256の可能な4塩基コдонが存在するので、4以上の塩基コ
ドンを使って同じ細胞中で複数の非天然アミノ酸をコードできる。Anderson et
al., (2002)コдонおよびアンチコドンサイズ限界の探索 (Explorin

40

50

g the Limits of Codon and Anticodon Size)
)、Chemistry and Biology、9:237-244; Magliery、(2001) 遺伝暗号の拡張: 4塩基コドンの効率的サプレッサーの選択と大腸菌のライブラリー手法を使った「シフトしやすい(Shifty)」4塩基コドンの特定(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、を参照されたい。

10

【0212】

例えば、4塩基コドンは、非天然アミノ酸を、インビトロ生合成法を使ってタンパク質中に組み込むのに使用されている。例えば、Ma et al.、(1993) Biochemistry、32:7939; および Hoshaka et al.、(1999) J. Am. Chem. Soc.、121:34、を参照されたい。CGGGおよびAGGUは、2-ナフチルアラニンおよびリシンのNBD誘導体をストレプトアビジン中に、2つの化学的アシル化フレームシフトサプレッサー-tRNAを使って、インビトロで同時に組み込むのに使用された。例えば、Hoshaka et al.、(1999) J. Am. Chem. Soc.、121:12194、を参照されたい。インビボ調査で、Moore et al. は、NCUAアンチコドンに有するtRNA^{Leu}誘導体のUAGNコドンを抑制する能力を調べ(Nは、U、A、G、またはCであってよい)、4つ組みUAGAは、UCUAアンチコドンに有するtRNA^{Leu}により、13~26%の効率で、0または-1フレームでのデコードがほとんど無い状態でコード可能であることを見出した。Moore et al.、(2000) J. Mol. Biol.、298:195、を参照されたい。一実施形態では、レアコドンまたはナンセンスコドンに基づく拡張コドンは、本発明で使用可能で、他の望ましくない部位でのミスセンス読み過ぎおよびフレームシフト抑制を減らすことができる。

20

【0213】

所与の系に対しては、セクターコドンは、また、天然の3塩基コドンの1つを含んでもよく、その場合、内在系は、天然塩基コドンを使わない(または減多に使わない)。例えば、これは、天然3塩基コドンを認識するtRNAを欠いている系および/または3塩基コドンがレアコドンである系を含む。

30

【0214】

セクターコドンは、任意選択で、非天然塩基対を含んでもよい。これらの非天然塩基対では、既存遺伝子アルファベット文字をさらに拡張する1つの余分の塩基対は、トリプレットコドンの数を、64から125に増やす。第3の塩基対の特性には、安定な、選択的塩基対形成、ポリメラーゼによる効率的な酵素によるDNA中への高精度組み込み、および発生期の非天然塩基対合成後のプライマー延長の効率的継続、が含まれる。方法と組成物に適用可能な非天然塩基対の記載には、例えば、Hirao et al.、(2002)、アミノ酸類似体のタンパク質中への組み込みのための非天然塩基対(Anunnatural base pair for incorporating amino acid analogues in to protein)、Nature Biotechnology、20:177-182、が含まれる。また、Wu、Y. et al.、(2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630、も参照されたい。他の関連出版物は、以下に挙げる。

40

【0215】

インビボ使用法に関しては、非天然ヌクレオシドは、膜透過性であり、リン酸化されて、対応するトリホスファートを形成する。さらに、増加した遺伝子情報は安定で、細胞内酵素には破壊されない。Bennerその他による以前の試みは、標準的なWatson-Crick対のものとは異なる水素結合パターン(その最も顕著な例は、イソC:イソ

50

G対である)を利用した。例えば、Switzer et al.、(1989) J. Am. Chem. Soc.、111:8322;およびPiccirilli et al.、(1990) Nature、343:33;Kool、(2000) Curr. Opin. Chem. Biol.、4:602、を参照されたい。これらの塩基は、一般的に、天然塩基とはある程度まではミスペアを形成し、酵素的に複製され得ない。Koolと共同研究者は、塩基間の疎水性パッキング相互作用が、水素結合に置き換わり、塩基対の形成を進行させることができることを示した。Kool、(2000) Curr. Opin. Chem. Biol.、4:602;およびGuckian and Kool、(1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl.、36、2825、を参照されたい。上記全要求を満たす非天然塩基対を開発する試みで、Schultz、Rombergと共同研究者は、系統的に合成し、一連の非天然疎水性塩基を調べた。PICS:PICS自己相補塩基対が、天然塩基対よりも安定であることがわかり、大腸菌DNAポリメラーゼI(KF)のクレノー断片により、DNA中に効率的に組み込むことができている。例えば、McMinn et al.、(1999) J. Am. Chem. Soc.、121:11585-6;およびOgawa et al.、(2000) J. Am. Chem. Soc.、122:3274、を参照されたい。3MN:3MN自己相補塩基対は、KFにより合成でき、生物学的機能にとって十分な効率と選択性を有する。例えば、Ogawa et al.、(2000) J. Am. Chem. Soc.、122:8803、を参照されたい。しかし、両塩基ともさらなる複製に対し、鎖ターミネーターとして作用する。最近、PICS自己相補塩基対を複製するのに使用できる変異体DNAポリメラーゼが登場した。さらに、7AI自己相補塩基対が複製できる。例えば、Tae et al.、(2001) J. Am. Chem. Soc.、123:7439、を参照されたい。新規金属塩基対、Dipic:Py、も開発され、これは、Cu(II)に結合時に安定対を形成する。Meggers et al.、(2000) J. Am. Chem. Soc.、122:10714、を参照されたい。拡張コドンおよび非天然コドンは、本質的に天然コドンに直交するので、本発明の方法は、この特性を利用して、それら用の直交性tRNAを生成できる。

【0216】

翻訳回避系(translational bypassing system)も、また、非天然アミノ酸の所望のポリペプチド中への組み込みに使用できる。翻訳回避系では、大きな配列が遺伝子中に組み込まれるが、タンパク質に翻訳されない。配列を読み飛ばし、挿入下流の翻訳を再開するようにリボソームを誘導するためのキューとして作用する構造を含む。

【0217】

特定の実施形態では、本発明方法および/または組成物で使われる対象タンパク質またはポリペプチド(またはその一部)は、核酸によりコードされる。典型的には、核酸は、少なくとも1つのセクターコドン、少なくとも2つのセクターコドン、少なくとも3つのセクターコドン、少なくとも4つのセクターコドン、少なくとも5つのセクターコドン、少なくとも6つのセクターコドン、少なくとも7つのセクターコドン、少なくとも8セクターコドン、少なくとも9セクターコドン、10以上のセクターコドンを含む。

【0218】

対象タンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、当業者には既知の、および本明細書記載の方法を使って、例えば、非天然アミノ酸の組み込み用の1つまたは複数のセクターコドンを含むように変異誘発できる。例えば、対象タンパク質用の核酸は、変異誘発されて、1つまたは複数のセクターコドンを含み、1つまたは複数の非天然アミノ酸の組み込みを提供する。本発明は、いずれかのこのような変異体、これには、限定されないが、変異体、例えば、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む種々の型の内のいずれかのタンパク質を含む。同様に、本発明は、対応する核酸、すなわち、1つまたは複数の非天然アミノ酸をコードする1つまたは複数のセクターコドンを含むいずれかの核

酸、を含む。

【0219】

例えば、レラキシシポリペプチド等の対象タンパク質をコードする核酸分子は、容易に変異され、ポリペプチドの任意の所望の位置にシステインを導入できる。システインは、反応性分子、水溶性ポリマー、タンパク質、または各種の他の分子を、対象タンパク質に導入するのに広範に使用されている。ポリペプチドの所望の位置へのシステインの組み込みに適切な方法は、当業者には既知であり、例えば、米国特許第6,608,183号（この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のもの、および標準的変異誘発技術がある。

【0220】

天然ではコードされないアミノ酸

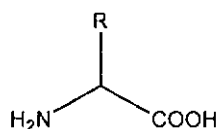
非常に多くの種類の天然ではコードされないアミノ酸が、本発明での使用に適する。どのような数の天然ではコードされないアミノ酸も、レラキシシポリペプチド中に導入可能である。一般的に、導入された天然ではコードされないアミノ酸は、20の共通の、遺伝的にコードされるアミノ酸（すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）に対し、実質的に化学的に不活性である。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、20の共通アミノ酸には認められない官能基（限定されないが、アジド、ケトン、アルデヒドおよびアミノオキシ基を含む）と、効率的、かつ選択的に反応して、安定なコンジュゲートを形成する側鎖官能基を含む。例えば、アジド官能基を含む天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシシポリペプチドは、ポリマー（限定されないが、ポリ（エチレングリコールを含む）または、代わりに、アルキン成分を含む第2のポリペプチドと反応し、Huisingen [3+2]付加環化生成物を形成するためのアジドおよびアルキン官能基の選択的反応により得られる安定なコンジュゲートを形成できる。

【0221】

アルファアミノ酸の一般的な構造を以下に図示する（式I）：

【化5】

I



【0222】

天然ではコードされないアミノ酸は、通常、上記に挙げた式を有するいずれかの構造であり、R基は、20の天然アミノ酸で使用されるものの以外の任意の置換基であり、本発明での使用に適切でありうる。本発明の天然ではコードされないアミノ酸は、通常、天然アミノ酸とは側鎖の構造のみが異なるものであるため、天然ではコードされないアミノ酸は、限定されないが、天然でコードされる、または天然でコードされないものを含む他のアミノ酸と、天然ポリペプチド中で形成されるのと同じ方式で、アミド結合を形成する。

【0223】

しかし、天然ではコードされないアミノ酸は、天然アミノ酸とは区別される側鎖基を有する。例えば、Rは、任意選択で、アルキル、アリール、アシル、ケト、アジド、ヒドロキシル、ヒドラジン、シアノ、ハロ、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、セレノ、スルホニル、ボラート、ボロナート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、ヘテロ環式、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ基、等またはこれらのいずれかの組み合わせを含む。本発明での使用に適切である

可能性がある他の対象非天然アミノ酸には、限定されないが、光活性化可能な架橋剤を含むアミノ酸、スピン標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規官能基を有するアミノ酸、共有結合でまたは非共有結合で他の分子と相互作用するアミノ酸、フォトケージ化および／または光異性化可能なアミノ酸、ビオチンまたはビオチン類似体含有アミノ酸、グリコシル化されたアミノ酸、例えば、糖置換セリン、他の炭水化物改変アミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポリエチレングリコールまたはポリエーテル含有アミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学的に切断可能なおよび／または光切断可能なアミノ酸、限定されないが、ポリエーテルまたは限定されないが、約10炭素より約5以上長い炭素を含む長鎖炭化水素、等の天然アミノ酸に比べて延長側鎖を有するアミノ酸、炭素結合型糖含有アミノ酸、レドックス活性アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、および1つまたは複数の毒成分を含むアミノ酸、が含まれる。

10

【0224】

本発明での使用に適切である可能性があり、水溶性ポリマーとの反応に有用である代表的な天然ではコードされないアミノ酸には、限定されないが、カルボニル、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、セミカルバジド、アジドおよびアルキン反応基を有するものが含まれる。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、サッカライド部分を含む。このようなアミノ酸の例には、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-ガラクトサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-トレオニン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-アスパラギンおよびO-マンノサミニル-L-セリン、が含まれる。このようなアミノ酸の例には、また、アミノ酸とサッカライドの間の天然のN-またはO-結合が、限定されないが、アルケン、オキシム、チオエーテル、アミド、等を含む通常は天然には見られない共有結合による連結により置換されている例が含まれる。このようなアミノ酸の例には、また、天然のタンパク質には見られない糖類、例えば、2-デオキシブドウ糖、2-デオキシガラクトース、等が含まれる。

20

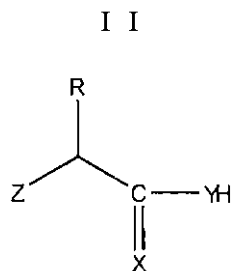
【0225】

本明細書で提供される天然ではコードされないアミノ酸の多くは、例えば、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Novabiochem (a division of EMD Biosciences, Darmstadt, Germany)、またはPeptech (Burlington, MA, USA) から市販されている。市販されていないものは、本明細書で提供されるように、または当業者には既知の標準的な方法を使って、任意選択で、合成される。有機合成技術に関しては、例えば、有機化学 (Organic Chemistry) : Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.) ; 最新有機化学 (Advanced Organic Chemistry) : March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) ; および最新有機化学 (Advanced Organic Chemistry) : Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York) 、を参照されたい。また、米国特許第7, 045, 337号、および同7, 083, 970号を参照されたい。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。新規側鎖を含む非天然アミノ酸に加えて、本発明での使用に適する可能性がある非天然アミノ酸は、また、任意選択で、限定されないが、式IIおよびIIIの構造：

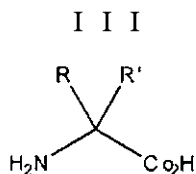
30

40

【化 6】



【化 7】



により図示されるような改変骨格構造を含み、

式中、Zは、通常、OH、NH₂、SH、NH-R'、またはS-R'を含み；XおよびYは、同じでも異なってもよいが、通常、SまたはOを含み、RおよびR'は、任意選択で、同じでも異なってもよいが、通常、式Iを有する非天然アミノ酸のための上述のR基用同じ成分リスト、ならびに水素から選択される。例えば、本発明の非天然アミノ酸は、任意選択で、式I IとI I Iで図示されるように、アミノまたはカルボキシ基に置換を含む。このタイプの非天然アミノ酸は、限定されないが、共通20天然アミノ酸または非天然側鎖に対応する側鎖を有するα-ヒドロキシ酸、α-チオ酸、α-アミノチオカルボキシレート等を含む。さらに、α炭素位置での置換は、任意選択で、限定されないが、L、D、またはα-α-二置換アミノ酸、例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチルーO-チロシン、アミノ酪酸、等を含む。他の構造的代替物には、環式アミノ酸、例えば、プロリン類似体、ならびに3、4、6、7、8、および9員環プロリン類似体、βおよびγアミノ酸、例えば、置換β-アラニンおよびγ-アミノ酪酸が含まれる。

【0 2 2 6】

多くの非天然アミノ酸は、天然アミノ酸、例えば、チロシン、グルタミン、フェニルアラニン、等をベースにしており、本発明での使用に適している。チロシン類似体には、限定されないが、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、およびメタ置換チロシンが含まれ、置換チロシンは、限定されないが、ケト基（限定されないが、アセチル基を含む）、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C6-C20直鎖または分岐炭化水素、飽和または不飽和の炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基、アルキニル基、等を含む。さらに、多置換アリール環も、また、意図されている。本発明での使用に適する可能性があるグルタミン類似体には、限定されないが、α-ヒドロキシ誘導体、γ-置換誘導体、環式誘導体、およびアミド置換グルタミン誘導体が含まれる。本発明での使用に適する可能性があるフェニルアラニン類似体の例には、限定されないが、パラ置換フェニルアラニン、オルト置換フェニルアラニン、およびメタ置換フェニルアラニンが含まれ、置換基には、限定されないが、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド、アジド、ヨード、プロモ、ケト基（限定されないが、アセチル基を含む）、ベンゾイル、アルキニル基、等が含まれる。本発明での使用に適する可能性がある非天然アミノ酸の具体的な例には、限定されないが、p-アセチルーL-フェニルアラニン、O-メチルーL-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチルーフェニルアラニン、O-4-アリルーL-チロシン、4-プロピルーL-チロシン、トリ-O-アセチルーGlcNAc b-セリン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピルーL-フェニルアラニ

10

20

30

40

50

ン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨードフェニルアラニン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、およびp-プロパルギルオキシフェニルアラニン、等が含まれる。本発明での使用に適する可能性がある種々の非天然アミノ酸の構造の例は、例えば、「非天然アミノ酸のインビボ組み込み (In vivo incorporation of unnatural amino acids)」のタイトルの国際公開第2002/085923号で提供されている。また、さらなるメチオン類似体に関しては、Kick et al.、(2002)、Staudingerライゲーション反応による化学選択的改変のためのアジドの組換えタンパク質への組み込み (Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation)、PNAS 99:19-24、も参照されたい。この文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。「非天然アミノ酸およびポリペプチドを含む組成物、その方法および使用」のタイトルの国際出願第PCT/US06/47822号 (参照によって本明細書に組み込まれる) は、限定されないが、p-アミノフェニルアラニンを含む芳香族アミン成分の還元アルキル化、および還元的アミノ化について記載している。

【0227】

一実施形態では、非天然アミノ酸 (例えば、p- (プロパルギルオキシ) -フェニルアラニン) を含むレキシンポリペプチドの組成物が提供される。p- (プロパルギルオキシ) -フェニルアラニンおよび、限定されないが、タンパク質および/または細胞、等を含む種々の組成物も提供される。一態様では、p- (プロパルギルオキシ) -フェニルアラニン非天然アミノ酸を含む組成物は、直交性tRNAをさらに含む。非天然アミノ酸は、限定されないが、アミノアシル結合により直交tRNAに共有結合、直交tRNAの末端リボース糖の3' OHまたは2' OHに共有結合、を含む直交tRNAに結合 (限定されないが、共有結合を含む) ができる。

【0228】

非天然アミノ酸を介してタンパク質中に組み込むことができる化学成分は、タンパク質の種々の利点および操作を提供する。例えば、ケト官能基の独特の反応性は、多くのヒドラジンまたはヒドロキシルアミン含有試薬のいずれかによるタンパク質のインビトロおよびインビボ選択的改変を可能とする。例えば、重原子非天然アミノ酸は、X線構造データの位相整合に有用でありうる。非天然アミノ酸を使った重原子の部位特異的導入は、また、重原子のための位置の選定に選択性および柔軟性を与える。光反応性非天然アミノ酸 (限定されないが、ベンゾフェノンおよびアリールアジド (限定されないが、フェニルアジド等) 側鎖を有するアミノ酸を含む) は、例えば、効率的インビボおよびインビトロによるタンパク質光架橋を可能とする。光反応性非天然アミノ酸の例には、限定されないが、p-アジドフェニルアラニンおよびp-ベンゾイルフェニルアラニンが含まれる。光反応性非天然アミノ酸を含むタンパク質は、次に、光反応基が提供する時間的制御の励起により自在に架橋されうる。一例では、非天然アミノ酸のメチル基は、核磁気共鳴および振動分光法の使用による局所構造および動力学的プローブとして同位体標識した、限定されないが、メチル基等で置換できる。例えば、アルキニルまたはアジド官能基は、[3+2]付加環化反応により分子を使ってタンパク質の選択的改変を可能とする。

【0229】

アミノ末端でポリペプチドに組み込まれる非天然アミノ酸は、20の天然アミノ酸および α -アミノ酸中に通用存在するNH₂基とは異なる第2の反応基 (式I参照) に使われるもの以外のいずれかの置換基であるR基から構成できる。類似の非天然アミノ酸は、 α -アミノ酸中に通常存在するCOOH基 (式I参照) とは異なる第2の反応基を有するカルボキシル末端の位置に組み込むことができる。

【0230】

本発明の非天然アミノ酸は、選択または設計して、20天然アミノ酸で利用できない追加の特性を与えることができる。例えば、非天然アミノ酸は、任意選択で、設計または選択して、例えば、それらが組み込まれるタンパク質の生物学的特性を変えることができる。例えば、非天然アミノ酸のタンパク質中への組み込みにより、任意選択で、以下の特性を変えることができる：毒性、体内分布、溶解度、安定性、例えば、熱、加水分解、三価、酵素分解耐性等、精製およびプロセッシング機能、構造特性、分光学的特性、化学および／または光化学的特性、触媒活性、レドックス潜在力、半減期、例えば、共有結合または非共有結合による他の分子との反応能力、等。

【0231】

非天然アミノ酸の構造および合成：カルボニル、カルボニル様、マスクカルボニル、保護カルボニル基、およびヒドロキシルアミン基

一部の実施形態では、本発明は、水溶性ポリマー、例えば、PEGに、オキシム結合によりに連結されたレラキシンを提供する。

【0232】

多くのタイプの天然ではコードされないアミノ酸がオキシム結合の形成に適する。これらには、限定されないが、カルボニル、ジカルボニル、またはヒドロキシルアミン基を含む天然ではコードされないアミノ酸が含まれる。このようなアミノ酸は、米国特許公開2006/0194256号、同2006/0217532、および号2006/0217289号ならびに「非天然アミノ酸およびポリペプチドを含む組成物、その方法および使用 (Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides)」のタイトルの国際公開第2006/069246号に記載されている。これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。天然ではコードされないアミノ酸は、また、米国特許第7,083,970号および同7,045,337号に記載されている。これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

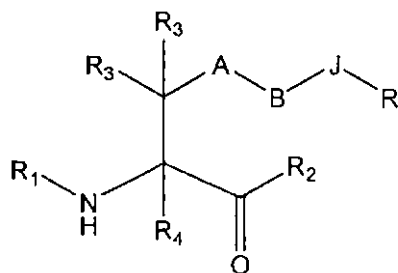
【0233】

本発明の一部の実施形態は、1つまたは複数の位置でパラアセチルフェニルアラニンアミノ酸で置換されているレラキシンポリペプチドを利用する。p-アセチル- (+/-)-フェニルアラニンおよびm-acetyl- (+/-)-フェニルアラニンの合成は、Zhang, Z., et al., Biochemistry 42:6735-6746 (2003)に記載されている。この文献は、参照によって組み込まれる。他のカルボニル-またはジカルボニル-含有アミノ酸は、当業者によって同様に調製できる。さらに、本明細書に含まれる非天然アミノ酸の非制限的合成例が、米国特許第7,083,970号の図4、24～34および36～39に示されている。この特許は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0234】

求電子反応基を有するアミノ酸は、特に、求核付加反応を介して分子を連結する種々の反応を可能とする。このような求電子反応基には、カルボニル基（ケト基およびジカルボニル基を含む）、カルボニル様基（カルボニル基（ケト基およびジカルボニル基を含む）に類似の反応性を有し、カルボニル基に構造的に類似である）、マスクカルボニル基（カルボニル基（ケト基およびジカルボニル基を含む）に容易に変換できる）、または保護カルボニル基（脱保護時にカルボニル基（ケト基およびジカルボニル基を含む）に類似の反応性を有する）が含まれる。このようなアミノ酸には、式 (IV)：

【化 8】



(IV)

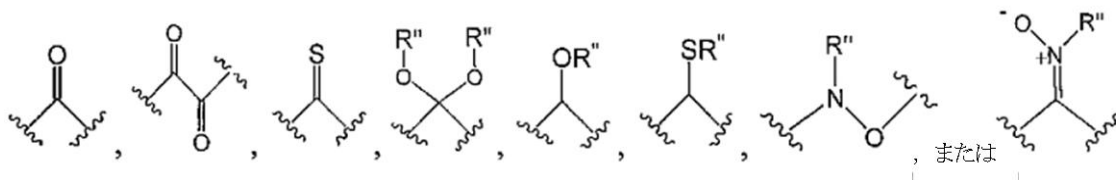
の構造を有するアミノ酸が含まれ、
式中：

Aは、任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン (alkarylene)、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Bは、任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、
-O-、-O- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-S-、-S- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-S(O)_k- (kは1、2、または3)、-S(O)_k (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)-、-C(O)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(S)-、-C(S)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')-、-NR'- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-CSN(R')-、-CSN(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')CO- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、
-N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、お
よび-C(R')₂-N(R')-N(R')-、からなる群より選択されるリンカーで、各R'は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

Jは、

【化 9】



であり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

各R''は、独立に、H、アルキル、置換アルキル、または保護基、または2つ以上のR''基が存在する場合は、2つのR''は、任意選択で、ヘテロシクロアルキルを形成し；

R₁は、任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R₂は、任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

各R₃およびR₄は、独立に、H、ハロゲン、低級アルキル、または置換低級アルキル、

10

20

30

40

50

または R_3 および R_4 または 2 つの R_3 基は、任意選択で、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成し；または $-A-B-J-R$ 基は、一緒に、二環式または三環式シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成し、これらは、少なくとも 1 つのジカルボニル基を含むカルボニル基、保護ジカルボニル基を含む保護カルボニル基、またはマスクジカルボニル基を含むマスクカルボニル基を含み；

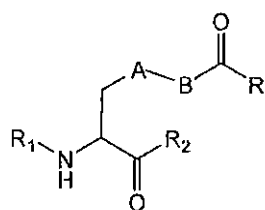
または $-J-R$ 基は一緒に単環式または二環式シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成し、これらは少なくとも 1 つのジカルボニル基を含むカルボニル基、保護ジカルボニル基を含む保護カルボニル基、またはマスクジカルボニル基を含むマスクカルボニル基を含む；

但し、 A が、フェニレンで、各 R_3 が H の場合は、 B が存在し； A が、 $-(CH_2)_4-$ であり、各 R_3 が H の場合は、 B は、 $-NH-C(O)-(CH_2CH_2)-$ ではなく；さらに A および B が存在せず、各 R_3 が H の場合は、 R はメチルではないものとする。

【0235】

さらに、式 (V)：

【化10】



(V)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

A は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

B は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S-$ 、 $-S-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S(O)_k-$ (k は 1、2、または 3)、 $-S(O)_k$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')CO-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ 、からなる群より選択されるリンカーで、各 R' は独立に、 H 、アルキル、または置換アルキルであり；

R は、 H 、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、 H 、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

10

20

30

40

50

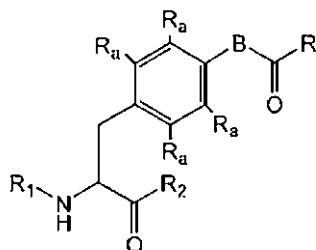
R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである；

但し、Aが、フェニレンの場合は、Bが存在し；Aが $-(CH_2)_4-$ である場合は、Bは、 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ ではなく；さらにAおよびBが存在しない場合は、Rはメチルではないものとする。

【0236】

さらに、式(VI)：

【化11】



(VI)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、
式中：

Bは、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は1、2、または3）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ 、 $-$ 、からなる群より選択されるリンカーで、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

各 R_a は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_kR'$ （ k は1、2、または3）、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、および $-S(O)_kR'$ 、 $-$ 、からなる群より独立に選択され、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルである。

【0237】

さらに、下記のアミノ酸：

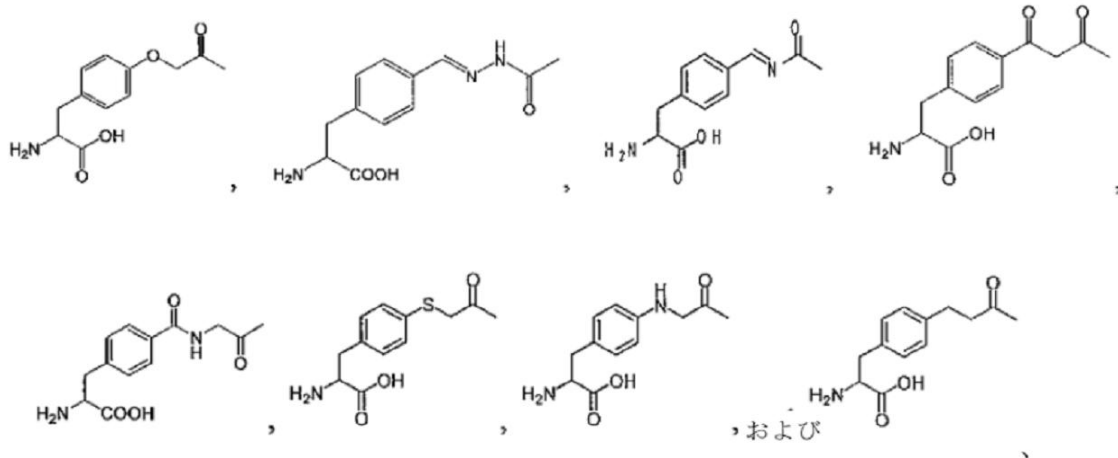
10

20

30

40

【化 1 2】



10

が含まれ、

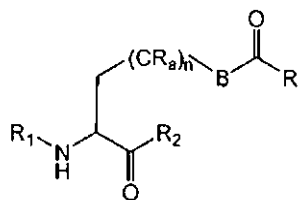
このような化合物は、任意選択で、アミノ保護基、カルボキシル保護基またはその塩である。さらに、いずれかの下記の非天然アミノ酸を非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

【0 2 3 8】

さらに、下記の式 (V I I) :

20

【化 1 3】



(V I I)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

30

式中、

Bは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S-$ 、 $-S-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S(O)_k-$ (k は1、2、または3)、 $-S(O)_k$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')CO-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ 、からなる群より選択されるリンカーで、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

40

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

50

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

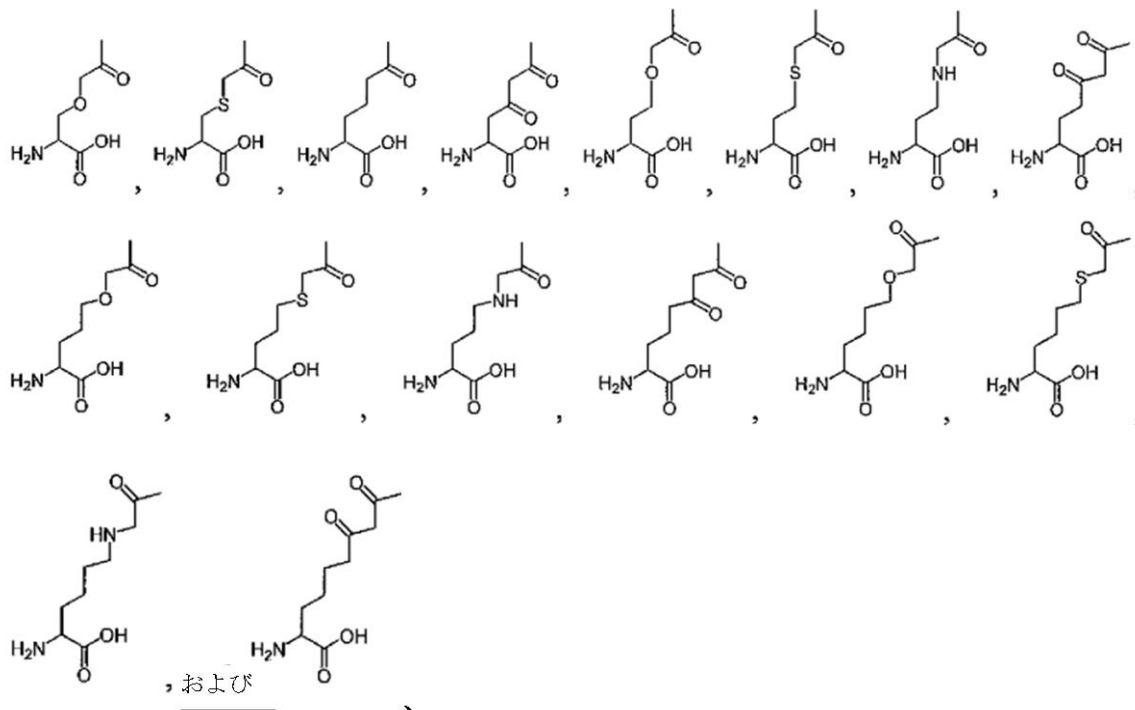
各 R_a は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は 1、2、または 3)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、および $-S(O)_k R'$ 、からなる群より独立に選択され、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；さらに n は 0～8 である；

但し、 A が、 $-(CH_2)_4-$ である場合は、 B は、 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ ではないものとする。

【0239】

さらに、下記のアミノ酸：

【化14】



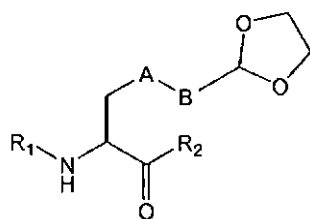
が含まれ、

このような化合物は、任意選択でアミノ保護された化合物、任意選択でカルボキシル保護された化合物、任意選択でアミノ保護およびカルボキシル保護された化合物またはそれらの塩である。さらに、これらの非天然アミノ酸およびいずれかの下記の非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸ポリペプチド中に組み込むことができる。

【0240】

さらに、下記の式 (VII)：

【化15】



(VII)、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中、

A は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シク

10

20

30

40

50

ロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Bは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、
 -O-、-O-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-S-、-S-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-S(O)_k-（kは1、2、または3）、-S(O)_k（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(O)-、-C(O)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(S)-、-C(S)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -N(R')-、-NR'-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-CSN(R')-、-CSN(R')-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-N(R')CO-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)_kN(R')-、
 -N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、および
 -C(R')₂-N(R')-N(R')-、からなる群より選択されるリンカーで、
 各R'は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

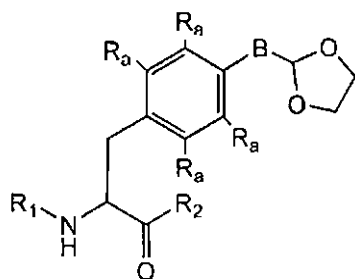
R₁は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R₂は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

【0241】

さらに、下記の式（IX）：

【化16】



（IX）、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

Bは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、
 -O-、-O-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-S-、-S-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-S(O)_k-（kは1、2、または3）、-S(O)_k（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -C(O)-、-C(O)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(S)-、-C(S)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -N(R')-、-NR'-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -CSN(R')-、-CSN(R')-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-N(R')CO-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、
 -N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、
 -N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、および
 -C(R')₂-N(R')-N(R')-、からなる群より選択されるリンカーで、
 各R'は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

$R' = N-N(R')-$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ 、からなる群より選択されるリンカーで、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

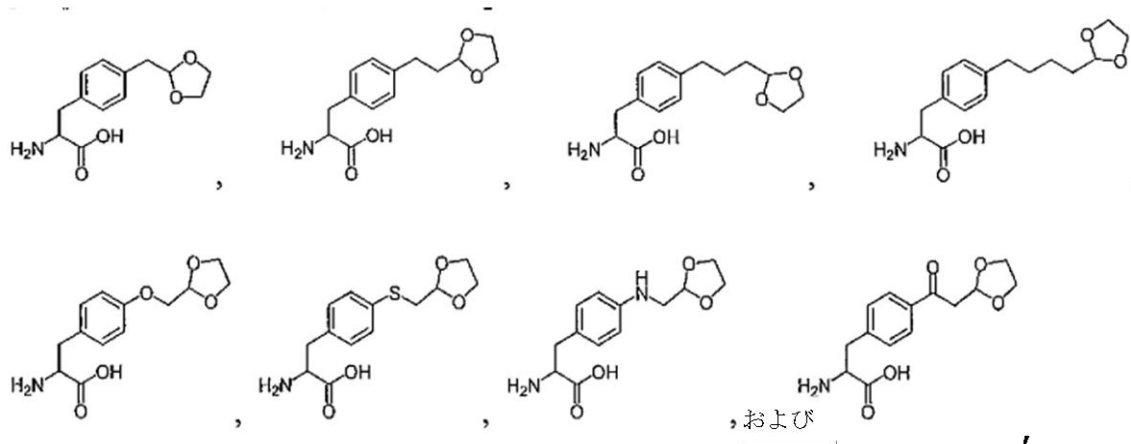
R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

各 R_a は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は1、2、または3)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、および $-S(O)_k R'$ 、からなる群より独立に選択され、各 R' は独立に、H、アルキル、または置換アルキルである。

【0242】

さらに、下記のアミノ酸：

【化17】



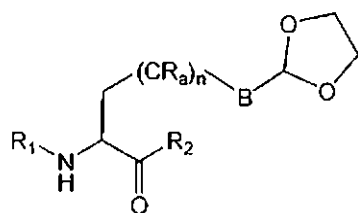
が含まれ、

このような化合物は、任意選択でアミノ保護された化合物、任意選択でカルボキシル保護された化合物、任意選択でアミノ保護およびカルボキシル保護された化合物、またはそれらの塩である。さらに、これらの非天然アミノ酸およびいずれかの下記の非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸ポリペプチド中に組み込むことができる。

【0243】

さらに、下記の式(X)：

【化18】



(X)、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中、

B は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S-$ 、 $-S-$ (アルキレンま

たは置換アルキレン) -、-S(O)_k- (kは1、2、または3)、-S(O)_k (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)-、-C(O)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(S)-、-C(S)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')-、-NR'- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-CSN(R')-、-CSN(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')CO- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、および-C(R')₂-N(R')-N(R')-、からなる群より選択されるリンカーで、各R'は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

10

RはH、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；
R1は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R2は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

各Ra、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、-N(R')₂、-C(O)_kR' (kは1、2、または3)、-C(O)N(R')₂、-OR'、および-S(O)_kR'、からなる群より独立に選択され、各R'は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；さらに

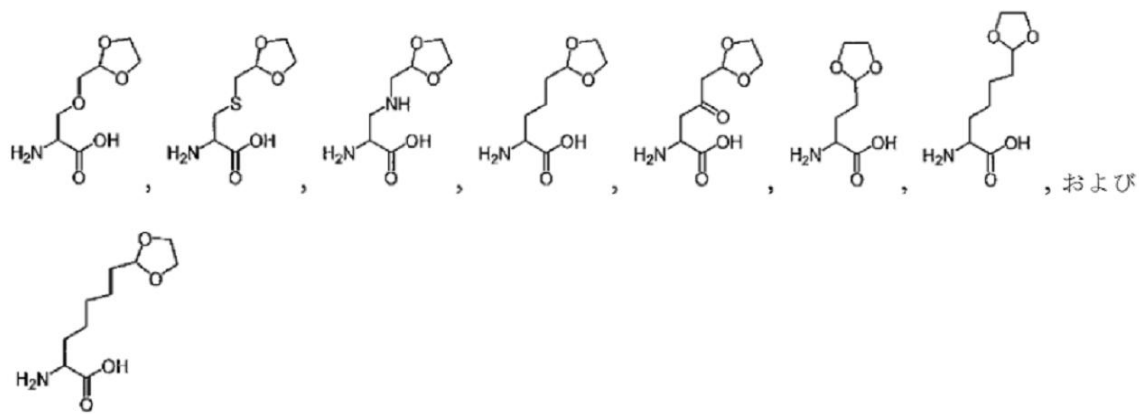
20

nは、0～8である。

【0244】

さらに、下記のアミノ酸：

【化19】



30

が含まれ、

このような化合物は、任意選択でアミノ保護された化合物、任意選択でカルボキシル保護された化合物、任意選択でアミノ保護およびカルボキシル保護された化合物、またはそれらの塩である。さらに、これらの天然アミノ酸およびいずれかの下記の非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸ポリペプチド中に組み込むことができる。

40

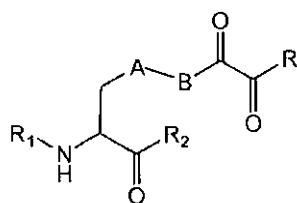
【0245】

モノカルボニル構造に加えて、本明細書記載の非天然アミノ酸は、ジカルボニル、ジカルボニル様、マスクジカルボニルおよび保護ジカルボニル基、等の基を含んでもよい。

【0246】

例えば、下記の式(XI)：

【化 2 0】



(X I)、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、
式中、

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Bは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、
—O—、O—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、—S—、S—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、—S（O）_k—（_kは1、2、または3）、—S（O）_k（アルキレンまたは置換アルキレン）—、C（O）—、C（O）—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、—C（S）—、C（S）—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、—N（R'）—、NR'—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、C（O）N（R'）—、CON（R'）—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、—CSN（R'）—、CSN（R'）—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、N（R'）CO—（アルキレンまたは置換アルキレン）—、N（R'）C（O）O—、S（O）_kN（R'）—、N（R'）C（O）N（R'）—、N（R'）C（S）N（R'）—、N（R'）S（O）_kN（R'）—、N（R'）—N=、—C（R'）=N—、—C（R'）=N—N（R'）—、—C（R'）=N—N=、C（R'）₂—N=N—、およびC（R'）₂N（R'）N（R'）—、
からなる群より選択されるリンカーで、各R'は独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

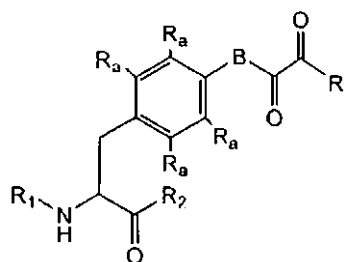
R₁は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R₂は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

【0 2 4 7】

さらに、下記の式（X I I）：

【化 2 1】



(X I I)、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

Bは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、
 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は1、2、または3）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および
 $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ 、からなる群より選択されるリンカーで、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルであり；

10

R はH、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；
 R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

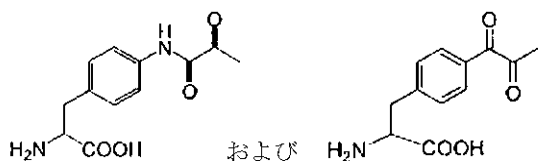
20

各 R_a は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_kR'$ （ k は1、2、または3）、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、および $-S(O)_kR'$ 、からなる群より独立に選択され、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルである。

【0248】

さらに、下記のアミノ酸：

【化22】



30

が含まれ、

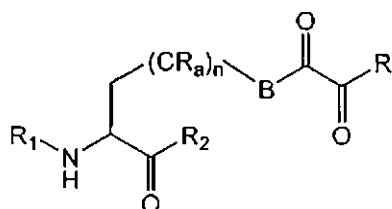
このような化合物は、任意選択でアミノ保護された化合物、任意選択でカルボキシル保護された化合物、任意選択でアミノ保護およびカルボキシル保護された化合物、またはそれらの塩である。さらに、これらの非天然アミノ酸およびいずれかの下記の下記の非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸ポリペプチド中に組み込むことができる。

【0249】

40

さらに、下記の式（XIII）：

【化23】



（XIII）

50

10

20

20

20

20

さらに、下記のアミノ酸：

30



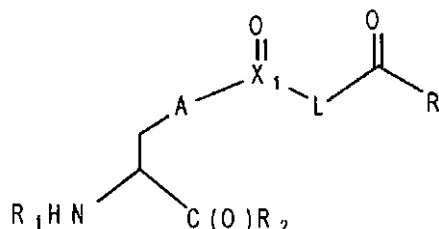
が含まれ、

このような化合物は、任意選択でアミノ保護された化合物、任意選択でカルボキシル保護された化合物、任意選択でアミノ保護およびカルボキシル保護された化合物、またはそれらの塩である。さらに、これらの非天然アミノ酸、およびいずれかの下記の非天然アミノ酸は、非天然アミノ酸ポリペプチド中に組み込むことができる。

【0251】

さらに、下記の式 (XIV) :

【化25】



(XIV);

の構造を有するアミノ酸が含まれ、
式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R1は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

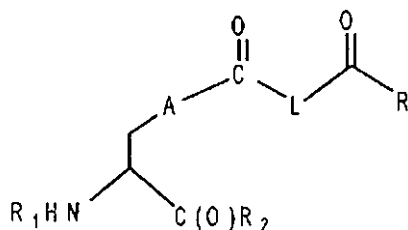
R2は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

X1は、C、S、またはS(O)であり；さらにLは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン) またはN(R') (置換アルキレン) であり、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0252】

さらに、下記の式 (XIV-A) :

【化26】



(XIV-A)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、
式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレ

ン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R 1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R 2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

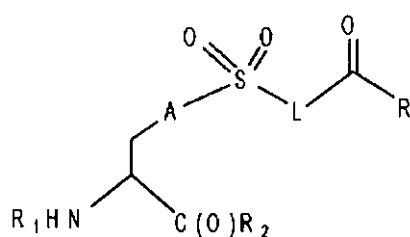
L は、アルキレン、置換アルキレン、N (R') (アルキレン) または N (R') (置換アルキレン) であり、R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

10

【0253】

さらに、下記の式 (XIV-B)：

【化27】



(XIV-B)

20

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

A は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

30

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R 1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

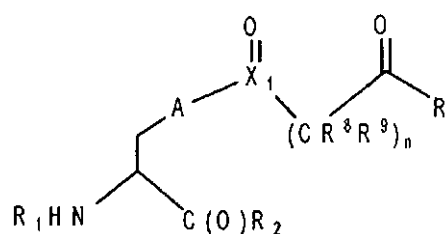
R 2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

L は、アルキレン、置換アルキレン、N (R') (アルキレン) または N (R') (置換アルキレン) であり、R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0254】

さらに、下記の式 (XV)：

【化28】



(XV)；

50

【化 2 9】

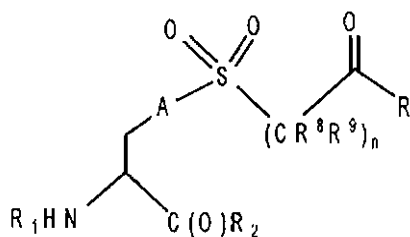


50

【0256】

さらに、下記の式 (XV-B) :

【化30】



(XV-B)

10

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

20

R₁は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R₂は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

nは、0、1、2、3、4、または5であり；

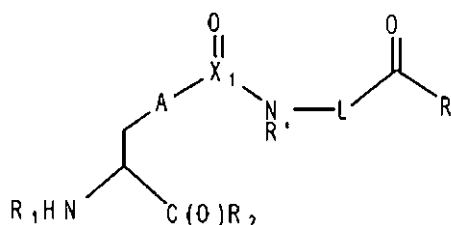
各CR⁸R⁹基のそれぞれのR⁸およびR⁹は、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アリール、からなる群より独立に選択され、またはR⁸およびR⁹のいずれかは、一緒に=Oもしくはシクロアルキルを形成でき、またはR⁸基に隣接するいずれかは、一緒にシクロアルキルを形成できる。

30

【0257】

さらに、式 (XVI) :

【化31】



(XVI) ;

40

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり

50

;

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

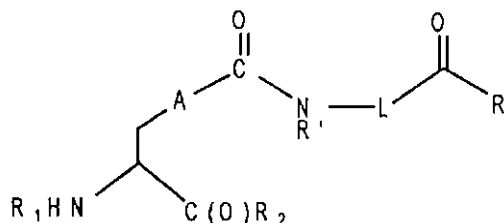
X_1 は、C、S、またはS(O)であり；Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン) またはN(R') (置換アルキレン)であり、 R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0258】

さらに、下記の式(XVI-A)：

10

【化32】



(XVI-A)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

20

式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

30

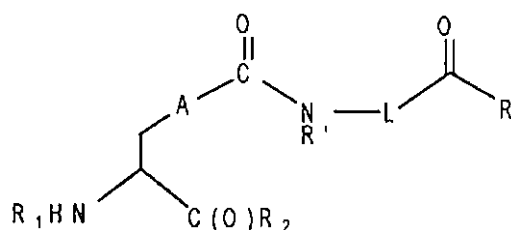
R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン) またはN(R') (置換アルキレン)であり、 R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0259】

さらに、下記の式(XVI-B)：

【化33】



(XVI-B)

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

Aは任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シク

50

ロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキル；

R₁ は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

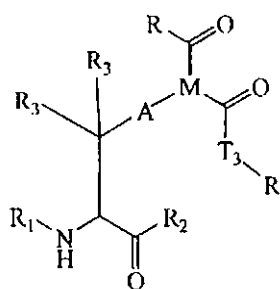
R₂ は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

L は、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン) または N(R') (置換アルキレン) であり、R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0260】

さらに、式 (XVII)：

【化34】



(XVII)、

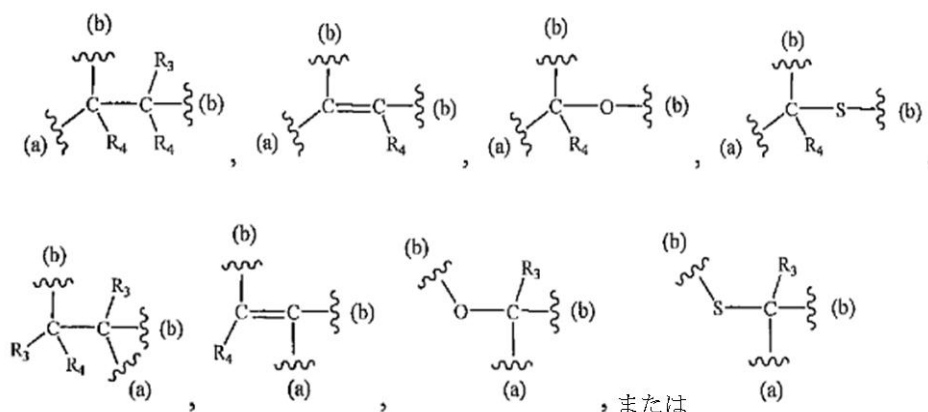
の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

A は任意選択であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

M は、 $-C(R_3)-$ 、

【化35】



であり、

(a) は、A 基への結合を示し、(b) は、それぞれのカルボニル基への結合を示し、 R_3 および R_4 は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキル、から独立に選択され、または R_3 および R_4 または 2 つの R_3 基または 2 つの R_4 基は、任意選択で、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成し；
R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

T_3 は、結合の C (R) (R)、O、または S であり、R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

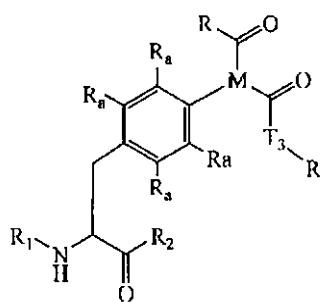
R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

【0261】

さらに、式 (XVII)：

【化36】



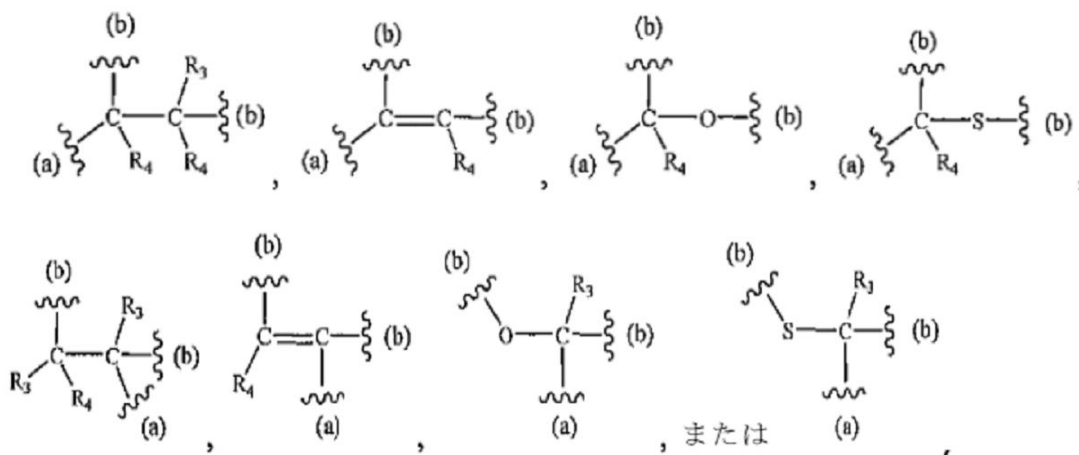
(XVII)、

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

M は、 $-C(R_3)-$ 、

【化37】



であり、

(a) は、A 基への結合を示し、(b) は、それぞれのカルボニル基への結合を示し、 R_3 および R_4 は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキル、から独立に選択され、または R_3 および R_4 または 2 つの R_3 基または 2 つの R_4 基は、任意選択で、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成し；
R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

T_3 は、結合の C (R) (R)、O、または S であり、R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R_1 は任意選択であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；さらに

R_2 は任意選択であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

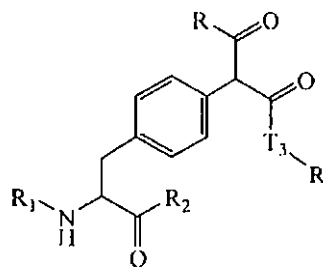
各 R_a は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は 1、2、または 3)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、および $-S(O)_k R'$ 、からなる群より独立に選択され、各 R' は、独立に、H、アルキル、または置換アルキルである。

10

【0262】

さらに、式 (XIX)：

【化38】



(XIX)

20

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

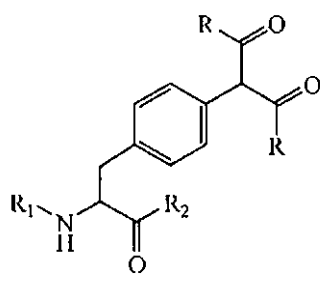
式中：

R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり； T_3 は、O、または S である。

【0263】

さらに、式 (XX)：

【化39】



(XX)

30

の構造を有するアミノ酸が含まれ、

式中：

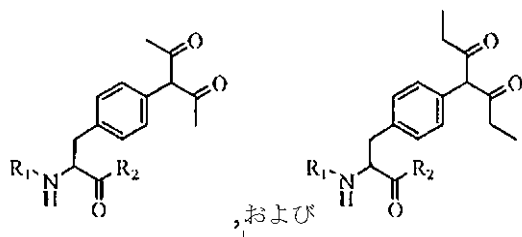
R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

40

【0264】

さらに、下記の式 (XXI)：

【化 40】



の構造を有するアミノ酸が含まれる。

10

【0265】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸を含むポリペプチドは、化学的に修飾されて反応性カルボニルまたはジカルボニル官能基を生成する。例えば、コンジュゲーションに有用なアルデヒド官能性は、隣接アミノおよびヒドロキシル基を有する官能性から生成できる。例えば、生物学的に活性な分子がポリペプチドである場合には、N末端セリンまたはトレオニン（普通に存在しても、化学または酵素消化により露出されてもよい）は、軽度の酸化的切断条件下で、過ヨウ素酸塩を使ってアルデヒド官能性を生成するために使用できる。例えば、Gaertner, et al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994)、を参照されたい。しかし、当技術分野で既知の方法は、ペプチドまたはタンパク質のN末端にあるアミノ酸に限定される。

20

【0266】

本発明では、隣接ヒドロキシルおよびアミノ基を有する非天然アミノ酸は、「マスクされた」アルデヒド官能性としてポリペプチド中へ組み込むことができる。例えば、5-ヒドロキシリシンは、ε-アミンに隣接したヒドロキシル基を有する。アルデヒドを生成する反応条件は、通常、軽度の条件下のナトリウムメタ過ヨウ素酸のモル過剰を添加し、ポリペプチド内の他の部位での酸化を避けることを含む。酸化反応のpHは、通常、約7.0である。典型的反応は、ポリペプチド緩衝溶液に、ナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の約1.5モルの過剰添加と、続けて、暗所での約10分間のインキュベーションを含む。例えば、米国特許第6,423,685号を参照されたい。

30

【0267】

カルボニルまたはジカルボニル官能性は、ヒドロキシルアミン含有試薬と水溶液中、軽度の条件下で選択的に反応して、対応する生理学的条件で安定なオキシム結合を形成できる。例えば、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)を参照されたい。さらに、カルボニルまたはジカルボニル基の特有の反応性が、他のアミノ酸側鎖の存在下、選択的改変を可能とする。例えば、Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276: 1125-1128 (1997)を参照されたい。

40

【0268】

非天然アミノ酸の構造および合成：ヒドロキシルアミン含有アミノ酸

米国特許出願第11/316,534号（米国特許公開第20060189529号）は、参照によってその全体が組み込まれる。従って、米国特許出願第11/316,534号（米国特許公開第20060189529号）中のセクションV（タイトルは「非天然アミノ酸」）、パートB（タイトルは「非天然アミノ酸の構造および合成：ヒドロキシ

50

ルアミン含有アミノ酸」) で提供されている本開示は、あたかもこのような開示が本明細書中に完全に存在する場合と同程度に、本明細書記載の非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチドおよび改変非天然アミノ酸ポリペプチドの製作、精製、特徴付け、および使用のための方法、組成物(式I~XXXVを含む)、技術および戦略に完全に適用できる。米国特許公開第2006/0194256号、同2006/0217532号、および同2006/0217289号ならびに「非天然アミノ酸およびポリペプチドを含む組成物、それに関連する方法、およびその使用(Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides)」のタイトルの国際公開第2006/069246号は、また、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0269】

非天然アミノ酸の化学合成

本発明での使用に適する非天然アミノ酸の多くは、例えば、Sigma(USA)またはAldrich(Milwaukee, WI, USA)から市販されている。市販されていないものは、任意選択で、本明細書で提供されているように、または種々の出版物で提供されているように、または当業者には既知の標準的な方法を使って、合成される。有機合成技術に関しては、例えば、有機化学(Organic Chemistry): Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); 最新有機化学(Advanced Organic Chemistry): March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); および最新有機化学(Advanced Organic Chemistry): Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)を参照されたい。非天然アミノ酸の合成について記載している追加の出版物には、例えば、「非天然アミノ酸のインビボ組み込み(In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids)」のタイトルの国際公開第2002/085923号; Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F. E. & Kidd, D. A. A. (1949)、フチル化中間体からのグルタミンおよびグルタミン酸のγ-ジペプチドの新規合成(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)、抗腫瘍薬用モデル基質としてのグルタミン誘導体の合成(Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents). J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J. C. et al. (1988)、7-クロロ-4-[4-(ジエチルアミノ)-1-メチルブチル]アミノ]キノリン(クロロキン)の鏡像異性体の絶対配置(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)、潜在的抗マラリア薬としてのグルタミン類似体(Glutamine analogues as Potential Antimalarials), Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. & Rapoport, H. (1989)、立体配置的に拘束されたアミノ酸類似体としての4-置換プロリンの合成(Synthesis of 4-Substituted Prolines as Confor

20

30

40

50

mationally Constrained Amino Acid Analogues). J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B. D. & Rapoport, H. (1985) L-アスパラギンからの光学的に純粋なピペコラートの合成. アミノ酸脱カルボニルおよびイミニウムイオン環化による (+) -アポビンカミンの全合成への適用 (Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+) -Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization). J. Org. Chem. 50: 1239-1246; Barton et al., (1987)、ラジカル化学を使った新規アルファアミノ酸および誘導体の合成: L-およびD-アルファアミノアジピン酸、L- α -アミノピメリン酸および適した不飽和誘導体の合成 (Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives). Tetrahedron 43: 4297-4308; および、Subasinghe et al., (1992) キスカル酸類似体: ベータヘテロ環式2-アミノプロピオン酸誘導体の合成およびその新規キスクアラート感作部位での活性 (Quisqualic acid analogue: synthesis of beta-heterocyclic 2-amino propanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site). J. Med. Chem. 35: 4602-7、が含まれる。また、「タンパク質アレイ (Protein Arrays)」のタイトルの米国特許公開第2004/0198637号を参照されたい。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0270】

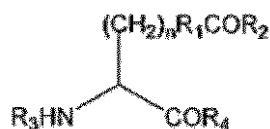
A. カルボニル反応基

カルボニル反応基を有するアミノ酸は、特に、求核付加またはアルドール縮合反応を介して、分子（限定されないが、PEGまたは他の水溶性分子を含む）に連結するための種々の反応を可能とする。

【0271】

代表的なカルボニル含有アミノ酸は、以下のように表すことができる：

【化41】



式中、

nは、0～10であり；R₁は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり；R₂は、H、アルキル、アリール、置換アルキル、および置換アリールであり；R₃は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、さらにR₄は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。一部の実施形態では、nは1であり、R₁はフェニルであり、R₂は、単純アルキル（すなわち、メチル、エチル、またはプロピル）であり、ケトン成分は、アルキル側鎖に対してパラ位置に配置される。一部の実施形態では、nは1であり、R₁は、フェニルであり、R₂は、単純アルキル（すなわち、メチル、エチル、またはプロピル）であり、さらにケトン成分は、ケトン成分は、アルキル側鎖に対してメタ位置に配置される。

【0272】

p-アセチル- (+/-) -フェニルアラニンおよびm-アセチル- (+/-) -フェ

ニルアラニンの合成については、Zhang, Z., et al., Biochemistry 42:6735-6746 (2003)に記載されている。この文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。他のカルボニル含有アミノ酸は、当業者なら同様に調製できる。

【0273】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸を含むポリペプチドは、化学的に改変されて反応性カルボニル官能基を生成する。例えば、コンジュゲーションに有用なアルデヒド官能性は、隣接アミノおよびヒドロキシル基を有する官能性から生成できる。例えば、生物学的に活性な分子がポリペプチドの場合は、N末端セリンまたはトレオニン（普通に存在しても、化学または酵素消化により露出されてもよい）は、軽度の酸化的切断条件下で過ヨウ素酸塩を使ってアルデヒド官能性を生成するために使用できる。例えば、Gaertner, et al., Bioconjug. Chem. 3:262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem., 269:7224-7230 (1994)、を参照されたい。しかし、当技術分野で既知の方法は、ペプチドまたはタンパク質のN末端にあるアミノ酸に限定される。

10

【0274】

本発明では、隣接ヒドロキシルおよびアミノ基を有する天然ではコードされないアミノ酸は、「マスクされた」アルデヒド官能性としてポリペプチド中に組み込むことができる。例えば、5-ヒドロキシリシンは、 ϵ -アミンに隣接するヒドロキシル基を有する。アルデヒドを生成する反応条件は、通常、ポリペプチド内の他の部位での酸化を避けるために、軽度の条件下、モル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムの添加を含む。酸化反応のpHは、通常、約7.0である。典型的な反応は、約1.5モル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムのポリペプチド緩衝溶液への添加と、それに続く、暗所での約10分間のインキュベーションを含む。例えば、米国特許第6,423,685号を参照のこと。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0275】

カルボニル官能性は、水溶液中で、軽度の条件下、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはセミカルバジド含有試薬と、選択的に反応して、それぞれ、対応する生理学的条件で安定なヒドラゾン、オキシム、またはセミカルバゾン結合を形成できる。例えば、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)を参照されたい。さらに、カルボニル基特有の反応性により、他のアミノ酸側鎖の存在下で選択的改変が可能となる。例えば、Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)を参照されたい。

30

40

【0276】

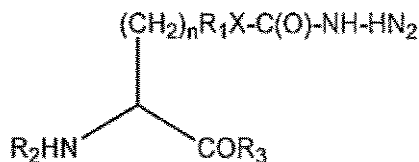
B. ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド反応基

求核基、例えば、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジドを含む天然ではコードされないアミノ酸は、種々の求電子基（限定されないが、PEGまたは他の水溶性ポリマー等）と反応して、コンジュゲートを形成することを可能とする。

【0277】

代表的ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド含有アミノ酸は、下記のように表すことができる：

【化 4 2】



式中、

n は、0～10であり； R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、もしくは置換アリールであるか、または存在せず； X は、O、N、もしくはSであるか、または存在せず； R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、さらに R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

10

【0278】

一部の実施形態では、 n は4であり、 R_1 は存在せず、 X はNである。一部の実施形態では、 n は2であり、 R_1 は存在せず、さらに X は存在しない。一部の実施形態では、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 X はOであり、さらに酸素原子は、アリール環上の脂肪族基に対し、パラ位置に配置される。

【0279】

ヒドラジド、ヒドラジン、およびセミカルバジド含有アミノ酸は、市販メーカーから入手可能である。例えば、L-グルタメート- γ -ヒドラジドは、Sigma Chemical (St. Louis, MO) から入手可能である。市販されていない他のアミノ酸は、当業者なら調製可能である。例えば、米国特許第6,281,211号参照のこと。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0280】

ヒドラジド、ヒドラジンまたはセミカルバジド官能性を有する天然ではコードされないアミノ酸を含むポリペプチドは、アルデヒドまたは他の類似の化学反応性を有する官能基を含む種々の分子と効率的かつ選択的に反応できる。例えば、Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)を参照されたい。ヒドラジド、ヒドラジンおよびセミカルバジド官能基の特有の反応性により、20共通アミノ酸に存在する求核基（限定されないが、セリンもしくはトレオニンのヒドロキシル基、またはリシンもしくはN末端のアミノ基を含む）に比べて、アルデヒド、ケトンおよび他の求電子基に対し非常に反応しやすくなる。

30

【0281】

C. アミノオキシ含有アミノ酸

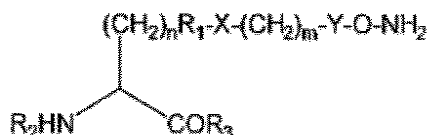
アミノオキシ（ヒドロキシルアミンとも呼ばれる）基を含む天然ではコードされないアミノ酸は、種々の求電子基（限定されないが、PEGまたは他の水溶性ポリマー等）と反応してコンジュゲートの形成を可能とする。ヒドラジン、ヒドラジドおよびセミカルバジドのように、アミノオキシ基の強化された求核性により、アルデヒドまたは類似の化学反応性を有する他の官能基を含む種々の分子と効率的かつ選択的に反応することが可能となる。例えば、Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)；H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001)を参照されたい。ヒドラジン基との反応の結果は、対応するヒドラゾンであるのに対して、オキシムは、一般的に、アミノオキシ基とカルボニル含有基、例えば、ケトンとの反応により得られる。

40

【0282】

アミノオキシ基を含む代表的アミノ酸は、以下のように表すことができる：

【化 4 3】



式中、

n は0～10であり； R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであるか、または存在せず； X は、O、N、Sであるか、または存在せず； m は0～10であり； $\text{Y}=\text{C}(\text{O})$ であるか、または存在せず； R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。一部の実施形態では、 n は1であり、 R_1 は、フェニルであり、 X は、Oであり、 m は1であり、さらに Y は、存在する。一部の実施形態では、 n は2であり、 R_1 および X は存在せず、 m は0であり、さらに Y は存在しない。

10

【0283】

アミノオキシ含有アミノ酸は、容易に入手可能なアミノ酸前駆物質（ホモセリン、セリンおよびトレオニン）から調製できる。例えば、M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853–8858 (2003)を参照されたい。特定のアミノオキシ含有アミノ酸、例えば、L-2-アミノ-4-(アミノオキシ)酪酸は、天然ソースから単離された(Rosenthal, G., Life Sci, 60: 1635–1641 (1997))。他のアミノオキシ含有アミノ酸は、当業者により調製可能である。

20

【0284】

D. アジドおよびアルキン反応基

アジドおよびアルキン官能基の特有の反応性により、これら官能基がポリペプチドおよび他の生物学的分子の選択的改変にとって非常に有用になる。一般的に、有機アジド、特に脂肪族アジド、およびアルキンは、通常の化学的反応条件に対し安定である。特に、アジドおよびアルキン官能基の両方は、天然ポリペプチドに認められる20共通アミノ酸の側鎖（すなわち、 R 基）に対し不活性である。しかし、近接近すると、アジドおよびアルキン基の「バネ荷重」の性質が現れ、それらは、選択的かつ効率的に反応し、Huisgen [3+2]付加環化反応により、対応するトリアゾールを生成する。例えば、Chin, J., et al, Science 301: 964–7 (2003)；Wang, Q., et al, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192–3193 (2003)；Chin, J. W., et al, J. Am. Chem. Soc. 124: 9026–9027 (2002)、を参照されたい。

30

【0285】

Huisgen付加環化反応は、求核置換よりは、選択的付加環化反応（例えば、Padwa, A., 総合有機合成(Comprehensive Organic Synthesis)、Vol. 4、(ed. Trost, B. M., 1991)、p. 1069–1109；Huisgen, R., 1,3-双極性付加環化化学(1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry)、(ed. Padwa, A., 1984)、p. 1–176)を伴うので、アジドおよびアルキン含有側鎖を有する天然ではコードされないアミノ酸の組込みは、生成されたポリペプチドを天然ではコードされないアミノ酸の位置で選択的に改変することを可能にする。アジドまたはアルキン含有レラキシソポリペプチドを含む付加環化反応は、室温で水性の条件下、 $\text{Cu}(\text{II})$ を $\text{Cu}(\text{I})$ に還元する触媒量の還元剤の存在下、 $\text{Cu}(\text{II})$ （限定されないが、触媒量の CuSO_4 の形を含む）のインサイツ添加により行うことができる。例えば、Wang, Q., et al, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192–3193 (2003)；Tornøe, C. W., et al, J. Org. Chem. 67: 3057–3064 (2002)；Rostovtsev, et al., Angew. Chem.

40

50

Int. Ed. 41: 2596-2599 (2002) を参照されたい。代表的還元剤には、限定されないが、アスコルビン酸塩、金属銅、キニーネ、ヒドロキノン、ビタミンK、グルタチオン、システイン、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、および印加電圧が含まれる。

【0286】

一部の例では、アジドおよびアルキン間のHuisgen [3+2] 付加環化反応が所望の場合は、レラキシシポリペプチドは、アルキン成分を含む天然ではコードされないアミノ酸を含み、さらに、アミノ酸に結合される水溶性ポリマーはアジド成分を含む。あるいは、逆の反応（すなわち、アミノ酸上のアジド成分および水溶性ポリマー上に存在するアルキン成分の反応）も、また、行うことができる。

【0287】

10

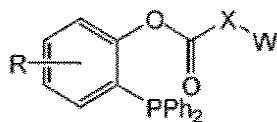
アジド官能基は、また、アリールエステル含有水溶性ポリマーと選択的に反応させ、アリールホスフィン成分で適切に官能性を持たせて、アミド結合を生成させることができる。アリールホスフィン基は、アジドをインサイツ還元し、得られたアミンは、効率的に近くのエステル結合と反応し、対応するアミドを生成する。例えば、E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000) を参照されたい。アジド含有アミノ酸は、アルキルアジド（限定されないが、2-アミノ-6-アジド-1-ヘキサン酸を含む）であっても、アリールアジド（p-アジドフェニルアラニン）であってもよい。

【0288】

アリールエステルおよびホスフィン成分を含む代表的な水溶性ポリマーは、以下のように表すことができる：

20

【化44】



式中、

Xは、O、N、Sまたは存在しなくてもよく、Phはフェニル、Wは水溶性ポリマーであり、Rは、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリール基であってもよい。代表的R基には、限定されないが、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ および $-\text{NO}_2$ が含まれる。R'、R''、R' " および R " " は、それぞれ独立に、水素、置換または未置換ヘテロアルキル、1~3ハロゲン置換アリールを含む置換または未置換アリール、置換または未置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。例えば、本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合は、それぞれのR基は、独立に、2つ以上のR'、R''、R' " および R " " 基が存在する場合の、それぞれ、R'、R''、R' " および R " " 基であるとして選択される。R' および R " が同じ窒素原子に結合される場合は、それらは窒素原子と組み合わせられて、5、6、または7員環を形成する。例えば、 $-\text{NR}'\text{R}''$ は、限定されないが、1-ピロリジニルおよび4-モルフォリニルを含むことを意味する。置換基の上記考察から、当業者なら、用語の「アルキル」は、水素基以外の基、例えば、ハロアルキル（限定されないが、 $-\text{CF}_3$ および CH_2CF_3 を含む）およびアシル（限定されないが、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、等を含む）に結合した炭素原子を含む基を包含することが意図されていることを理解するであろう。

30

40

【0289】

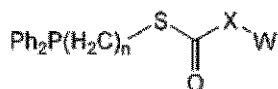
アジド官能基は、また、チオエステル含有水溶性ポリマーと選択的に反応し、アリールホスフィン成分により適切に官能化され、アミド結合を生成することができる。アリールホスフィン基は、アジドをインサイツ還元し、得られたアミンは、チオエステル結合と効率的に反応し、対応するアミドを生成できる。

【0290】

50

チオエステルおよびホスフィン成分を含む代表的な水溶性ポリマーは、下記のように表すことができる：

【化 4 5】



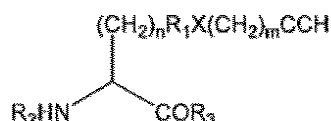
式中、

n は、1～10であり； X は、O、N、Sであっても、または存在しなくてもよく、 Ph はフェニルであり、 W は水溶性ポリマーである。

【0291】

代表的アルキン含有アミノ酸は、下記のように表すことができる：

【化 4 6】



式中、

n は、0～10であり； R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであるか、または存在せず； X は、O、N、Sであるか、または存在せず； m は、0～10であり、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基、および R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。一部の実施形態では、 n は1、 R_1 はフェニル、 X は存在せず、 m は0であり、さらにアセチレン成分は、アルキル側鎖に対しパラ位置に配置される。一部の実施形態では、 n は1、 R_1 はフェニル、 X はO、 m は1であり、さらに、プロパルギルオキシ基は、アルキル側鎖（すなわち、 O -プロパルギルチロシン）に対しパラ位置に配置される。一部の実施形態では、 n は1、 R_1 および X は存在せず、さらに、 m は0（すなわち、プロパルギルグリシン）である。

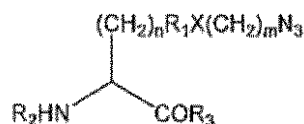
【0292】

アルキン含有アミノ酸は、市販されている。例えば、プロパルギルグリシンは、Peptech (Burlington, MA) から市販されている。あるいは、アルキン含有アミノ酸は、標準的方法により調製できる。例えば、 p -プロパルギルオキシフェニルアラニンは、例えば、Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783 (2003)、に記載のように合成でき、4-アルキル-L-フェニルアラニンは、Kayser, B., et al., Tetrahedron 53 (7):2475-2484 (1997)、に記載のように合成できる。他のアルキン含有アミノ酸は、当業者なら調製できる。

【0293】

代表的アジド含有アミノ酸は、下記のように表すことができる：

【化 4 7】



式中、

n は、0～10であり； R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、または存在せず； X は、O、N、Sであるか、または存在せず； m は、0～10であり； R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、さらに R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。一部の実施形態では、 n は1、 R_1 はフェニル、 X は存在せず、 m は0であり、さらに、アジド成分は、アルキル側鎖に対しパラ位置に配置される。一部の実施形態では、 n は、0～4であり

10

20

30

40

50

、 R_1 および X は、存在せず、さらに $m=0$ である。一部の実施形態では、 n は 1、 R_1 はフェニル、 X は O 、 m は 2 であり、さらに、(β -アジドエトキシ成分は、アルキル側鎖に対してパラ位置に配置される。

【0294】

アジド含有アミノ酸は、市販ソースから入手可能である。例えば、4-アジドフェニルアラニンは、Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL) から入手可能である。市販されていないアジド含有アミノ酸に対しては、アジド基は、適切な脱離基（限定されないが、ハロゲン化物、メシラート、トシラート）の変位、または適切に保護されたラク톤の開口、等の当業者に既知の標準的方法を使って比較的容易に調製可能である。例えば、March による先進有機化学 (Advanced Organic Chemistry) (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)、を参照されたい。

10

【0295】

E. アミノチオール反応基

ベータ置換アミノチオール官能基の特有の反応性のために、チアゾリジンの形成を介したアルデヒド基含有ポリペプチドおよび他の生物学的分子の選択的改変にとって、それらの基が非常に有益なものになっている。例えば、J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899、を参照されたい。一部の実施形態では、ベータ置換アミノチオールアミノ酸は、レラキシンポリペプチドに組み込まれ、その後、アルデヒド官能性を含む水溶性ポリマーと反応できる。一部の実施形態では、水溶性ポリマー、薬剤コンジュゲートまたは他の薬剤は、チアゾリジンの形成を介してベータ置換アミノチオールアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドと結合できる。

20

【0296】

F. 追加の反応基

限定されないが、パラアミノフェニルアラニンを含む本発明のレラキシンポリペプチドに組み込み可能な追加の反応基および天然ではコードされないアミノ酸は、下記の特許出願（これらは、全て参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている：米国特許公開第 2006/0194256 号、同 2006/0217532 号、同 2006/0217289 号、同 60/755, 338 号；米国特許仮出願第 60/755, 711 号；同 60/755, 018 号；国際出願第 PCT/US06/49397 号；国際公開第 2006/069246 号；米国特許仮出願第 60/743, 041 号；米国特許仮出願第 60/743, 040 号；国際公開第 PCT/US06/47822 号；米国特許仮出願第 60/882, 819 号；米国特許仮出願第 60/882, 500 号；および米国特許仮出願第 60/870, 594 号。これらの出願は、また、限定されないが、コンジュゲーション用のヒドロキシルアミン（アミノオキシ）基を含む PEG また他のポリマー上に存在してもよい反応基についても考察している。

30

【0297】

細胞による非天然アミノ酸の取込

非天然アミノ酸の細胞取込は、非天然アミノ酸を設計・選択する場合に、限定されないが、タンパク質中への組込み、等のために通常考慮されるべき 1 つの課題である。例えば、 α -アミノ酸の高電荷密度は、これらの化合物が細胞浸透性でありそうもないことを示唆している。天然アミノ酸は、タンパク質ベース輸送系の一群を介して真核細胞中に取り込まれる。どの非天然アミノ酸（もしあれば）を細胞に取り込むべきかの迅速選別を行うことができる。例えば、「タンパク質アレイ (Protein Arrays)」のタイトルの米国特許公開第 2004/0198637 号（参照によって本明細書に組み込まれる）；および Liu, D. R. & Schultz, P. G. (1999)、拡張遺伝コードを有する生物の進化に向けた進展 (Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code). PNAS United States 96:4780

40

50

ー4785、中の毒性アッセイを参照されたい。取込は、種々のアッセイにより分析されるが、細胞取込経路に受け入れられる非天然アミノ酸の設計に対する選択肢は、アミノ酸をインビボで生成する生合成経路を提供することである。

【0298】

非天然アミノ酸の生合成

多くの生合成経路は、アミノ酸および他の化合物生成のために、細胞中に既に存在する。特定の非天然アミノ酸のための生合成方法は、限定されないが細胞中を含む天然には存在しない可能性があるが、本発明は、このような方法を提供する。例えば、非天然アミノ酸用生合成経路は、任意選択で、新規酵素の添加または既存宿主細胞経路を変えることにより、宿主細胞中で生成される。追加の新規酵素は、任意選択で、天然酵素または人工的に創出した酵素であってもよい。例えば、p-アミノフェニルアラニンの生合成は（「非天然アミノ酸のインビボ組み込み（*In vivo incorporation of unnatural amino acids*）」のタイトルの国際公開第2002/085923号中の実施例で示されるように）、他の生物由来の既知の酵素の組み合わせの添加に依存している。これらの酵素の遺伝子は、遺伝子含有プラスミドによる細胞の形質転換により真核生物中に導入できる。細胞中で発現した場合、遺伝子は、所望の化合物を合成する酵素経路を提供する。任意選択で添加してもよい酵素の型の例は、下記の例で提供される。追加の酵素配列は、例えば、ジェンバンク中に見出すことができる。人工的創出酵素も、また、任意選択で、同様に細胞中に添加してもよい。この方法では、細胞機構および細胞資源は、操作されて非天然アミノ酸を産生する。

【0299】

生合成経路または既存経路の進化に使用するための新規酵素産生用として種々の方法が利用可能である。例えば、限定されないが、Maxygen, Inc. (World Wide Webのmaxygen.comから利用可能)により開発されたような再帰的組換えが、任意選択で、新規酵素および経路を開発するために使用可能である。例えば、Stemmer (1994)、タンパク質のDNAシャフリングによる急速インビトロ進化 (Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling)、Nature 370 (4): 389-391; および、Stemmer、(1994)、ランダム断片化および再構築によるDNAシャフリング: 分子進化のためのインビトロ組換え (DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、91: 10747-10751、を参照されたい。同様に、Genencor (World Wide Webのgenencor.comから利用可能)により開発されたDesignPath (登録商標)は、限定されないが、細胞中のO-メチル-L-チロシンを生成するための経路操作を含む代謝経路操作に使用される。この技術は、限定されないが、機能ゲノミクス、ならびに分子進化および設計により特定されるものを含む新規遺伝子の組み合わせを使って、宿主生物中の既存経路を再構築する。Diversa Corporation (World Wide Webのdiversa.comから利用できる)は、また、限定されないが、新規経路を生成用の急速遺伝子選別ライブラリーおよび遺伝子経路のための技術を提供する。

【0300】

典型的には、本発明の操作生合成経路を使って産生された非天然アミノ酸は、限定されないが、天然細胞量であるが、他のアミノ酸の濃度に影響しない、または細胞資源を消耗しない程度の効率的タンパク質生合成に十分な濃度で産生される。この方式でインビボで産生される典型定期的な濃度は、約10mM~約0.05mMである。特異的経路に対し望ましい酵素を産生するために使用される遺伝子を含むプラスミドを使って細胞が形質転換され、非天然アミノ酸が生成されるとすぐに、任意選択でインビボ選択を使ってリボソームでのタンパク質合成および細胞増殖の両方用の非天然アミノ酸の産生がさらに最適化さ

れる。

【0301】

非天然アミノ酸を有するポリペプチド

非天然アミノ酸の組み込みは、種々の目的のために行うことができ、これには、限定されないが、タンパク質構造および／または機能を目的に合わせて変更すること、サイズ、酸性度、求核性、水素結合、疎水性、プロテアーゼ標的部位のアクセシビリティ、成分の標的化（限定されないが、タンパク質アレイのため、を含む）、生物学的に活性な分子の付加、ポリマーの結合、放射性核種の結合、血清半減期の調節、組織浸透の調節（例えば、腫瘍）、活性輸送の調節、組織の調節、細胞もしくは器官特異性または分布、免疫原性の調節、プロテアーゼ抵抗性の調節、等を変更すること、が含まれる。非天然アミノ酸を含むタンパク質は、強化された、またはさらに完全に新規触媒的または生理学的特性を持つことができる。例えば、非天然アミノ酸のタンパク質中への包含により以下の特性が任意選択で変更される：毒性、体内分布、構造特性、分光学的特性、化学および／または光化学的特性、触媒能力、半減期（限定されないが、血清半減期を含む）、限定されないが、共有結合または非共有結合で他の分子と反応する能力、等。少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むタンパク質を含む組成物は、限定されないが、新規治療薬、診断薬、触媒的酵素、産業用酵素、結合タンパク質（限定されないが、抗体を含む）、および限定されないが、タンパク質構造および機能の研究、に有用である。例えば、Dougherty、（2000）、タンパク質構造および機能のプロープとしての非天然アミノ酸（Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function）、Current Opinion in Chemical Biology、4：645－652、を参照されたい。

【0302】

本発明の一態様では、組成物は、少なくとも1つの、限定されないが、少なくとも2つの、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、少なくとも7つの、少なくとも8つの、少なくとも9つの、または少なくとも10以上の非天然アミノ酸を有する少なくとも1つのタンパク質を含む。非天然アミノ酸は、同じでも、異なってもよく、限定されないが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質中に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上の異なる部位があってもよい。別の態様では、組成物は、タンパク質中に存在する少なくとも1つの、しかし全部よりは少ない特定のアミノ酸を有するタンパク質を含む組成物が、非天然アミノ酸で置換される。2つ以上の非天然アミノ酸を有する所与のタンパク質に対し、非天然アミノ酸は、同じでも異なってもよい（限定されないが、タンパク質は、2つ以上の異なる型の非天然アミノ酸、または2つの同じ非天然アミノ酸を含んでもよい）。3つ以上の非天然アミノ酸を有する所与のタンパク質に対し、非天然アミノ酸は、同じであっても、異なっても、または少なくとも1つの異なる非天然アミノ酸を含む同じ種類の複数の非天然アミノ酸の組み合わせであってもよい。

【0303】

少なくとも1つの非天然アミノ酸を有する対象タンパク質またはポリペプチドは、本発明の特徴である。本発明は、また、本発明の組成物と方法を使って産生された少なくとも1つの非天然アミノ酸を有するポリペプチドまたはタンパク質を含む。賦形剤（限定されないが、薬学的に許容可能な賦形剤を含む）もまた、タンパク質と一緒に存在してもよい。

【0304】

少なくとも1つの非天然アミノ酸を有する対象タンパク質またはポリペプチドを真核細胞中で産生することにより、タンパク質またはポリペプチドは、通常、真核生物の翻訳後修飾を含むことになる。特定の実施形態では、タンパク質は、少なくとも1つの非天然アミノ酸および少なくとも1つの真核細胞によりインビボで作られた翻訳後修飾を含み、この翻訳後修飾は、原核細胞によっては行われぬ。例えば、翻訳後修飾は、限定されないが、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミチン酸化、パルミタート付加、リン酸化、

糖脂質結合修飾、グリコシル化、等を含む。一態様では、翻訳後修飾は、GlcNAc-アスパラギン結合によるアスパラギンへのオリゴ糖（限定されないが、(GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc）を含む）の結合を含む。真核生物のタンパク質のN結合型オリゴ糖（追加の残基が存在してもよく、これは示されていない）の一部の例を挙げている表1を参照されたい。別の態様では、翻訳後修飾は、GalNAc-セリンもしくはGalNAc-トレオニン結合、またはGlcNAc-セリンもしくはGlcNAc-トレオニン結合による、オリゴ糖（限定されないが、Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc、等）のセリンまたはトレオニンへの結合を含む。

【表1】

GLCNAc結合によるオリゴ糖の例

タイプ	塩基構造
高マンノース	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
ハイブリッド	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ --- } \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
錯体	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ --- } \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \text{ --- } \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \\ \text{Man}\alpha 1-3 \searrow \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
キシロース	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \searrow \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \searrow \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $

【0305】

さらに別の態様では、翻訳後修飾は、前駆物質（限定されないが、カルシトニン前駆物質、カルシトニン遺伝子関連ペプチド前駆物質、プレプロ副甲状腺ホルモン、プレプロインシュリン、プロインシュリン、プレプロオピオメラノコルチン、プロオピオメラノコルチン、等を含む）のタンパク分解処理、多サブユニットタンパク質への構築または高分子の構築、細胞内の別の部位に対する翻訳（限定されないが、オルガネラ、例えば、小胞体、ゴルジ装置、核、リソソーム、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、葉緑体、液胞、等、または分泌経路経由を含む）を含む。特定の実施形態では、タンパク質は、分泌または局在化配列、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリスチジンタグ、GST融合体、等を含む。

【0306】

非天然アミノ酸の1つの利点は、追加の分子を付加するために使用できる追加の化学成分を与えるということである。これらの改変は、真核生物または非真核細胞中でインビボで、またはインビトロで行うことができる。従って、特定の実施形態では、翻訳後修飾は、非天然アミノ酸を経由する。例えば、翻訳後修飾は、求核-求電子の反応を経由することができる。最近では、タンパク質選択的改変に使われるほとんどの反応は、限定されないが、 α -ハロケトンとヒスチジンまたはシステイン側鎖の反応を含む求核および求電子反応相手の間の共有結合形成を含む。これらの場合の選択性は、タンパク質中の求核残基の数とアクセシビリティにより測定できる。本発明のタンパク質では、非天然ケトアミノ酸のヒドラジドまたはアミノオキシ化合物とのインビトロおよびインビボでの反応、等の他のより選択性の高い反応を使うことができる。例えば、Cornish、et al.、(1996) J. Am. Chem. Soc.、118:8150-8151; Mahal、et al.、(1997) Science、276:1125-1128; Wang、et al.、(2001) Science 292:498-500; Chin、et al.、(2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-902

7; Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang, et al., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; および、Chin, et al., (2003) Science, 301:964-7、を参照されたい。これら全ては、参照によって本明細書に組み込まれる。これは、フルオロフォア、架橋薬剤（病原体）、サッカライド誘導体および細胞障害性分子等の試薬を含む宿主を使った、実質的に全てのタンパク質の選択的標識を可能とする。また、「糖タンパク質合成 (Glycoprotein synthesis)」のタイトルの米国特許第6、927、042号（参照によって本明細書に組み込まれる）。限定されないが、アジドアミノ酸経由を含む翻訳後修飾は、また、Staudinger連結反応（限定されないが、トリアリールホスフィン試薬を使った）によっても行うことができる。例えば、Kiick et al., (2002)、Staudinger連結反応による化学選択的改変のための組換えタンパク質へのアジドの組み込み (Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation)、PNAS 99:19-24、を参照されたい。

10

【0307】

本発明は、タンパク質の選択的改変のための高度に効率的な別の方法を提供し、この方法は、限定されないが、セクターコドンに応答したアジドまたはアルキニル成分のタンパク質中への組み込みを含む非天然アミノ酸遺伝子の組み込みを含む。これらのアミノ酸側鎖は、次に、限定されないが、それぞれ、アルキニルまたはアジド誘導体等を用いた非限定的Huisgen [3+2] 付加環化反応（例えば、Padwa, A.: 総合有機合成 (Comprehensive Organic Synthesis), Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; および、Huisgen, R.: 1, 3-双極性付加環化化学 (1, 3-Dipolar Cycloaddition Chemistry), (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) により改変できる。この方法は、求核置換よりも付加環化を伴うため、タンパク質は、非常に高い選択性で改変されうる。この反応は、室温の水性条件下、反応混合物に触媒量のCu(I)塩の添加により、優れた位置選択性 (1, 4 > 1, 5) を伴って行うことができる。例えば、Tornoe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; および、Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599、を参照されたい。使用可能な別の方法は、テトラシステインモチーフを使ったビスヒ素化合物上のリガンド交換である。例えば、Griffin, et al., (1998) Science 281:269-272、を参照されたい。

20

30

【0308】

[3+2] 付加環化により本発明のタンパク質に付加できる分子は、アジドまたはアルキニル誘導体を有する実質的に全ての分子を含む。分子には、限定されないが、色素、フルオロフォア、架橋剤、サッカライド誘導体、ポリマー（限定されないが、ポリエチレングリコールの誘導体を含む）、光架橋剤、細胞障害性化合物、親和標識、ビオチン誘導体、樹脂、ビーズ、第2のタンパク質またはポリペプチド（またはさらに多くの）、ポリヌクレオチド（限定されないがDNA、RNA、等）、金属キレート、補助因子、脂肪酸、炭水化物、等が含まれる。これらの分子は、それぞれ、限定されないが、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン等のアルキニル基を有する非天然アミノ酸、または限定されないが、p-アジド-フェニルアラニン等のアジド基を有する非天然アミノ酸に付加する事ができる。

40

【0309】

天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドのインビボ生成

50

本発明のレラキシンポリペプチドは、天然系ではコードされないアミノ酸を付加または置換するために、改変 tRNA および tRNA シンテターゼを使って、インビボで生成できる。

【0310】

天然ではコードされないアミノ酸を使う tRNA および tRNA シンテターゼを生成するための方法が、例えば、米国特許第 7, 045, 337 号および同 7, 083, 970 号に記載されている。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。これらの方法は、翻訳系に対して内在性であるシンテターゼおよび tRNA とは無関係に機能する（また、その故に、「直交性」と呼ばれることもある）翻訳機構の生成を含む。通常、翻訳系は、直交性 tRNA (O-tRNA) および直交性アミノアシル tRNA シンテターゼ (O-RS) を含む。通常、O-RS が、翻訳系の少なくとも 1 つの非天然アミノ酸で O-tRNA をアミノアシル化し、O-tRNA が、系中の他の tRNA によっては認識されない少なくとも 1 つのセクターコドンを認識することが好ましい。翻訳系は、従って、天然ではコードされないアミノ酸を、コードされたセクターコドンに応答して、系中で産生されたタンパク質中に挿入し、それにより、アミノ酸を、コードポリペプチド中の位置に「置換する」。

【0311】

特定の合成アミノ酸をポリペプチド中に挿入するための、各種の直交性 tRNA およびアミノアシル tRNA シンテターゼが当技術分野で記載されており、これらは、通常、本発明での使用に適する。例えば、ケト特異的 O-tRNA / アミノアシル tRNA シンテターゼが、Wang, L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 56-61 (2003) および Zhang, Z. et al., Biochem. 42 (22): 6735-6746 (2003)、に記載されている。代表的 O-RS、またはその一部は、ポリヌクレオチド配列によりコードされ、米国特許第 7, 045, 337 号および同 7, 083, 970 号（それぞれ、参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているアミノ酸配列を含む。O-RS との使用に対応する O-tRNA 分子は、また、米国特許第 7, 045, 337 号および同 7, 083, 970 号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。O-tRNA / アミノアシル tRNA シンテターゼ対のさらなる例は、は、国際公開第 2005 / 007870 号、同 2005 / 007624 号；および同 2005 / 019415 号に記載されている。

【0312】

アジド特異的 O-tRNA / アミノアシル tRNA シンテターゼ系の例は、Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027 (2002)、に記載されている。p-アジド-L-Phe に対する代表的 O-RS 配列には、限定されないが、米国特許第 7, 083, 970 号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように配列番号 14~16 および 29~32 のヌクレオチド配列ならびに配列番号 46~48 および 61~64 のアミノ酸配列が含まれる。本発明での使用に適した代表的 O-tRNA 配列には、限定されないが、米国特許第 7, 083, 970 号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示のように配列番号 1~3 のヌクレオチド配列が含まれる。特定の天然ではコードされないアミノ酸に特異的な O-tRNA / アミノアシル tRNA シンテターゼ対の他の例は、米国特許第 7, 045, 337 号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。ケトおよびアジドの両方を含むアミノ酸を出芽酵母に組み込む O-RS および O-tRNA が、Chin, J. W., et al., Science 301: 964-967 (2003)、に記載されている。

【0313】

他のいくつかの直交性対が、報告されている。出芽酵母 tRNA およびシンテターゼ由来のグルタミル（例えば、Liu, D. R., and Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 4780-4785、参照）、アスパルチル（例えば、Pasternak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83: 2277-2286、参照）、およびチロシ

10

20

30

40

50

ル(田尾Ohno、S.、et al.、(1998) J. Biochem. (Tokyo、Jpn.) 124:1065-1068;および、Kowal、A. K. et al.、(2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273、参照)系が、大腸菌への非天然アミノ酸の組み込みの可能性について記載されている。大腸菌グルタミル(例えば、Kowal、A. K.、et al.、(2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273、参照)およびチロシル(例えば、Edwards、H.、and Schimmel、P.、(1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641、参照)シンテターゼ由来系の出芽酵母中での使用に関し記載されている。大腸菌チロシル系は、3-ヨード-L-チロシンの哺乳動物細胞へのインビボ組込のために使用されている。Sakamoto、K.、et al.、(2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699、参照。

10

【0314】

O-tRNA/アミノアシル-tRNAシンテターゼの使用は、天然ではコードされないアミノ酸をコードする特異的コドンの選択を含む。いずれのコドンも使用可能であるが、O-tRNA/アミノアシル-tRNAシンテターゼが発現する細胞中の、希な、または決して使用されないコドンを選択するのが望ましい。例えば、代表的コドンは、ナンセンスコドン、例えば、停止コドン(アンバー、オーカー、およびオパール)、4以上の塩基コドンおよび希な、または使用されない他の天然3塩基コドンを含む。

【0315】

20

特異的セレクトーコドンは、当技術分野で既知の変異誘発方法(限定されないが、部位特異的変異誘発、カセット変異導入、制限部位選択変異導入法、等を含む)を使って、レラキシンポリヌクレオチドコード配列中の適切な位置に導入できる。

【0316】

タンパク質合成機構の成分、例えば、天然ではコードされないアミノ酸を組み込むのに使用できるO-RS、O-tRNA、および直交性O-tRNA/O-RS対の生成方法が、Wang、L.、et al. Science 292:498-500(2001); Chin、J. W. et al. J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027(2002); Zhang、Z. et al. Biochemistry 42:6735-6746(2003)、に記載されている。天然ではコードされないアミノ酸のインビボ組み込みのための方法と組成物は、米国特許第7,045,337号に記載されている。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。生物のインビボ翻訳系で使用するための直交性tRNA-tRNAシンテターゼ対の選択方法は、また、米国特許第7,045,337号および同7,083,970号に記載されている。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。「ケトアミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込み(Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins)」のタイトルの国際公開第04/035743号(参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)は、ケトアミノ酸の組み込み用の直交性RSおよびtRNA対について記載しており、「真核生物の遺伝コードの拡張(Expanding the Eukaryotic Genetic Code)」のタイトルの国際公開第04/094593号(参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)は、天然ではコードされないアミノ酸の、真核生物宿主細胞中への組み込みのための直交性RSおよびtRNA対について記載している。

30

40

【0317】

少なくとも1つの組換え直交性アミノアシル-tRNAシンテターゼ(O-RS)の産生方法は:(a)限定されないが原核生物、例えば、メタノコッカスジャナスキー、メタノバクテリウム・サーモアウトトロフィクス、ハロバクテリウム、ハロバクテリア、大腸菌、A. フルギドゥス、P. フリオスス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、T. サーモフィルス、等、または真核生物、を含む第1の生物由来の少なくとも1つのアミノアシル-tRNAシンテターゼ(RS)由来の(任意選択で、変異体)RSのライブラリーを生成

50

すること；（b）天然ではコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下でRS（任意選択で、変異体RS）のライブラリーから直交性tRNA（O-tRNA）をアミノアシル化するメンバーを選択（および／または選別）し、それにより活性（任意選択で、変異体）RSのプールを提供すること；および／または、（c）天然ではコードされないアミノ酸が無い場合は、O-tRNAを優先的にアミノアシル化する活性RS（限定されないが、変異体RSを含む）を、そのプールから選択（任意選択で、負の選択によって）し、それにより、少なくとも1つの組換えO-RSを提供することを含み；ここで、少なくとも1つの組換えO-RSが、天然ではコードされないアミノ酸を有するO-tRNAを優先的にアミノアシル化する。

【0318】

一実施形態では、RSは、不活性RSである。不活性RSは、活性RSを変異させることにより作製できる。例えば、不活性RSは、少なくとも約1つ、少なくとも約2つ、少なくとも約3つ、少なくとも約4つ、少なくとも約5つ、少なくとも約6つ、または少なくとも約10以上のアミノ酸を、限定されないがアラニンを含む異なるアミノ酸に変異させることにより作製できる。

【0319】

変異体RSのライブラリーは、限定されないが、タンパク質3次元RS構造に基づく合理的な設計、またはランダムもしくは合理的な設計技術によるRSヌクレオチドの変異誘発、等の種々の当技術分野で既知の技術を使って作製できる。例えば、変異体RSは、部位特異的変異、ランダム変異、多様性生成組換え変異、キメラ構築、合理的な設計および他の本明細書記載の方法または当技術分野で既知の方法により、作製できる。

【0320】

一実施形態では、RS（任意選択で、変異体RS）のライブラリーから、限定されないが、天然ではコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下で直交性tRNA（O-tRNA）をアミノアシル化する活性なメンバーの選択（および／または選別）は、限定されないが、抗生物質耐性遺伝子、等を含む正の選択または選別マーカー、および（任意選択で、変異体）RSのライブラリーの複数の細胞中への導入（ここで、正の選択および／または選別マーカーは、限定されないが、アンバー、オーカー、またはオパールコドンを含む少なくとも1つのセクターコドンを含む）；選択薬剤の存在下、複数の細胞の増殖；選択および／または選別薬剤の存在下、正の選択または選別マーカーの少なくとも1つのセクターコドンを抑制することによる、生存する（または特異的応答を示す）細胞の特定と、それによる、活性（任意選択で、変異体）RSプールを含む正に選択された細胞サブセットの提供、を含む。任意選択で、選択および／または選別薬剤濃度は、変えることができる。

【0321】

一態様では、正の選択マーカーは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子であり、セクターコドンは、CAT遺伝子中のアンバー停止コドンである。任意選択で、正の選択マーカーは、β-ラクタマーゼ遺伝子であり、セクターコドンは、β-ラクタマーゼ遺伝子中のアンバー停止コドンである。別の態様では正の選別マーカーは、蛍光または発光選別マーカーまたは親和性ベースの選別マーカー（限定されないが、細胞表面マーカーを含む）を含む。

【0322】

一実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸が無い場合にO-tRNAを優先的にアミノアシル化する活性RS（任意選択で、変異体）のプールからの負の選択または選別は、正の選択または選別由来の活性（任意選択で、変異体）RSのプールに対する負の選択または選別マーカーの第2の生物の複数の細胞への導入（ここで、負の選択または選別マーカーは、少なくとも1つのセクターコドン（限定されないが、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子、等の抗生物質耐性遺伝子を含む）を含む）；および、天然ではコードされないアミノ酸および選別または選択薬剤を補充した第1の培地中で生存するか、または特異的選別応答を示すが、しかし、天然ではコードさ

10

20

30

40

50

れないアミノ酸および選別または選択薬剤を補充していない第2の培地中では、生存できないか、または特異的応答を示さない細胞の特定、および、それによる少なくとも1つの組換えO-RSを有する生存細胞または選別された細胞の提供、を含む。

【0323】

例えば、CAT特定プロトコルは、任意選択で、適切なO-RS組換え体の決定に際し、正の選択および／または負の選別として作用する。例えば、クローンのプールは、任意選択で、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含む場合と含まない場合について、CAT（少なくとも1つのセクターコドンを含む）を含む増殖プレート上で複製される。天然ではコードされないアミノ酸を含むプレート上でひたすら増殖するコロニーは、従って、組換えO-RSを含むと見なされる。一態様では、選択（および／または選別）薬剤の濃度は変えられる。一部の態様では、第1および第2の生物は、異なり、従って、第1および／または第2の生物は、任意選択で、原核生物、真核生物、哺乳動物、大腸菌、真菌、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物、等を含む。他の実施形態では、選別マーカーは、蛍光または発光選別マーカーまたは親和性ベース選別マーカーを含む。

10

【0324】

別の実施形態では、活性（任意選択で、変異体）RSのプールの選別または選択（限定されないが、負の選択を含む）は、正の選択ステップ由来の活性変異体RSプールの単離、（b）；負の選択または選別マーカー（ここで、負の選択または選別マーカーは、少なくとも1つのセクターコドン（限定されないが、毒性マーカー遺伝子、例えば、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は、少なくとも1つのセクターコドンを含む）を含む）、および活性（任意選択で、変異体）RSのプールの、第2の生物の複数の細胞中への導入；ならびに天然ではコードされないアミノ酸を補充していない第1の培地中で生存するか、または特異的選別応答を示すが、しかし、天然ではコードされないアミノ酸を補充した第2の培地中では生存できないか、または特異的選別応答を示さない細胞の特定、および、それによる、少なくとも1つの組換えO-RSを有する生存または選別細胞の提供、を含み、ここで、少なくとも1つの組換えO-RSは、天然ではコードされないアミノ酸に特異的である。一態様では、少なくとも1つのセクターコドンは、約2つ以上のセクターコドンを含む。このような実施形態は、任意選択で、少なくとも1つのセクターコドンが、2つ以上のセクターコドンを含み、第1と第2の生物（限定されないが、それぞれ、生物が、任意選択で、原核生物、真核生物、哺乳動物、大腸菌、真菌、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物、等を含む）が異なる場合を含んでもよい。また、一部の態様では、ネガティブ選択マーカーが、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子（少なくとも1つのセクターコドンを含む）を含む場合が含まれる。他の態様は、選別マーカーが、任意選択で、蛍光または発光選別マーカーまたは親和性ベース選別マーカーを含む場合を含む。本明細書の実施形態では、選別および／または選択は、任意選択で、多様な選別および／または選択厳密性を含んでもよい。

20

30

【0325】

一実施形態では、少なくとも1つの組換え直交性アミノアシル-tRNAシンテターゼ（O-RS）の産生方法は、（d）少なくとも1つの組換えO-RSの単離；（e）少なくとも1つの組換えO-RS由来のO-RS（任意選択で、変異された）の第2セットの生成；および、（f）優先的にO-tRNAをアミノアシル化する能力を含む変異O-RSが得られるまで、ステップ（b）と（c）の繰り返し、をさらに含んでもよい。任意選択で、ステップ（d）～（f）は、限定されないが、少なくとも約2回、繰り返される。一態様では、組換えO-RS由来の変異O-RSの少なくとも1つの第2セットは、限定されないが、ランダム変異誘発、部位特異的変異誘発、組換えまたはそれらの組み合わせを含む変異誘発により生成されうる。

40

【0326】

上記方法の、限定されないが、正の選択／選別ステップ（b）、負の選択／選別ステップ（c）または正および負の選択／選別ステップ（b）と（c）の両方の選択／選別ステ

50

ップの厳密性については、任意選択で、多様な選択／選別厳密性を含んでもよい。別の実施形態では、正の選択／選別ステップ（b）、負の選択／選別ステップ（c）または正および負の選択／選別ステップ（b）と（c）の両ステップは、レポーターの使用を含み、レポーターは、蛍光標識細胞分取（FACS）または発光により検出される。任意選択で、レポーターは、細胞表面上、ファージディスプレイ上、等で提示され、天然ではコードされないアミノ酸または類似体に伴う親和性または触媒活性に基づいて選択される。一実施形態では、変異シンテターゼは、細胞表面上、ファージディスプレイ上、等で提示される。

【0327】

組換え直交性 tRNA（O-tRNA）の産生方法は、（a）第1の生物由来の、限定されないが、サプレッサー tRNA 等の少なくとも1つの tRNA 由来の変異体 tRNA ライブラリーの生成；（b）第1の生物由来 RS が無い場合は、ライブラリーから第2の生物由来のアミノアシル-tRNA シンテターゼ（RS）によりアミノアシル化される（任意選択で、変異体）tRNA の選択（限定されないが、負の選択を含む）または選別、およびそれによる tRNA（任意選択で、変異体）のプールの提供；ならびに、（c）tRNA（任意選択で、変異体）プールからの、導入直交性 RS（O-RS）によりアミノアシル化されるメンバーの選択または選別と、それによる、少なくとも1つの組換え O-tRNA の提供；を含み、ここで、少なくとも1つの組換え O-tRNA は、セクターコドンを認識し、第2の生物由来 RS には効率的に認識されず、O-RS により優先的にアミノアシル化される。一部の実施形態では、少なくとも1つの tRNA は、サプレッサー tRNA であり、および／または天然および／または非天然塩基の特有の3塩基コドンを含み、またはナンセンスコドン、レアコドン、非天然コドン、少なくとも4塩基を含むコドン、アンバーコドン、オーカーコドン、もしくはオパール停止コドンである。一実施形態では、組換え O-tRNA は、直交性の改善を有する。一部の実施形態では、O-tRNA は、任意選択で、改変を必要とせず、第2の生物から第1の生物へ移入されることは理解されよう。種々の実施形態では、第1および第2の生物は、同じまたは異なり、任意選択で、限定されないが、原核生物（限定されないが、メタノコッカスジャナスキー、メタノバクテリウム・サーモアウトトロフィクス、大腸菌、ハロバクテリア、等を含む）、真核生物、哺乳動物、真菌、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物、等から選択される。さらに、組換え tRNA は、任意選択で、天然ではコードされないアミノ酸によりアミノアシル化され、天然ではコードされないアミノ酸は、天然で、または遺伝子操作によりインビボで生合成される。天然ではコードされないアミノ酸は、任意選択で、少なくとも第1と第2の生物に対し、増殖培地に添加される。

【0328】

一態様では、ライブラリーからの、アミノアシル-tRNA シンテターゼによりアミノアシル化される（任意選択で、変異体）tRNA の選択（限定されないが、負の選択を含む）または選別（ステップ（b））は、毒性マーカー遺伝子（ここで、毒性マーカー遺伝子は、少なくとも1つのセクターコドン（または毒性もしくは静電剤または生物に必須の遺伝子の産生に繋がる遺伝子で、このようなマーカー遺伝子は、少なくとも1つのセクターコドンを含む）を含む）および（任意選択で、変異体）tRNA ライブラリーの第2の生物由来の複数の細胞中への導入；ならびに、生存細胞の選択、を含み、ここで、生存細胞が、少なくとも1つの直交性 tRNA または非機能的 tRNA（任意選択で、変異体）を含む tRNA プールを含む。例えば、生存細胞は、細胞密度比率比較アッセイ（comparison ratio cell density assay）を使って選択してもよい。

【0329】

別の態様では、毒性マーカー遺伝子は、2つ以上のセクターコドンを含んでもよい。この方法の別の実施形態では、毒性マーカー遺伝子は、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子であり、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は、少なくとも1つのアンバーコドンを含む。任意選択で、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は、2つ以上のアンバーコドンを含

んでもよい。

【0330】

一実施形態では、（任意選択で、変異体）tRNAプールからの、導入直交性RS（O-RS）によりアミノアシル化されるメンバーの選択と選別は、O-RSと一緒に、正の選択または選別マーカー遺伝子（正のマーカー遺伝子は、薬剤耐性遺伝子（限定されないが、少なくとも1つのセクターコドン、例えば、少なくとも1つのアンバー停止コドンを含む□-ラクターマーゼ遺伝子を含む）または生物に必須の遺伝子、または毒性剤の解毒作用をもたらす遺伝子を含む）、および（任意選択で、変異体）tRNAプールの、第2の生物由来の複数の細胞への導入；ならびに、限定されないが、抗生物質、等の選択または選別薬剤の存在下で増殖され、生存している、または選別された細胞の特定、および、
10
それによる、少なくとも1つの組換えtRNAを有する細胞プールの提供、を含んでもよく、ここで、少なくとも1つの組換えtRNAが、O-RSによりアミノアシル化され、少なくとも1つのセクターコドンに応答して、アミノ酸を正のマーカー遺伝子によりコードされた翻訳産物中に挿入する。別の実施形態では、選択および／または選別薬剤の濃度は変えられる。

【0331】

特異的O-tRNA/O-RS対の生成方法が、提供される。方法は、（a）第1の生物からの少なくとも1つのtRNA由来の変異体tRNAライブラリーの生成；（b）ライブラリーからの、第1の生物由来のRSが無い場合には、第2の生物由来のアミノアシル-tRNAシンテターゼ（RS）によりアミノアシル化される（任意選択で、変異体）
20
tRNAの負の選択または選別、および、それによる、（変異体）tRNAプールの提供；（c）（任意選択で、変異体）tRNAプールからの、導入直交性RS（O-RS）によるアミノアシル化されるメンバーの選択または選別と、それによる、少なくとも1つの組換えO-tRNAの提供、を含む。少なくとも1つの組換えO-tRNAは、セクターコドンを認識し、第2の生物由来のRSにより効率的に認識されず、O-RSにより優先的にアミノアシル化される。この方法は、また、（d）第3の生物由来の少なくとも1つのアミノアシル-tRNAシンテターゼ（RS）由来の（任意選択で、変異体）RSライブラリーの生成；（e）変異体RSライブラリーからの、天然ではコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下で少なくとも1つの組換えO-tRNAを優先的にアミノアシル化するメンバーの選択または選別と、それによる、活性（任意選択で、変異体）
30
RSプールの提供；ならびに、（f）そのプールからの、天然ではコードされないアミノ酸が無い場合には、少なくとも1つの組換えO-tRNAを優先的にアミノアシル化する活性（任意選択で、変異体）RSの負の選択または選別、およびそれによる、少なくとも1つの特異的O-tRNA/O-RS対の提供、を含み、ここで、少なくとも1つの特異的O-tRNA/O-RS対が、天然ではコードされないアミノ酸および少なくとも1つの組換えO-tRNAに対し特異的である少なくとも1つの組換えO-RSを含む。この方法で産生された特異的O-tRNA/O-RS対が、含まれる。例えば、特異的O-tRNA/O-RS対は、限定されないが、mutRNATyr-mutTyrRS対、例えば、mutRNATyr-SS12TyrRS対、mutRNALeu-mutLeuRS対、mutRNAThr-mutThrRS対、mutRNAGlu-mutGlu
40
RS対、等を含んでもよい。さらに、このような方法は、第1および第3の生物が、同じ（限定されないが、メタノコッカスジャナスキーを含む）場合を含む。

【0332】

インビボで第2の生物翻訳系で使用するための直交性tRNA-tRNAシンテターゼ対の選択方法は、また、本発明に含まれる。その方法は、マーカー遺伝子、第1の生物から単離または由来するtRNAおよびアミノアシル-tRNAシンテターゼ（RS）の、第2の生物由来の第1のセットの細胞への導入；マーカー遺伝子およびtRNAの、第2の生物由来の複製細胞セット中への導入；ならびに、複製細胞セット中では生存できない第1セット中の生存細胞の選択、または複製細胞セット中では示すことができないような、特異的選別応答を示す細胞の選別を含み、ここで、その第1セットおよび複製細胞セッ
50

トが選択または選別薬剤の存在下増殖し、また、生存している、または選別された細胞が、第2の生物のインビボ翻訳系で使用するための直交性 tRNA-tRNA シンテターゼ対を含む。一実施形態では、比較および選択または選別が、インビボ相補性アッセイを含む。選択または選別薬剤の濃度は、変えることができる。

【0333】

本発明の生物は、種々の生物および種々の組み合わせを含む。例えば、本発明の方法の第1および第2の生物の生物は、同じでも、異なってもよい。一実施形態では、生物は、任意選択で、限定されないが、メタノコッカスジャナスキー、メタノバクテリウム・サーモアウトトロフィクス、ハロバクテリア、大腸菌、A. フルギドゥス、P. フリオスス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、T. サーマフィルス、等を含む原核生物生物である。あるいは、生物は、任意選択で、限定されないが、植物（限定されないが、複合植物、例えば、単子葉植物、または双子葉植物を含む）、藻類、原生生物、真菌（限定されないが、酵母、等）、動物（限定されないが、哺乳動物、昆虫、節足動物、等）、等の真核生物を含む。別の実施形態では、第2の生物は、原核生物である。限定されないが、メタノコッカスジャナスキー、メタノバクテリウム・サーモアウトトロフィクス、ハロバクテリア、大腸菌、A. フルギドゥス、ハロバクテリア、P. フリオスス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、T. サーマフィルス、等の原核生物である。あるいは、第2の生物は、限定されないが、酵母、動物細胞、植物細胞、菌類、哺乳動物細胞、等の真核生物であってもよい。種々の実施形態では、第1および第2の生物は異なる。

【0334】

レラキシシンポリペプチド中の非天然アミノ酸の位置

本発明は、1つまたは複数の非天然アミノ酸のレラキシシンポリペプチド中への組込みを意図している。1つまたは複数の非天然アミノ酸は、ポリペプチドの活性を破壊しない特定の位置に組み込むことができる。これは、限定されないが、疎水性のアミノ酸を疎水性のアミノ酸での、かさ高いアミノ酸をかさ高いアミノ酸での、親水性のアミノ酸を親水性のアミノ酸での置換、および／または非天然アミノ酸を活性にとって必要でない位置への挿入、等の「保存的」置換をする事により達成できる。

【0335】

種々の生化学的および構造的手法を採用して、インスリンポリペプチド内の所望の、天然ではコードされないアミノ酸で置換する部位を選択できる。ポリペプチド鎖のいずれの位置が、天然ではコードされないアミノ酸を組み込むための選択に適するかは、当業者には容易に明らかであり、選択は、いずれかの特定の所望の目的のために、または特定の所望の目的のない場合に、合理的な設計に基づいて、またはランダム選択によって行うことができる。所望の部位の選択は、限定されないが、下記のいずれかの所望の特性または活性を有するレラキシシン分子の産生のためであってもよい。アゴニスト、スーパーアゴニスト、逆アゴニスト、アンタゴニスト、受容体結合修飾物質、受容体活性修飾物質、ダイマーまたはマルチマー形成、天然分子に比べて活性または特性の無変化、またはポリペプチドのいずれかの物理もしくは化学性質、例えば、溶解度、凝集、または安定性の操作対して活性または特性の無変化。例えば、レラキシシンポリペプチドの生物活性に必要なポリペプチド中の位置は、当技術分野で既知の点変異分析、アラニン走査、飽和変異誘発および生物活性選別、または相同体走査法を使って特定できる。レラキシシンポリペプチドの改変残基を特定するために使用できる他の方法には、限定されないが、以下が含まれる：配列プロファイリング (Bowie and Eisenberg, Science 253 (5016): 164-70, (1991))、回転異性体ライブラリー選択 (Dahiyat and Mayo, Protein Sci 5 (5): 895-903 (1996); Dahiyat and Mayo, Science 278 (5335): 82-7 (1997); Desjarlais and Handel, Protein Science 4: 2006-2018 (1995); Harbury et al., PNAS USA 92 (18): 8408-8412 (1995); Kono et al., Proteins: Structure, Function and Gene

t i c s 19:244-255 (1994); H e l l i n g a a n d R i c h a r d s、P N A S U S A 91:5803-5807 (1994)) ; および残基対ポテンシャル (J o n e s、P r o t e i n S c i e n c e 3:567-574、(1994))、およびタンパク質設計オートメーション (登録商標) 技術を使った合理的設計、(米国特許第6, 188, 965号; 同6, 269, 312号; 同6, 403, 312号; 国際公開第98/47089号を参照。これらの特許は、参照によって組み込まれる)。レラキシンの生物活性にとって重要な残基、医薬品安定性と関連のある残基、抗体エпитープまたは受容体結合残基は、変異されうる。米国特許第5, 580, 723号; 同5, 834, 250号; 同6, 013, 478号; 同6, 428, 954号; および同6, 451, 561号 (参照によって組み込まれる本明細書に組み込まれる) は、ポリペプチドの活性に影響を与える活性ドメインを、標的物質を使って特定することによる、レラキシン等のポリペプチドの構造および機能の系統的分析方法を記載している。アラニンまたは相同体系統的変異導入法により生物活性に重要であると特定されたもの以外の残基は、ポリペプチドに求められる所望の活性に応じて、天然ではコードされないアミノ酸による置換のための良い候補となる可能性がある。あるいは、生物活性に重要であると特定された位置もまた、再度、ポリペプチドに求められる所望の活性によっては、天然ではコードされないアミノ酸の置換のための良い候補である可能性がある。別の選択肢は、ポリペプチド鎖の各位置で天然ではコードされないアミノ酸で単純に逐次置換を行い、ポリペプチドの活性に与える効果を観察することであろう。非天然アミノ酸で置換する任意のポリペプチド中の位置の選択手段、技術、または方法のいずれも、本発明での使用に適することは、当業者には容易に明らかであろう。

10

20

【0336】

また、欠失を含むレラキシンのポリペプチド変異体の構造および活性を調べて、天然ではコードされないアミノ酸による置換に耐えられそうなタンパク質の領域を特定することもできる。同様の方法で、プロテアーゼ消化およびモノクローナル抗体を使って、レラキシン受容体への結合に関与するレラキシンの領域を特定することができる。天然ではコードされないアミノ酸による置換に耐えられそうにない残基が除去されるとすぐに、残っている位置のそれぞれの提案された置換の影響が調査でき、他のレラキシンファミリーメンバーおよびレラキシン受容体の3次元結晶構造から、モデルが作製できる。蛋白質構造データバンク (P D B、W o r l d W i d e W e b の r c s b . o r g から利用可能) は、大きなタンパク質および核酸分子の3次元構造データを含む集中型データベースである。3次元構造データが利用できない場合には、ポリペプチドの二次および三次構造の検討を行うモデルを作ることができる。従って、当業者なら、天然ではコードされないアミノ酸で置換できる位置を容易に特定できる。

30

【表 2】

レラキシンA鎖		複合溶媒露出度			鎖A/B界面		
残基名	残基 # /配列 番号1	残基平均	主鎖平均	側鎖平均	残基平均	主鎖平均	側鎖平均
LEU	2	2.393927	2.336841	2.451013	0.00913	0.018259	0
TYR	3	1.05745	1.412109	0.880121	0.448218	0.164923	0.589865
SER	4	2.039557	1.726208	2.666253	0.094701	0.127334	0.029435
ALA	5	1.47603	1.32887	2.064669	0.040922	0.051152	0
LEU	6	0.520247	0.621696	0.418798	0.174242	0.189235	0.159248
ALA	7	0.476043	0.450361	0.578769	0.512186	0.474717	0.662064
ASN	8	1.252271	0.865912	1.638629	0.32958	0.460124	0.199036
LYS	9	0.886439	0.727133	1.013884	0.424786	0.531522	0.339397
CYS	10	0.307912	0.414588	0.094561	0.731348	0.802621	0.588801
CYS	11	0.791671	0.774527	0.825959	1.267628	1.170385	1.462113
HIS	12	1.644891	1.389182	1.815363	0.902367	0.910146	0.897182
VAL	13	1.432029	1.329367	1.568911	0.865782	1.041144	0.631966
GLY	14	0.721258	0.721258	0	0.814179	0.814179	0
CYS	15	0.405285	0.470822	0.274212	0.79239	0.856379	0.664412
THR	16	0.511268	0.367613	0.702808	1.096358	1.011865	1.209014
LYS	17	0.376592	0.233542	0.491032	2.691742	1.414171	3.713799
ARG	18	0.97893	0.478638	1.264811	1.626733	1.12903	1.911135
SER	19	0.416177	0.424198	0.405482	0.476934	0.49423	0.453873
LEU	20	0.155542	0.267306	0.043778	0.735924	0.711222	0.760627
ALA	21	0.478645	0.507787	0.362075	1.105314	1.045545	1.344386
ARG	22	1.273184	1.102102	1.370945	0.551495	0.572567	0.539454
PHE	23	1.054989	1.153619	0.998629	0.428106	0.829454	0.198764
CYS	24	1.352353	1.506838	1.146374	2.07439	2.22276	1.876563

10

20

30

【表 3】

レラキシンB鎖		複合溶媒露出度			鎖A/B界面		
残基名	残基#/ 配列 番号2	残基平均	主鎖平均	側鎖平均	残基平均	主鎖平均	側鎖平均
SER	2	2.241497	2.362674	1.999142	1.249697	1.108926	1.531239
TRP	3	1.036157	1.320435	0.922445	0.774516	1.009561	0.680498
MET	4	0.765903	0.783709	0.748097	1.378683	1.318601	1.438766
GLU	5	1.401968	1.102195	1.641786	1.60857	1.38927	1.784009
GLU	6	1.209446	0.935167	1.428869	0.994341	1.251666	0.788481
VAL	7	1.123345	1.08403	1.175766	1.917498	1.613757	2.322484
ILE	8	0.478044	0.594216	0.361873	1.329975	1.726264	0.933686
LYS	9	1.135226	0.723724	1.464427	2.332893	1.427852	3.056925
LEU	10	0.579	0.504927	0.653072	0.906043	1.195675	0.616411
CYS	11	0.862862	0.806072	0.976442	1.030881	0.795964	1.500714
GLY	12	1.089858	1.089858	0	0.604306	0.604306	0
ARG	13	3.079311	1.482092	3.992007	0.024047	0.066128	0
GLU	14	1.46883	0.992251	1.680643	0.137036	0.204496	0.107054
LEU	15	0.378917	0.508368	0.249467	0.743117	0.470105	1.016129
VAL	16	1.018006	0.820163	1.281796	0.279417	0.29034	0.264852
ARG	17	1.660023	0.937977	2.072621	0.048147	0.132403	0
ALA	18	0.51055	0.547669	0.362075	0.379088	0.387335	0.346101
GLN	19	0.436502	0.481692	0.400351	1.12185	0.733873	1.432231
ILE	20	1.321723	0.993689	1.649758	0.294635	0.473331	0.115939
ALA	21	1.001017	0.958569	1.170807	0.362917	0.40431	0.197346
ILE	22	0.381207	0.565133	0.197281	0.689578	0.665212	0.713943
CYS	23	0.888302	0.931778	0.80135	0.782559	0.685197	0.977284
GLY	24	1.608804	1.608804	0	0.25224	0.25224	0
MET	25	1.419412	1.489301	1.349524	0.239722	0.18572	0.293724
SER	26	1.07028	1.249672	0.711497	0.582382	0.433677	0.879791
THR	27	2.199516	2.265998	2.110873	0.228179	0.155968	0.32446
TRP	28	4.74167	3.651826	4.971111	0	0	0

【0337】

一部の実施形態では、本発明レラキシンポリペプチドは、ポリペプチドの構造を破壊しないタンパク質の領域に配置された1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含む。

【0338】

天然ではコードされないアミノ酸の代表的組込み残基は、潜在的受容体結合領域から除外されているものであっても、完全または部分的に溶媒露出されて、近傍の残基と最小限のまたは非水素結合相互作用を有するものであっても、近接反応性残基に最小限に露出されて、1つまたは複数の露出面上にあっても、第2のレラキシンまたは他の分子またはその断片に並置された1つの位置または複数位置にあっても、3次元、2次、3次、または4次レラキシン構造、その受容体への結合または非結合、または別の生物学的に活性な分子への結合または非結合、から予測されるような、高度にフレキシブル、または構造的に剛直な領域にあっても、または、所望通りの完全構造の柔軟性または剛直性を変えることにより、レラキシンそれ自体、または1つまたは複数のレラキシンを含むダイマーもしくはマルチマーの高次構造を調節してもよい。

【0339】

当業者なら、このようなレラキシンの分析が、タンパク質の三次構造内に埋没しているアミノ酸残基に比べて、どのアミノ酸残基の表面が露出しているかの判定を可能とするか

をわかっている。従って、表面が露出した残基のアミノ酸に対し、天然ではコードされないアミノ酸を置換するのが、本発明の実施形態である。

【0340】

一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、レラキシンの1つまたは複数の下記の位置に組み込まれる：A鎖の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22（すなわち、タンパク質カルボキシル末端）、およびそれらの任意の組み合わせ（配列番号1）またはB鎖の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31（配列番号2）。

10

【0341】

レラキシンの結晶構造およびレラキシン受容体との相互作用の調査により、どの特定のアミノ酸残基が、完全にまたは部分的に溶媒に接近可能な側鎖を有するかを示すことができる。天然ではコードされないアミノ酸のこれらの位置での側鎖は、タンパク質表面から外れ、溶媒中に突き出てもよい。

【0342】

一部の実施形態では、限定されないが、1つまたは複数の下記の位置の天然ではコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに結合する：A鎖の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22（すなわち、タンパク質カルボキシル末端）、およびそれらの任意の組み合わせ（配列番号1）またはB鎖の位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31（配列番号2）。

20

【0343】

各種の天然ではコードされないアミノ酸は、レラキシンポリペプチドの所与の位置に置換、または組み込み可能である。一般的には、レラキシンポリペプチドまたは他のレラキシンファミリーメンバーまたはその受容体を有するレラキシン類似体の3次元結晶構造、保存的置換（すなわち、アリアルベースの天然ではコードされないアミノ酸、例えば、Phe、TyrまたはTrpを置換するp-アセチルフェニルアラニンまたはO-プロパルギルチロシン）のための優先度、およびレラキシンポリペプチドに導入が望まれる特異的コンジュゲーション化学（例えば、アルキン成分を有する水溶性ポリマーを使って、Huisgen [3+2] 付加環化、または次に、ホスフィン成分を組み込むアリアルエステルを有する水溶性ポリマーを使ってアミド結合形成を行うことが望まれる場合は、4-アジドフェニルアラニンの導入）の調査に基づいて、天然ではコードされない特定のアミノ酸が、組み込み用として選択される。

30

【0344】

一実施形態では、方法は、非天然アミノ酸のタンパク質中への組み込み（ここで、非天然アミノ酸が第1の反応基を含む）；およびタンパク質を第2の反応基を含む分子（限定されないが、標識、色素、ポリマー、水可溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、放射性核種、細胞障害性の化合物、薬剤、親和標識、光親和標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質またはポリペプチドまたはポリペプチド類似体、抗体または抗体断片、金属キレート剤、補助因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、サッカライド、水可溶性 dendrimer、シクロデキストリン、抑制性リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、フルオロフォア、金属含有成分、放射性成分、新規官能基、共有結合または非共有結合で他の分子と相互作用する基、フォトケージ化成分、化学線励起成分、光異性化可能な成分、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込んだ成分、化学的切断可能な基、光切断可能な基、延長側鎖、炭素結合型糖、レドックス活性剤、アミノチオ酸、毒成分、同位体標識

40

50

成分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度基、磁性基、インターカレート基、発色団、エネルギー遷移剤、生理活性物質、検出可能標識、小分子、量子ドット、ナノトランスミッター、放射性核種標識ヌクレオチド、放射性核種標識トランスミッター、中性子捕獲剤、もしくは上記のいずれかの組み合わせ、またはいずれかの他の望ましい化合物もしくは物質、を含む）との接触をさらに含む。第1の反応基は、第2の反応基と反応し、 $[3+2]$ 付加環化によりその分子を非天然アミノ酸に結合する。一実施形態では、第1の反応基は、アルキニルまたはアジド成分であり、第2の反応基は、アジドまたはアルキニル成分である。例えば、第1の反応基は、アルキニル成分（限定されないが、非天然アミノ酸p-プロパルギルオキシフェニルアラニン中の）であり、第2の反応基は、アジド成分である。別の例では、第1の反応基は、アジド成分（限定されないが、非天然アミノ酸p-アジド-L-フェニルアラニン中の）であり、第2の反応基は、アルキニル成分である。

10

【0345】

一部の例では、天然ではコードされないアミノ酸置換は、レラキシンポリペプチド内の他の付加、置換または欠失と組み合わせられ、他のレラキシンポリペプチドの生物学的特色を呈する。一部の例では、他の付加、置換または欠失は、レラキシンポリペプチドの安定性（限定されないが、タンパク分解に対する抵抗性）を高めることができ、または受容体に対するレラキシンポリペプチドの親和性を高めることができる。一部の例では、他の付加、置換または欠失は、レラキシンポリペプチドの医薬品安定性を高めることができる。一部の例では、他の付加、置換または欠失は、レラキシンポリペプチドの抗ウイルス活性を強化することができる。一部の例では、他の付加、置換または欠失は、レラキシンポリペプチドの溶解度（限定されないが、大腸菌または他の宿主細胞中で発現した場合）を高めることができる。一部の実施形態では、付加、置換または欠失は、大腸菌または他の組換え宿主細胞中で発現後のレラキシンポリペプチドの溶解度を高めることができる。一部の実施形態では、大腸菌または別の組換え宿主細胞中での発現後のポリペプチドの溶解度を高めることに繋がる非天然アミノ酸の組み込み用の別の位置に加えて、天然でコードされるまたは非天然アミノ酸による置換用の位置が選択される。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、レラキシンポリペプチド受容体、結合タンパク質、もしくは関連するリガンドに対する親和性を調節する、レラキシン受容体への結合後のシグナル伝達を調節する、循環半減期を調節する、放出またはバイオアベイラビリティを調節する、精製を促進する、または特定の投与経路を改善もしくは変更する別の付加、置換もしくは欠失を含む。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、受容体に対するレラキシン変異体の親和性を高める付加、置換または欠失を含む。同様に、レラキシンポリペプチドは、化学または酵素切断配列、プロテアーゼ切断配列、反応基、抗体結合ドメイン（限定されないが、FLAGまたはポリHis、等）または他の親和性に基づく配列（限定されないが、FLAG、ポリHis、GST、等）または検出（限定されないが、GFP、等）、精製、組織もしくは細胞膜を介した輸送、プロドラッグ放出もしくは活性化、レラキシンサイズ減少、またはほかのポリペプチドの特性を改善する連結分子（限定されないが、ビオチン、等）を含んでもよい。

20

30

【0346】

一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸の置換は、レラキシンアンタゴニストを生成する。一部の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸は、受容体結合に関連する領域に置換または付加される。一部の実施形態では、レラキシンアンタゴニストは、レラキシンをアンタゴニストとして作用させる少なくとも1つの置換を含む。一部の実施形態では、レラキシンアンタゴニストは、レラキシン分子の受容体結合領域に存在する水溶性ポリマーに結合した天然ではコードされないアミノ酸を含む。

40

【0347】

一部の例では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超のアミノ酸が、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸で置換される。一部の例では、レラキシンポリペプチドは、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸の置換され

50

たものに対し、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超の天然アミノ酸に対する置換をさらに含む。例えば、一部の実施形態では、レラキシン中の1つまたは複数の残基が1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸で置換される。一部の例では、1つまたは複数の天然ではコードされない残基が、1つまたは複数の低級分子量直鎖または分岐PEGに結合され、それにより、単一の、より大きい分子量のPEGに結合した種に比べて、結合親和性を高め、同等の血清半減期を延長する。

【0348】

一部の実施形態では、下記のレラキシン残基の2つまでが、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸で置換される。

【0349】

非真核生物および真核生物中での発現

クローン化レラキシンポリヌクレオチドの高レベル発現を得るために、典型的には、本発明のレラキシンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、転写、転写／翻訳ターミネーターを指示する強力なプロモーター、およびタンパク質をコードする核酸が、翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含む発現ベクター中にサブクロニングされる。適切な細菌プロモーターは、当業者には既知であり、また、例えば、Sambrook et al. および Ausubel et al. に記載されている。

【0350】

本発明のレラキシンポリペプチド発現用細菌発現系は、限定されないが、大腸菌、バチルス種、蛍光菌、緑膿菌、プチダ菌、およびサルモネラ菌 (Palva et al., Gene 22: 229-235 (1983); Mosbach et al., Nature 302: 543-545 (1983))、等で利用可能である。このような発現系のキットは、市販されている。哺乳動物細胞、酵母、および昆虫細胞に対する真核生物発現系は、当業者には既知であり、市販されている。直交性tRNAおよびアミノアシルtRNAシンテターゼ (上述の) を使用して、本発明のレラキシンポリペプチドの発現を行う場合には、発現用宿主細胞は、直交性成分を使用するそれらの能力に基づいて選択される。代表的宿主細胞には、グラム陽性細菌 (限定されないが、B. プレビス、枯草菌、またはストレプトマイセス、等) およびグラム陰性細菌 (大腸菌、蛍光菌、緑膿菌、プチダ菌)、ならびに酵母および他の真核細胞が含まれる。O-tRNA/O-RS対を含む細胞は、本明細書記載のように使用可能である。

【0351】

本発明の真核生物宿主細胞または非真核生物宿主細胞は、有用な大量の非天然アミノ酸を含むタンパク質を合成する能力を提供する。一態様では、組成物は、任意選択で、限定されないが、少なくとも10 μg、少なくとも50 μg、少なくとも75 μg、少なくとも100 μg、少なくとも200 μg、少なくとも250 μg、少なくとも500 μg、少なくとも1 mg、少なくとも10 mg、少なくとも100 mg、少なくとも1つのg、またはそれ超の非天然アミノ酸、またはタンパク質のインビボ産生方法で達成できる量を含むタンパク質を含む (組換えタンパク質産生および精製に関する詳細は、本明細書で提供される)。別の態様では、タンパク質は、任意選択で、組成物中に、限定されないが、少なくとも10 μgのタンパク質、少なくとも50 μgのタンパク質/L、少なくとも75 μgのタンパク質/L、少なくとも100 μgのタンパク質/L、少なくとも200 μgのタンパク質/L、少なくとも250 μgのタンパク質/L、少なくとも500 μgのタンパク質/L、少なくとも1ミリグラムのタンパク質/L、または少なくとも10 mgのタンパク質/Lまたはそれ超の濃度で、限定されないが、細胞ライセート、緩衝液、医薬品緩衝液、または他の液体懸濁液 (限定されないが、限定されないが、約1 nl ~ 約100 L以上の範囲の容量で) として存在する。少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むタンパク質の真核細胞中での大量の産生 (限定されないが、通常、他の方法、例えば、インビトロ翻訳、で可能な量より多い) は、本発明の1つの特徴である。

【0352】

本発明の真核生物宿主細胞または非真核生物宿主細胞は、有用な大量の非天然アミノ酸

10

20

30

40

50

を含むタンパク質を生合成する能力を提供する。例えば、非天然アミノ酸含有タンパク質は、限定されないが、少なくとも $10\mu\text{g/L}$ 、少なくとも $50\mu\text{g/L}$ 、少なくとも $75\mu\text{g/L}$ 、少なくとも $100\mu\text{g/L}$ 、少なくとも $200\mu\text{g/L}$ 、少なくとも $250\mu\text{g/L}$ 、または少なくとも $500\mu\text{g/L}$ 、少なくとも 1mg/L 、少なくとも 2mg/L 、少なくとも 3mg/L 、少なくとも 4mg/L 、少なくとも 5mg/L 、少なくとも 6mg/L 、少なくとも 7mg/L 、少なくとも 8mg/L 、少なくとも 9mg/L 、少なくとも 10mg/L 、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 mg/L 、 1g/L 、 5g/L 、 10g/L またはそれ超のタンパク質濃度で、細胞抽出物、細胞ライセート、培地、緩衝液、等中で産生出来る。

10

【0353】

レラキシンの発現に適するいくつかのベクターが市販されている。真核生物宿主用の有用な発現ベクターには、限定されないが、SV40ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルス由来発現制御配列を含むベクターが含まれる。このようなベクターは、pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen、Carlsbad、Calif.、USA)およびpCI-neo (Stratagene、LaJolla、Calif.、USA)を含む。細菌プラスミド、例えば、pBR322、pET3aおよびpET12a等の大腸菌由来プラスミド、より広宿主域プラスミド、例えば、RP4、ファージDNA、例えば、多くのファージラムダ誘導体、例えば、NM989、ならびに他のDNAファージ、例えば、M13および繊維状単鎖DNAファージ、を使用可能である。2 μ プラスミドおよびその誘導体、POT1ベクター（米国特許第4、931、373号（参照によって組み込まれる））、(Okkels、Ann. New York Acad. Sci. 782、202207、1996)に記載のpJSO37ベクターおよびpPICZA、BまたはC (Invitrogen)は、酵母宿主細胞と共に使用できる。昆虫細胞用のベクターには、限定されないが、pVL941、pBG311 (Cate et al.、「ミューラー管サプレッサーのためのウシおよびヒト遺伝子の単離と動物細胞中でのヒト遺伝子の発現 (Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells)」、Cell、45、pp. 6859 8 (1986))、pBluebac4.5およびpMelbac (Invitrogen、Carlsbad、CA)が含まれる。

20

30

【0354】

また、レラキシシポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、シグナルペプチドをコードする配列を含んでも含まなくてもよい。ポリペプチドが発現した細胞から分泌されるべき場合、シグナルペプチドが存在する。このようなシグナルペプチドは、どのような配列でもよい。シグナルペプチドは、原核生物由来でも、真核生物由来でもよい。Coloma、M (1992) J. Imm. Methods 152:89104)には、哺乳動物細胞中で使用されるシグナルペプチド（マウスIg kappa軽鎖シグナルペプチド）について記載されている。他のシグナルペプチドには、限定されないが、出芽酵母由来の α 因子シグナルペプチド（米国特許第4、870、008号。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる）、マウス唾液アミラーゼのシグナルペプチド (O. Hagenbuchle et al.、Nature 289、1981、pp. 643-646)、改変カルボキシペプチダーゼシグナルペプチド (L. A. Vails et al.、Cell 48、1987、pp. 887-897)、酵母BARIシグナルペプチド（国際公開第87/02670号。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる）、および酵母アスパラギン酸プロテアーゼ3 (YAP3)シグナルペプチド (M. Egeli-Mitani et al.、Yeast 6、1990、pp. 127-137、参照)が含まれる。

40

【0355】

50

適切な哺乳類宿主細胞の例は、当業者には既知である。このような宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、（例えば、CHO-K1；ATCC CCL-61）、ミドリザル細胞（COS）（例えば、COS1（ATCC CRL-1650）、COS7（ATCC CRL-1651））；マウス細胞（例えば、NS/O）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞株（例えば、ATCC CRL-1632またはATCC CCL-10）、およびヒト細胞（例えば、HEK293（ATCC CRL-1573））、ならびに組織培養液中の植物細胞であってもよい。これらの細胞株および他のものは、公共の保管場所、例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関、Rockville、Mdから入手可能である。レラキシシポリペプチドの改善されたグリコシル化を提供するために、哺乳類宿主細胞は、例えば、米国特許第5,047,335号に記載されているように、シアル酸転移酵素、例えば、1,6-シアル酸転移酵素を発現するように改変できる。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0356】

外因性のDNAを哺乳類宿主細胞へ導入する方法には、限定されないが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、電気穿孔、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、ウイルスベクターおよびLife Technologies Ltd、Paisley、UKに記載の、リボフェクタミン2000を使った、およびRoche Diagnostics Corporation、Indianapolis、USAに記載のFuGENE6を使ったトランスフェクション方法、が含まれる。これらの方法は、当技術分野でよく知られており、また、Ausbel et al. (eds.)、1996、分子生物学における最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）、John Wiley & Sons、New York、USA、に記載されている。例えば、（動物細胞バイオテクノロジー、方法およびプロトコル（Animal Cell Biotechnology、Methods and Protocols）、Edited by Nigel Jenkins、1999、Human Press Inc. Totowa、N. J.、USA、およびHarrison Mass. and Rale IF、細胞培養の一般的方法（General Techniques of Cell Culture）、Cambridge University Press 1997）に開示のように確立された方法に従って、哺乳動物細胞の培養を行うことができる。

20

30

【0357】

発現系、培養、および単離

レラキシシポリペプチドは、適切などのような数の発現系、例えば、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、および細菌、等の発現系中でも発現させることができる。代表的発現系の説明は、以下に提供される。

【0358】

酵母 本明細書で使われる用語の「酵母」は、レラキシシポリペプチドをコードする遺伝子を発現することができる種々の酵母のいずれかを含む。このような酵母には、限定されないが、有子嚢胞子酵母（エンドマイセタレス）、担子菌酵母および不完全菌類（ブラストミセス）群に属する酵母、が含まれる。有子嚢胞子酵母は、2つのファミリー、スペルモフトラ科およびサッカロミセス科、に分割される。後者は、4つの亜科、シゾサッカロミセス亜科（例えば、シゾサッカロミセス属）、ナドソニオイデ亜科、リボミコイデア亜科およびサッカロミセス亜科（例えば、ピキア属、クリベロミセス属およびサッカロミセス属）から構成される。担子菌酵母には、ロイコスポリジウム属、ロドスポリジウム属、スポリディオボラス属、フィロバシディウム属、およびフィロバジエラ属が含まれる。不完全菌類（ブラストミセス）群に属する酵母は、スポロボロミセス科（例えば、スポロボロミセス属およびブレラ属）およびクリプトコックス科（例えば、カンジダ属）の2つのファミリーに分割される。

40

【0359】

50

本発明での使用に対し特に関心が高いのは、ピキア属、クリベロマイセス属、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、ハンゼヌラ属、トルロプシス属、およびカンジダ属の種であり、これには、限定されないが、P. パストリス、P. グレリモンディー、出芽酵母、S. カールスベルゲンシス、S. ジアスタチカス、S. ドウグラシー、S. クルイヴェリ、S. ノルベンシス、S. オビホルミス、K. ラクチス、K. フラギリス、C. アルビカンス、C. マルトーザ、およびH. ポリモルファ、が含まれる。

【0360】

適切なレラキシンポリペプチド発現用酵母の選択は、当業者の技量の範囲内にあることである。発現用酵母宿主の選択で、適切な宿主には、例えば、良好な分泌能力、低タンパク分解性活性、良好な分泌能力、良好な可溶正タンパク質の産生、および全体頑強性を有することが示されたものが含まれる。酵母は、通常、限定されないが、Yeast Genetic Stock Center、Department of Biophysics and Medical Physics、University of California (Berkeley、CA)、およびアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) (「ATCC」) (Manassas、VA) 等の種々のソースから入手可能である。

【0361】

用語の「酵母宿主」または「酵母宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAのためのレシピエントとして使われる可能性のある、または使われている酵母を含む。この用語は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAの挿入された元の酵母宿主細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、偶発的または意図的変異に起因して、形態学、またはゲノム、または全DNA補体の点で、必ずしも完全に元の親に同じでなくてもよいことは理解されよう。関連特性、例えば、ヌクレオチドレラキシンポリペプチドをコードする配列の存在、を特徴とする親に十分に類似の親細胞の子孫は、この定義で意図される子孫に含まれる。

【0362】

染色体外レプリコンまたは組み込み型ベクターを含む発現および形質転換ベクターが、多くの酵母宿主中での形質転換のために開発されている。例えば、S. セレビシア (芽酵母) (Sikorski et al.、GENETICS (1989) 122:19; Ito et al.、J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen et al.、PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); C. アルビカンス (Kurtz et al.、MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); C. マルトーザ (Kunze et al.、J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); H. ポリモルファ (Gleson et al.、J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al.、MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); K. フラギリス (Das et al.、J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); K. ラクチス (DeLouvencourt et al.、J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Vanden Berg et al.、BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); P. グレリモンディー (Kunze et al.、J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); P. パストリス (米国特許第5, 324, 639号; 同4, 929, 555号; および同4, 837, 148号; Cregg et al.、MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); 分裂酵母 (Beach et al.、NATURE (1982) 300:706); およびアルカン資化酵母; 偽巢性コウジ菌 (Ballance et al.、BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn et al.、GENE (1983) 26:205-221; およびYelton et al.、PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); クロコウジカビ (Kelly and Hynes、EMBOJ. (1985) 4:1470-74)。

10

20

30

40

50

4：475-479）；T. リージア（欧州特許第EP0244234号）；および糸状菌、例えば、パンカビ、アオカビ類、トリボクラジウム（国際公開第91/00357号）用に、発現ベクターが開発されている。それぞれが、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0363】

酵母ベクターに対する制御配列は、当業者に既知であり、限定されないが、遺伝子、例えば、アルコール脱水素酵素（ADH）（欧州特許第EP0284044号）；エノラーゼ；グルコキナーゼ；ブドウ糖-6-リン酸塩イソメラーゼ；グリセルアルデヒド-3-リン酸塩脱水素酵素（GAPまたはGAPDH）；ヘキソキナーゼ；ホスホフルクトキナーゼ；3-ホスホグリセリン酸塩ムターゼ；およびピルビン酸キナーゼ（PyK）（欧州特許第EP0329203号）由来のプロモーター領域を含む。酸ホスファターゼをコードする酵母PH05遺伝子も、また、有用なプロモーター配列を提供できる（Miyano et al.、PROC. NATL. ACAD. SCI. USA（1983）80：1）。酵母宿主と使用するための他の適切なプロモーター配列は、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzman et al.、J. BIOL. CHEM.（1980）255：12073）；および他の糖分解酵素、例えば、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、およびグルコースリン酸イソメラーゼ（Holland et al.、BIOCHEMISTRY（1978）17：4900；Hess et al.、J. ADV. ENZYME REG.（1969）7：149）用のプロモーターを含むことができる。追加の増殖条件による転写制御の利点を有する誘導型酵母プロモーターは、アルコール脱水素酵素2；イソチクロームC；酸ホスファターゼ；メタロチオネイン；グリセルアルデヒド-3-リン酸塩脱水素酵素；窒素代謝関連分解酵素；およびマルトースおよびガラクトース利用に関与する酵素用のプロモーター領域を含んでもよい。酵母発現に使用するための適切なベクターおよびプロモーターは、欧州特許第EP0073657号にさらに記載されている。

【0364】

酵母エンハンサーは、また、酵母プロモーターと一緒に使用できる。さらに、合成プロモーターもまた、酵母プロモーターとして機能できる。例えば、酵母プロモーターの上流活性化配列（UAS）は、別の酵母プロモーターの転写活性化領域を連結でき、合成ハイブリッドプロモーターを生成する。このようなハイブリッドプロモーターの例には、GAP転写活性化領域に連結されたADH調節配列を含む。米国特許第4、880、734号および同4、876、197号を参照されたい。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。ハイブリッドプロモーターの他の例には、糖分解酵素遺伝子、例えば、GAPまたはPyKの転写活性化領域と組み合わせ、ADH2、GAL4、GAL10、またはPH05遺伝子の調節配列から構成されるプロモーターが含まれる。欧州特許第EP0164556号を参照されたい。さらに、酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼと結合し、転写を開始する能力を有する非酵母由来天然プロモーターを含んでもよい。

【0365】

酵母発現ベクターの一部を含むことが可能な他の制御領域には、例えば、GAPDHまたはエノラーゼ遺伝子由来のターミネーターを含んでもよい（Holland et al.、J. BIOL. CHEM.（1981）256：1385）。さらに、2μプラスミド由来の複製起点は、酵母に適する。酵母中で使用するための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミド中に存在するtrp1遺伝子である。Tschumper et al.、GENE（1980）10：157；Kingsman et al.、GENE（1979）7：141を参照されたい。trp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠いた酵母変異体株用の選択マーカーを提供する。同様に、Leu2欠損酵母株（ATCC20、622または38、626）は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドにより補完される。

【0366】

外因性のDNAを酵母宿主中に導入する方法は、当業者には既知であり、通常、限定されないが、スフェロプラストまたはアルカリカチオンで処理したインタクト酵母宿主細胞の形質転換を含む。例えば、酵母の形質転換は、Hsiao et al.、PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829およびVan Solingen et al.、J. BACT. (1977) 130:946、に記載の方法に従って行うことができる。しかし、通常、DNAを細胞に導入する他の方法、例えば、核注入、電気穿孔、またはプロトプラスト融合による方法も、SAMBROOK ET AL.、分子クローニング：ラボマニュアル (MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL) (2001)、に記載のように使用できる。酵母宿主細胞は、その後、当業者に既知の標準的な方法を使って培養できる。

10

【0367】

異種のタンパク質を酵母宿主細胞中で発現させる他の方法は、当業者に既知である。一般的には、米国特許公開第20020055169号、米国特許第6,361,969号；同6,312,923号；同6,183,985号；同6,083,723号；同6,017,731号；同5,674,706号；同5,629,203号；同5,602,034号；および同5,089,398号；米国再発行特許第RE37,343号および同RE35,749号；国際公開第99/07862号；同98/37208号；および同98/26080号；欧州特許第EP0946736号；同EP0732403号；同EP0480480号；国際公開第90/10277号；欧州特許第EP0340986号；同EP0329203号；同EP0324274号；および同EP0164556号、を参照されたい。また、Gellissen et al.、ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93；Romanos et al.、YEAST (1992) 8(6):423-488；Goeddel、酵素学の方法 (METHODS IN ENZYMOLOGY) (1990) 185:3-7、も参照されたい。これらはそれぞれ、参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0368】

酵母宿主株は、発酵槽中で当業者には既知の標準的流加回分発酵法を使った増幅段階の間に成長させてもよい。発酵方法は、特定の酵母宿主の炭素利用経路または発現制御モードにおける差異を考慮するように合わせる事ができる。例えば、サッカロミセス酵母宿主の発酵は、単一ブドウ糖供給、複合窒素ソース（例えば、カゼイン加水分解物）、および複数のビタミン補充を要求する可能性がある。対照的に、メチロトロフ酵母P. パストリスは、グリセリン、メタノール、および痕跡のミネラルの供給を要求する可能性があるが、単なるアンモニウム（窒素）塩のみが最適増殖および発現に必要であるに過ぎない。例えば、米国特許第5,324,639号；Elliot et al.、J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95；およびFieschko et al.、BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113、を参照されたい。これら文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【0369】

しかし、このような発酵方法は、採用された酵母宿主株に関係しないある種の共通の特徴を有する。例えば、増殖制限栄養素、通常は炭素、を増幅段階の間に発酵槽に添加し、最大成長を可能とする事ができる。さらに、発酵方法は、通常、適切な量の炭素、窒素、基底塩、リン、および他の少量の栄養素（ビタミン、痕跡のミネラルおよび塩、等）を含むように作られている発酵培地を利用する。ピキアでの使用に適した発酵培地の例は、米国特許第5,324,639号および同5,231,178号に記載されている。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0370】

バキュロウイルス感染昆虫細胞 用語の「昆虫宿主」または「昆虫宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAに対し、レシピエントとして使用可能な、または使用されている昆虫を指す。この用語は、形質移入されている元の昆虫宿主細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、偶発的または意図的変異に起因して、形態学、または

50

ゲノム、または全DNA補体の点で、必ずしも完全に元の親に同じでなくてもよいことは理解されよう。関連特性、例えば、ヌクレオチドレキシシンポリペプチドをコードする配列の存在、を特徴とする親に十分に類似の親細胞の子孫は、この定義で意図される子孫に含まれる。レキシシンポリペプチドのバキュロウイルス発現は、本発明、およびrDNA技術、ポリペプチドまたはその前駆物質の使用に有用である。理由は、レキシシンは、細菌、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母または真菌を含むどのような数の宿主細胞中でも生合成できるからである。本発明の実施形態は、レキシシン、改変レキシシン、レキシシンポリペプチド、またはレキシシン類似体の細菌、酵母または哺乳動物細胞中での生合成を含む。本発明の別の実施形態は、大腸菌または酵母中で行われる生合成を含む。哺乳動物細胞および遺伝子導入動物中での生合成の例は、Hakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127: 59-69, (1997)] に記載されている。

10

【0371】

レキシシンポリペプチドの発現に適した昆虫細胞の選択は、当業者には既知である。いくつかの昆虫種が、当技術分野で十分に記載され、また、市販されており、これには、ネッタイシマカ、カイコ、キイロショウジョウバエ、ヨトウガ、およびイラクサギンウワバが含まれる。発現用昆虫宿主の選択で、適切な宿主には、とりわけ、良好な分泌能力、低タンパク分解活性、および全体頑強性を有することを示すものを含めることができる。昆虫は、通常、種々のソースから入手可能であり、これには、限定されないが、Insect Genetic Stock Center, Department of Bio

20

【0372】

一般的に、バキュロウイルス感染昆虫発現系の成分には、導入ベクター（通常は細菌プラスミド）が含まれ、これは、バキュロウイルスゲノム断片および発現される異種の遺伝子の挿入用の簡便な制限酵素部位の両方；導入ベクター中のバキュロウイルス特異的断片に相同な配列を有する野性型バキュロウイルス（これは、バキュロウイルスゲノム中の異種遺伝子の相同組換えを可能とする）；および適切な昆虫宿主細胞と成長培地、を含む。ベクター構築、細胞への形質移入、プラーク採取、培養による細胞増殖、等に使われる物質、方法および技術は、当技術分野で既知であり、これらの技術を説明したマニュアルを利用可能である。

30

【0373】

異種遺伝子の導入ベクター中への挿入後、ベクターおよび野性型ウイルスゲノムは、昆虫宿主細胞に形質移入され、そこで、ベクターとウイルスゲノムが組み換えられる。パッキングされた組換えウイルスが発現し、組換えプラークが特定され、精製される。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系用の物質および方法は、キット形態で、例えば、Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) から市販されている。これらの技術の一般的な内容は、当業者には既知であり、SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)、中で十分に記載されている。この文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。また、RICHARDSON、分子生物学の39の方法：バキュロウイルス発現プロトコル (39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS) (1995)；AUSUBEL ET AL.、分子生物学の最新プロトコル (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY) 16.9-16.11 (1994)；KING AND POSSEE、バキュロウイルス系：ラボガイド (THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE) (1992)；およびO'REILLY ET AL.、バキュロウ

40

50

イルス発現ベクター：実験マニュアル（BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS：A LABORATORY MANUAL）（1992）、も参照されたい。

【0374】

実際、バキュロウイルス／昆虫細胞発現系を使った種々の異種タンパク質の産生が当業者に知られている。例えば、米国特許第6,368,825号；同6,342,216号；同6,338,846号；同6,261,805号；同6,245,528号；同6,225,060号；同6,183,987号；同6,168,932号；同6,126,944号；同6,096,304号；同6,013,433号；同5,965,393号；同5,939,285号；同5,891,676号；同5,871,986号；同5,861,279号；同5,858,368号；同5,843,733号；同5,762,939号；同5,753,220号；同5,605,827号；同5,583,023号；同5,571,709号；同5,516,657号；同5,290,686号；国際公開第02/06305号；同01/90390号；同01/27301号；同01/05956号；同00/55345号；同00/20032号；同99/51721号；同99/45130号；同99/31257号；同99/10515号；同99/09193号；同97/26332号；同96/29400号；同96/25496号；同96/06161号；同95/20672号；同93/03173号；同92/16619号；同92/02628号；同92/01801号；同90/14428号；同90/10078号；同90/02566号；同90/02186号；同90/01556号；同89/01038号；同89/01037号；同88/07082号、を参照されたい。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0375】

バキュロウイルス／昆虫細胞発現系で有用なベクターは当技術分野で知られており、例えば、バキュロウイルスのオートグラフィカ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス（AcNPV）由来の昆虫発現および導入ベクターを含む。このベクターは、ヘルパー非依存性、ウイルス発現ベクターである。この系由来のウイルス発現ベクターは、通常、強力なウイルスポリヘドリン遺伝子プロモーターを使用し、異種の遺伝子の発現を進行させる。一般的には、O'Reilly ET AL.、バキュロウイルス発現ベクター：実験マニュアル（BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS：A LABORATORY MANUAL）（1992）、を参照されたい。

【0376】

外部遺伝子のバキュロウイルスゲノムへの挿入の前に、プロモーター、リーダー（必要に応じ）、対象コード配列、および転写終止配列を含む上述の成分が、通常、中間転移構築物（導入ベクター）として組み上げられる。中間転移構築物は、細菌等の宿主中で安定な維持が可能なレプリコン、例えば、染色体外の配列（例えば、プラスミド）中で維持されることが多い。レプリコンは、複製系を有し、従って、クローニングおよび増幅のための適切な宿主中で維持されることを可能とする。さらに具体的には、プラスミドは、ポリヘドリンポリアデニル化シグナル（Miller、ANN. REV. MICROBIOL.（1988）42：177）、ならびに原核生物アンピシリン耐性（amp）遺伝子および大腸菌中での選択と増殖用の複製起点を含むことができる。

【0377】

外部遺伝子をAcNPV中に導入するためによく使用される導入ベクターの1つは、pAc373である。当業者に既知の他の多くのベクターも、また、意図されており、例えば、ポリヘドリン開始コドン（ATG）からATTに変更し、ATTから32塩基対下流にBamHIクローニング部位を導入するpVL985が含まれる。Luckow and Summers、VIROLOGY 170：31（1989）、を参照されたい。他の市販のベクターには、例えば、PBlueBac4.5/V5-His；pBlueBacHis2；pMelBac；pBlueBac4.5（Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA）が含まれる。

【0378】

異種遺伝子の挿入後、導入ベクターおよび野性型バキュロウイルスゲノムは昆虫細胞宿主中に同時形質移入される。異種のDNAをバキュロウイルスウィルスの所望の部位に導入する方法は、当技術分野で既知である。SUMMERS AND SMITH、TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETINNO. 1555 (1987) ; Smith et al.、MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156 ; Luckow and Summers、VIROLOGY (1989) 170:31、を参照されたい。例えば、挿入は、遺伝子、例えば、相同二重交差組換えによるポリヘドリン遺伝子 (homologous double crossover recombination) 中へ行ってもよい ; また、挿入は、所望のバキュロウイルス遺伝子中に操作により組み込まれた制限酵素部位中へ行ってもよい。Miller et al.、BIOESSAYS (1989) 11 (4) : 91、を参照されたい。

10

【0379】

トランスフェクションは、電気穿孔で行ってもよい。TROTTER AND WOOD、分子生物学の39の方法 (39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY) (1995) ; Mann and King、J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501、を参照されたい。あるいは、リポソームを使って、昆虫細胞に組換え体発現ベクターおよびバキュロウイルスを移入してもよい。例えば、Liebman et al.、BIOTECHNIQUES (1999) 26 (1) : 36 ; Graves et al.、BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050 ; Nomura et al.、J. BIOL. CHEM. (1998) 273 (22) : 13570 ; Schmidt et al.、PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323 ; Siefert et al.、NATURE GENETICS (1998) 18:45 ; TILKINS ET AL.、細胞生物学：ラボハンドブック (CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK) 145-154 (1998) ; Cai et al.、PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263 ; Dolphin et al.、NATURE GENETICS (1997) 17:491 ; Kost et al.、GENE (1997) 190:139 ; Jakobsson et al.、J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203 ; Rowles et al.、J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (37) : 22376 ; Reverey et al.、J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (39) : 23607-10 ; Stanley et al.、J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121 ; Sisk et al.、J. VIROL. (1994) 68 (2) : 766 ; および Peng et al.、BIOTECHNIQUES (1993) 14 (2) : 274、を参照されたい。市販のリポソームには、例えば、Cellfectin (登録商標) および Lipofectin (登録商標) (Invitrogen、Corp.、Carlsbad、CA) が含まれる。さらに、リン酸カルシウムトランスフェクションを使ってもよい。TROTTER AND WOOD、分子生物学の39の方法 (39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY) (1995) ; Kitts、NAR (1990) 18 (19) : 5667 ; および Mann and King、J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501、を参照されたい。

20

30

40

【0380】

バキュロウイルス発現ベクターは、通常、バキュロウイルスプロモーターを含む。バキュロウイルスプロモーターは、バキュロウイルスRNAポリメラーゼに結合可能な、およびコード配列 (例えば、構造遺伝子) のmRNAへの下流 (3') 方向転写の開始が可能ないずれかのDNA配列である。プロモーターは、転写開始領域を有し、これは、通常、コード配列の5'末端の近位に置かれる。この転写開始領域は、典型的には、RNAポリ

50

メラゼ結合部位および転写開始部位を含む。バキュロウイルスプロモーターは、また、エンハンサーと呼ばれる第2のドメインを持ってもよく、存在する場合には、通常、構造遺伝子に対し遠位にある。さらに、発現は、調節されても、または恒常的であってもよい。

【0381】

感染サイクルの後期に大量に転写された構造遺伝子は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例には、ウイルス多面体タンパク質をコードする遺伝子由来の配列 (FRIESEN ET AL.、バキュロウイルスの分子生物学 (THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES) (1986) 中のバキュロウイルス遺伝子発現の調節 (The Regulation of Baculovirus Gene Expression) ; 欧州特許第EP0127839号および同0155476号) およびp10タンパク質をコードする遺伝子 (Vlak et al.、J. GEN. VIROL. (1988) 69:765) が含まれる。

10

【0382】

新規形成バキュロウイルス発現ベクターは、感染性組換えバキュロウイルス中にパッケージングされ、その後、成長プラークが当業者に既知の技術により精製されうる。Miller et al.、BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMER S AND SMITH、TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)、を参照されたい。

20

【0383】

組換えバキュロウイルス発現ベクターは、いくつかの昆虫細胞中への感染用として開発された。例えば、組換えバキュロウイルスは、特に、ネッタイシマカ (ATCC No. CCL-125)、カイコ (ATCC No. CRL-8910)、キイロショウジョウバエ (ATCC No. 1963)、ヨトウガ、およびイラクサギンウワバ、のために開発された。Wright、NATURE (1986) 321:718; Carbonell et al.、J. VIROL. (1985) 56:153; Smith et al.、MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156、を参照されたい。一般的な内容としては、Fraser et al.、IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225、を参照されたい。さらに具体的には、バキュロウイルス発現ベクター系に使用される細胞株には、通常、限定されないが、Sf9 (ヨトウガ) (ATCC No. CRL-1711)、Sf21 (ヨトウガ) (Invitrogen Corp.、Cat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA))、Tri-368 (イラクサギンウワバ)、およびHigh-Five (登録商標) BTI-TN-5B1-4 (イラクサギンウワバ) が含まれる。

30

【0384】

細胞培地培地は、バキュロウイルス/発現における異種のポリペプチドの直接および融合発現の両方用が市販されており、細胞培養技術は、通常、当業者に既知である。

【0385】

大腸菌、シュドモナス種、および他の原核生物 細菌発現技術は当業者には既知である。細菌宿主での使用のために各種のベクターが利用可能である。ベクターは、単一コピーベクターでも、低または高多コピーベクターであってもよい。ベクターは、クローニングおよび/または発現用として作用してもよい。多くのベクターの市場での入手可能性、およびベクターの制限酵素切断地図および特性の説明マニュアルも含め、これらに関する豊富な文献を考慮すれば、ベクターについての詳細な考察はここでは必要ないであろう。よく知られているように、ベクターは通常、選択を可能とするマーカーを含む。このマーカーは、細胞障害性の薬剤耐性、原栄養性または免疫を付与できる。複数のマーカーが存在し、異なる特性を提供する場合が多い。

40

【0386】

細菌プロモーターは、結合細菌RNAポリメラーゼに結合でき、コード配列 (例えば、

50

構造遺伝子)のmRNAへの下流(3')方向への転写を開始できるいずれかのDNA配列である。プロモーターは、転写開始領域を有し、これは、通常、コード配列の5'末端近くに置かれる。この転写開始領域は、典型的には、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。細菌プロモーターは、また、オペレーターと呼ばれる第2のドメインを持ってよく、これは、RNA合成が始まる位置の隣接RNAポリメラーゼ結合部位とオーバーラップしてもよい。遺伝子サプレッサータンパク質がオペレーターに結合でき、それにより、特異的遺伝子の転写を抑制するので、オペレーターは、負に調節されている(誘導可能)転写を許可する。オペレーター等の負の調節配列が無い場合は、構成的発現が起こりうる。さらに、正の調節は、遺伝子活性化因子タンパク質結合配列により実現でき、これが存在する場合には、通常、RNAポリメラーゼ結合配列に対し近位(5')にある。遺伝子活性化因子タンパク質の例は、異化代謝産物活性化因子タンパク質(CAP)であり、これは、大腸菌(E. coli)中のラックオペロンの転写を開始するのを支援し[Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]、調節発現は、従って、正または負であってよく、それにより、転写を強化または低減化してよい。

【0387】

代謝経路酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例には、糖代謝酵素例えば、ガラクトース、ラクトース(lac)[Chang et al., NATURE (1977) 198:1056]、およびマルトース由来のプロモーター配列が含まれる。追加の例には、生合成酵素、例えば、トリプトファン(trp)由来のプロモーター配列が含まれる[Goeddel et al., NUC. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton et al., NUC. ACIDS RES. (1981) 9:731; 米国特許第4,738,921号; 欧州特許EP Pub. No. 036776および同121775号(参照によって本明細書に組み込まれる)]。β-ガラクトシダーゼ(bla)プロモーター系[インターフェロン(「IFN」)3(Ed. I. Gresser)中のWeissmann(1981)「インターフェロン(「IFN」)のクローニングおよび他の誤り」(The cloning of interferon and other mistakes).]、バクテリオファージラムダPL[Shimatake et al., NATURE (1981) 292:128]およびT5[米国特許第4,689,406号(参照によって本明細書に組み込まれる)]プロモーター系は、また、有用なプロモーター配列を提供する。本発明の好ましい方法では、強力なプロモーター、例えば、T7プロモーターを利用して、レラキシシポリペプチドを高レベルで誘導する。このようなベクターの例は、当業者には既知で、NovagenのpET29シリーズ、および国際公開第99/05297号に記載のpPOPベクターが含まれる。この特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。このような発現系は、宿主細胞生存率または成長パラメータを犠牲にすることなく、宿主中で高レベルのレラキシシポリペプチドを産生する。pET19(Novagen)は、当技術分野で知られているもう一つのベクターである。

【0388】

さらに、天然では発生しない合成プロモーターもまた、細菌プロモーターとして機能する。例えば、1つの細菌またはバクテリオファージプロモーターの転写活性化配列は、別の細菌またはバクテリオファージプロモーターのオペロン配列と連結され、合成ハイブリッドプロモーターを生成できる[米国特許第4,551,433号(参照によって本明細書に組み込まれる)]。例えば、lacプロモーターは、trpプロモーターおよびラックオペロン配列の両方から構成され、ラックプレッサーにより調節されるハイブリッドtrp-ラックプロモーターであり[Amann et al., GENE (1983) 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]、さらに、細菌プロモーターは、細菌RNAポリメラーゼに結合し、転写を開始させる能力を有する非細菌由来天然プロモーターを含むことができる。非細菌由来天然プロモーターは、また、適合するRNAポリメラーゼと結合して、原核生物中

10

20

30

40

50

の一部の遺伝子の高レベルの発現を起こすことができる。バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼ／プロモーター系は、結合したプロモーター系の一例である [Studier et al., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]。さらに、ハイブリッドプロモーターは、また、バクテリオファージプロモーターおよび大腸菌オペレーター領域から構成されてもよい (欧州特許 E P P u b. N o. 2 6 7 8 5 1 号)。

【0389】

機能性プロモーター配列に加えて、効率的リボソーム結合部位も、また、原核生物中の外部遺伝子の発現に有用である。大腸菌では、リボソーム結合部位は、シャイン・ダルガーノ (SD) 配列と呼ばれ、開始コドン (ATG) および開始コドンの 3～11ヌクレオチド上流の位置の 3～9ヌクレオチド長さの配列を含む [Shine et al., NATURE (1975) 254:34]。弱いリボソーム結合部位を有する真核生物遺伝子および原核生物遺伝子を発現させるために [Sambrook et al., 「大腸菌中のクローン化遺伝子の発現」、分子クローニング：実験マニュアル (“Expression of cloned genes in Escherichia coli”, Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 1989]、SD配列は、SD配列と大腸菌 16S rRNA の 3' 末端との間の塩基の対形成により、mRNA のリボソームへの結合を促進すると考えられている [生物学的調節および成長：遺伝子発現 (Ed. R. F. Goldberger, 1979) 中の Steitz et al., 「メッセンジャーRNA中の遺伝子シグナルおよびヌクレオチド配列」]。

【0390】

用語の「細菌宿主」または「細菌宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNA用にレシピエントとして使用できる、または使用されている細菌を指す。この用語は、形質移入されている元の細菌宿主細胞の子孫を含む。単一親細胞の子孫は、偶発的または意図的変異に起因して、形態学、またはゲノム、または全DNA補体の点で、必ずしも完全に元の親に同じでなくてもよいことは理解されよう。関連特性、例えば、ヌクレオチドレキシシポリペプチドをコードする配列の存在、を特徴とする親に十分に類似の親細胞の子孫は、この定義で意図される子孫に含まれる。

【0391】

レキシシポリペプチドの発現に適した宿主細菌の選択は、当業者には既知である。発現用細菌宿主の選択において、適切な宿主には、とりわけ、良好な封入体形成能力、低タンパク分解活性、および全体頑強性を有すると認められるものを含めてもよい。細菌宿主は、通常、種々のソースから入手可能であり、限定されないが、Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); およびアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) (「ATCC」) (Manassas, VA) が含まれる。産業／医薬品発酵は、通常、K株由来細菌 (例えば、W3110) またはB株由来細菌 (例えば、BL21) を使用する。これらの株は、特に、有用である。理由は、それらの成長パラメータは、非常によく知られており、頑強であるからである。さらに、これらの株は、非病原性であり、安全性および環境の理由から、商業的に重要である。適切な大腸菌宿主の他の例には、限定されないが、BL21、DH10Bの株、またはこれらの誘導体が含まれる。本発明の方法の別の実施形態では、大腸菌宿主は、限定されないが、OMP-およびLON-を含むプロテアーゼマイナス株である。宿主細胞株は、限定されないが、蛍光菌、緑膿菌、およびプチダ菌等のシュードモナスの種であってもよい。株MB101と命名されている蛍光菌次亜種1は、組換え型産生に有用であることがわかっており、治療用タンパク質産生プロセスに利用可能である。シュードモナス発現系の例には、The Dow Chemical C

10

20

30

40

50

ompany (Midland、MI:World Wide Webのdow.comで利用可能) から宿主株として入手可能な系が含まれる。

【0392】

組換え宿主細胞株が樹立される(すなわち、発現構築物が宿主細胞中に導入され、適切な発現構築物を有する宿主細胞が単離される)とすぐに、レラキシンポリペプチドの産生に適した条件下で、組換え宿主細胞株が培養される。当業者には明らかなように、組換え宿主細胞株の培養方法は、利用される発現構築物および宿主細胞の固有の特性に依存する。組換え宿主株は、通常、当業者に既知の方法を使って培養される。組換え宿主細胞は、典型的には、炭素、窒素、および無機塩類の同化可能なソース、ならびに、任意選択で、ビタミン、アミノ酸、増殖因子、および当業者に既知の他のタンパク性の培養補充剤を含む液体培地中で培養される。宿主細胞の液体培養培地は、任意選択で、望ましくない微生物の増殖を防ぐための抗生物質または抗真菌剤、および/または、限定されないが、発現ベクター含有宿主細胞を選択するための抗生物質、等の化合物、を含んでもよい。

10

【0393】

組換え宿主細胞は、バッチまたは連続型のいずれかで、細胞採取(レラキシンポリペプチドが細胞内に蓄積する場合に)または培養液上清の採取のいずれかを行って、バッチまたは連続型で培養できる。原核生物宿主細胞中で産生する場合は、バッチ培養および細胞採取が好ましい。

【0394】

本発明のレラキシンポリペプチドは、通常、組換え系で発現後、精製される。レラキシンポリペプチドは、当該技術分野で既知の種々の方法により、宿主細胞から、または培地から精製できる。細菌宿主細胞で産生されたレラキシンポリペプチドは、低い可溶性か、または不溶性(封入体の形で)であってもよい。本発明の一実施形態では、組換え産生タンパク質の溶解度の増加のために選択されるレラキシンポリペプチド中のアミノ酸置換が、本明細書に開示、ならびに当技術分野で既知の方法を使って、容易に行える。不溶性のタンパク質の場合には、タンパク質は、宿主細胞ライセートから遠心分離により集められ、続いて、細胞のホモジナイゼーションを行うことができる。低い可溶性のタンパク質の場合には、限定されないが、ポリエチレンイミン(PEI)、等の化合物が、添加され、部分的に可溶性タンパク質の沈殿を誘導できる。次に、沈殿したタンパク質は、遠心分離を使って都合よく集めることができる。組換え宿主細胞は、破壊するか、またはホモジナイズして、当業者に既知の種々の方法を使って、細胞内から封入体を放出させることができる。宿主細胞破壊またはホモジナイズは、限定されないが、酵素的細胞破壊、超音波処理、Dounceホモジナイゼーション、または高圧放出破壊(high pressure release disruption)等のよく知られた技術を使って行うことができる。本発明の方法の一実施形態では、高圧放出技術を使って大腸菌宿主細胞を破壊し、レラキシンポリペプチドの封入体を放出させる。レラキシンポリペプチドの封入体を取り扱う場合は、可溶化、機械的剪断またはタンパク質分解等の因子による損失を無くして、封入体の収率を最大化するために、繰り返しの際のホモジナイゼーション時間を最小限にするのが都合がよいと思われる。

20

30

【0395】

不溶性または沈殿したレラキシンポリペプチドは、本技術分野で既知のいくつかの適切な可溶化剤を使って可溶化できる。レラキシンポリペプチドは、尿素または塩酸グアニジンを使って可溶化できる。大きなバッチが従来の扱いやすいバッチサイズを使って産生出来るように、可溶化レラキシンポリペプチドの容量は、最小限にすべきである。組換え宿主が数千リットルの容量のバッチで増殖できる場合は、この因子は、大規模商業環境では重要であろう。さらに、大規模商業環境でレラキシンポリペプチドを製造する場合は、特に、ヒトの医薬品用途に対しては、機械や容器、またはタンパク質産物それ自体を損傷する可能性のある強力な薬品は、可能なら避けるべきである。本発明の方法で、より強力な変性剤の塩酸グアニジンの代わりに、より穏やかな変性剤の尿素がレラキシンポリペプチド封入体を可溶化するのに使用できることが示された。尿素の使用は、レラキシンポリペ

40

50

プチド封入体を効率的に可溶化する間にレラキシシポリペプチドの製造および精製プロセスで使用されるステンレス鋼設備に対する損傷のリスクを大きく低減する。

【0396】

可溶性レラキシシタンパク質の場合には、レラキシシは、細胞周辺腔または培地中へ分泌されてもよい。さらに、可溶性レラキシシは、宿主細胞の細胞質中に存在してもよい。精製ステップ実行の前に、可溶性レラキシシを濃縮するのが望ましいと思われる。標準的な方法を使って可溶性レラキシシを、例えば、細胞ライセートまたは培地から濃縮することができる。さらに、当業者に既知の標準的な方法を使って宿主細胞を破壊し、宿主細胞の細胞質または細胞周辺腔から可溶性レラキシシを放出させることができる。

【0397】

レラキシシポリペプチドが、融合タンパク質として産生される場合は、融合配列は除去できる。融合配列の除去は、酵素的または化学的切断により行うことができる。融合配列の酵素的除去は、当業者に既知の方法を使って行うことができる。当業者には明らかなように、融合配列の除去用酵素の選択は、融合の固有の特性により決定され、反応条件は、酵素の選択により特定されるであろう。化学的切断は、限定されないが、臭化シアン、T E Vプロテアーゼ、および他の試薬を含む当業者には既知の試薬を使って行うことができる。切断されたレラキシシポリペプチドは、当業者には既知の方法により切断された融合配列から精製できる。このような方法は、当業者には明らかなように、融合配列およびレラキシシポリペプチドの素性および性質により決定できる。精製方法は、限定されないが、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーもしくは透析またはこれらのいずれかの組み合わせを含んでもよい。

【0398】

レラキシシポリペプチドは、また、精製してタンパク質溶液からDNAを除去できる。DNAは、当技術分野で既知のいずれかの適切な方法、例えば、沈殿反応またはイオン交換クロマトグラフィー等、により除去でき、限定されないが、プロタミン硫酸塩等の核酸沈殿剤を使って沈殿により除去してもよい。レラキシシポリペプチドは、限定されないが、遠心分離または濾過、等の標準的な、よく知られた方法を使って、沈殿したDNAから分離できる。レラキシシポリペプチドがヒトの治療のために使用され、本発明の方法により宿主細胞DNAを薬学的に許容可能なレベルに減らす環境では、宿主核酸分子の除去は重要な因子である。

【0399】

限定されないが、発酵槽、振盪フラスコ、流動層バイオリアクター、中空糸バイオリアクター、ローラーボトルカルチャーシステム、および攪拌槽バイオリアクターシステム等の小規模または大規模発酵のための方法は、タンパク質発現にも使用可能である。これらの方法のそれぞれは、バッチ、流加バッチ、または連続モードプロセスで行うことができる。

【0400】

本発明のヒトレラキシシポリペプチドは、通常、当技術分野で標準的な方法を使って回収できる。例えば、培地または細胞ライセートは、遠心分離または濾過して、細胞性壊死組織片を除去できる。上清は、濃縮または希釈して、所望の容量にしてもよく、または適切な緩衝液中に透析濾過し、さらなる精製用の準備を整えてもよい。本発明のレラキシシポリペプチドのさらなる精製は、インタクト型からの脱アミドおよび短縮された形のレラキシシポリペプチド変異体の分離を含む。

【0401】

下記の代表的方法のいずれかは、本発明のレラキシシポリペプチドの精製に採用できる：親和性クロマトグラフィー；陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー（限定されないが、D E A Eセファロースを使って）；シリカクロマトグラフィー；高速液体クロマトグラフィー（H P L C）；逆相H P L C；ゲル濾過（限定されないが、セファデックスG-75を使って）；疎水性相互作用クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー；金属キレートクロマトグラフィー；限外濾過／透析濾過；エタノール沈殿；硫酸ア

ンモニウム沈殿法；等電点電気泳動；置換クロマトグラフィー；電気泳動的法（限定されないが、分取等電点電気泳動）、差分溶解度（限定されないが、硫酸アンモニウム沈殿法を含む）、SDS-PAGE、または抽出。

【0402】

限定されないが、非天然アミノ酸含有タンパク質、非天然アミノ酸含有ペプチド、非天然アミノ酸含有タンパク質に対する抗体、非天然アミノ酸含有タンパク質の結合相手、等の本発明のタンパク質は、当業者に既知の標準的方法に従って、部分的に、または実質的に均質に精製できる。従って、本発明のポリペプチドは、当業者に既知のいくつかの方法により、回収および精製できる。これらの方法には、限定されないが、下記のいずれかの方法が含まれる：アンモニウム硫酸塩またはエタノール沈殿、酸または塩基抽出、カラムクロマトグラフィー、アフィニティカラムクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法、等。タンパク質リフォールディングステップは、所望通りの適切な折り畳みの成熟タンパク質を作るのに使用できる。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、親和性クロマトグラフィー、または他の適切な方法が、高純度が望まれる最終精製ステップで使用可能である。一実施形態では、非天然アミノ酸（または非天然アミノ酸含有タンパク質もしくはペプチド）に対し作られた抗体は、限定されないが、親和性に基づく1つまたは複数の非天然アミノ酸を含むタンパク質またはペプチドの精製のために、精製剤として使用される。所望通りに部分的または均質に精製されるとすぐに、ポリペプチドが、限定されないが、アッセイ成分、治療薬、予防薬、診断薬、研究試薬、および／または抗体産生用免疫原として、任意選択で各種の用途に使用される。本発明のポリペプチドに対して精製された抗体は、ルーチンプロトコルを使って、ポリペプチドまたはエピトープ含有断片、または細胞を、動物、好ましくは非ヒト動物へ投与することにより得ることができる。当業者なら、種々の既知の技術を使って抗体を生成できるであろう。また、遺伝子導入マウス、または他の哺乳動物を含む他の生物が、ヒト化抗体の発現に使用できる。上述の抗体は、ポリペプチドを発現しているクローンの単離もしくは特定またはポリペプチドの精製に採用可能である。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、疾患の治療に採用可能である。

【0403】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、また、ワクチン剤としても使用できる。従って、さらなる態様では、本発明は、例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞障害性T細胞を含む抗体および／またはT細胞免疫応答の生成に十分な、また、疾患が既に個体中で定着しているか否かにかかわらず、前記動物を疾患から保護するのに十分な、本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含む、哺乳動物で免疫応答を誘導する方法に関する。哺乳動物の免疫応答は、また、このような免疫応答をインビボで誘導し、本発明の疾患から前記動物を保護する抗体を産生するために、ポリヌクレオチドの発現を指示し、ポリペプチドをコードするベクターを介して本発明のポリペプチドの送達を含む方法により誘導できる。ベクター投与の1つの方法は、粒子上のコーティングとして、または他の方法で加速して所望の細胞中に入れることである。このような核酸ベクターは、DNA、RNA、改変核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含んでもよい。ワクチンとしての試料には、ポリペプチドまたは核酸ベクターが、通常、ワクチン製剤（組成物）として提供されることになる。製剤は、適切なキャリアーをさらにも含む。ポリペプチドは、胃で破碎される可能性があるため、非経口的に（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射で）投与されてもよい。非経口投与に適した製剤は、抗酸化剤を含んでもよい水性または非水性無菌注射溶液、緩衝液、静菌薬およびレシピエントの血液と等張性の製剤を形成する溶質；および懸濁剤または糊料を含んでもよい水性および非水性の無菌の懸濁液、を含む。ワクチン製剤は、また、当業者に既知の製剤の免疫原性を高めるアジュバント系を含んでもよい。投与量は、ワクチンの特異的活性に依存するが、ルーチン実験により容易に決定できるであろう。

【0404】

代替系による発現

非組換え宿主細胞、辺誘発宿主細胞、または無細胞系中のタンパク質に、非天然アミノ酸を導入するいくつかの戦略が採用されている。これらの系は、また、本発明のレラキシンポリペプチドの作製に使用するのに適する。反応性側鎖、例えば、Lys、CysおよびTyrを使ったアミノ酸の誘導体化は、リシンのN²-アセチルリシンへの変換に繋がる。化学合成は、また、非天然アミノ酸を組み込むための直接的方法を提供する。最近の酵素連結反応およびネイティブ化学ペプチド断片ライゲーションの開発により、さらに大きなタンパク質の作製が可能となっている。例えば、P. E. Dawson and S. B. H. Kent、Annu. Rev. Biochem、69:923 (2000)、を参照されたい。化学的ペプチド連結反応およびネイティブ化学ライゲーションは、米国特許第6,184,344号、米国特許公開第2004/0138412号、同2003/0208046号、国際公開第02/098902号、および同03/042235号に記載されている。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。所望の非天然アミノ酸で化学的にアシル化されたサブプレッサーtRNAが、タンパク質生合成を支援できるインビトロ抽出物に添加されている一般的なインビトロ生合成方法を使って、100を超える非天然アミノ酸が、実質的に任意のサイズの種々のタンパク質中に部位特異的に組み込まれている。例えば、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、非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込みの一般的方法 (A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins)、Science 244:182-188 (1989)；および、J. D. Bain、C. G. Glabe、T. A. Dix、A. R. Chamberlin、E. S. Dimala、非天然アミノ酸のポリペプチドへの生合成による部位特異的組み込み (Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide)、J. Am. Chem. Soc. 111:8013-8014 (1989)、を参照されたい。タンパク質安定性、タンパク質折り畳み、酵素機序、およびシグナル伝達の調査のために、様々な官能基がタンパク質中に組み込まれている。

【0405】

本明細書に記載の他の文献に加えて、種々の精製／タンパク質折り畳み方法が当業者に既知であり、これらには、限定されないが、下記のものが含まれる：R. Scopes、タンパク質精製 (Protein Purification)、Springer-Verlag、N. Y. (1982)；Deutscher、酵素学の方法 (Methods in Enzymology) Vol. 182:タンパク質精製ガイド (Guide to Protein Purification)、Academic Press、Inc. N. Y. (1990)；Sandana、(1997)タンパク質の生物学的分離 (Bioseparation of Proteins)、Academic Press、Inc.；Bollag et al. (1996)タンパク質の方法 (Protein Methods)、2nd Edition Wiley-Liss、NY；Walker、(1996)タンパク質プロトコルハンドブック (The Protein Protocols Handbook)、Humana Press、NJ、Hams and Angal、(1990)タンパク質精製の適用：実践的手法 (Protein Purification Applications: A Practical Approach)、IRL Press at Oxford、Oxford、England；Harris and Angal、タンパク質の精製方法：実践的手法 (Protein Purification Methods: A Practic

10

20

30

40

50

al Approach)、IRL Press at Oxford、Oxford、England; Scopes、(1993)、タンパク質精製：原理と実践 (Protein Purification: Principles and Practice) 3rd Edition Springer Verlag、NY; Janson and Ryden、(1998) タンパク質精製：原理、高精度法と適用 (Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications)、Second Edition Wiley-VCH、NY; および Walker (1998)、タンパク質プロトコル (Protein Protocols) (CD-ROM) Humana Press、NJ; およびそれらの中で引用されている文献。

10

【0406】

真核生物宿主細胞または非真核生物宿主細胞中の非天然アミノ酸を有する対象タンパク質またはポリペプチドを産生する利点の1つは、通常、タンパク質またはポリペプチドが、本来の高次構造に折り畳まれる点にある。しかし、特定の本発明実施形態では、当業者は、合成、発現および／または精製後、タンパク質またはペプチドが、所望の関連ポリペプチド高次構造とは異なる高次構造を持つ可能性があることに気付くであろう。本発明の一態様では、発現タンパク質またはポリペプチドは、任意選択で、変性され、その後、還元される。これは、当技術分野で既知の方法を利用して行うことができ、この方法には、限定されないが、対象タンパク質またはポリペプチドにシャペロニンを添加する、タンパク質を不安定化薬剤、例えば、グアニジンHCl中で可溶化する、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを利用する、等の方法が含まれる。

20

【0407】

一般的に、発現ポリペプチドを変性させ、還元して、その後、ポリペプチドを好ましい高次構造にリフォールディングさせるのが望ましい場合もある。例えば、グアニジン、尿素、DTT、DTE、および／またはシャペロニンを、対象翻訳産物に添加してもよい。タンパク質の還元、変性および還元方法は、当業者には既知である（上記文献、および Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem.、268:14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem.、4:581-585; および Buchner, et al.、(1992) Anal. Biochem.、205:263-270、を参照）。例えば、Debinski, et al.、は、グアニジン-DTE中の封入体タンパク質の変性および還元について記載している。タンパク質は、限定されないが、酸化グルタチオンおよびL-アルギニン等のレドックス緩衝液中でリフォールディングできる。リフォールディング試薬は、流し込んでまたは他の方法で1つまたは複数のポリペプチドまたは他の発現産物と接触させることができ、逆の方法も可能である。

30

【0408】

原核生物のレラキシンポリペプチド産生の場合は、産生されたレラキシンポリペプチドは、ミスフォールドされている可能性があり、従って、生物活性が無い、または低下している。タンパク質の生物活性は、「リフォールディング」により回復できる。一般的に、ミスフォールディングレラキシンポリペプチドは、例えば、1つまたは複数のカオトロピック剤（例えば、尿素および／またはグアニジン）およびジスルフィド結合を還元できる還元剤（例えば、ジチオトレイトール、DTTまたは2-メルカプトエタノール、2-ME）を使った、ポリペプチド鎖の可溶化（レラキシンポリペプチドが、また、不溶性ある場合）、アンフォールディングおよび還元によりリフォールディングされる。次に、中等度の濃度のカオトロブで、酸化剤（例えば、酸素、シスチンまたはシスタミン）が添加され、これによりジスルフィド結合の再構成が可能となる。レラキシンポリペプチドは、当技術分野で既知の標準的方法、例えば、米国特許第4,511,502号、同4,511,503号、および同4,512,922号、に記載の方法を使ってリフォールディングされる。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。レラキシンポリペプチドは、また、他のタンパク質と同時フォールディングされ、ヘテロダイマーまたはヘ

40

50

テロマルチマーを形成できる。

【0409】

リフォールディング後、レラキシンは、さらに精製されてもよい。レラキシンの精製は、当業者に既知の種々の技術を使って行うことができ、これには、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー等、またはこれらの任意の組み合わせが含まれる。さらなる精製には、また、精製されたタンパク質の乾燥または沈殿ステップを含んでもよい。

【0410】

精製後、レラキシンは、異なる緩衝液に取り替えてもよく、および／または限定されないが、透析濾過および透析を含む当技術分野で既知の種々の方法のいずれかにより濃縮してもよい。単一の精製されたタンパク質として提供されているレラキシンは、凝集および沈殿しがちである。

【0411】

精製されたレラキシンは、少なくとも90%純粋（逆相高速液体クロマトグラフィー、RP-HPLC、またはナトリウムドデシル硫酸塩-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、SDS-PAGEで測定して）または少なくとも95%純粋、または少なくとも98%純粋、または少なくとも99%以上純粋であってもよい。正確なレラキシンの純度の数値に関わらず、レラキシンは、医薬品としての使用、またはさらなるプロセッシング、例えば、PEG等の水溶性ポリマーとのコンジュゲーション用の使用にとって、十分に純粋である。

【0412】

特定のレラキシン分子は、他の有効成分またはタンパク質（賦形剤、キャリアー、および安定剤、血清アルブミン、等以外の）が無い場合は、治療薬として使用可能であり、または、別のタンパク質またはポリマーと複合化してもよい。

【0413】

一般的精製方法 種々の単離ステップのいずれか1つは、細胞ライセート、抽出物、培地、封入体、宿主細胞の細胞周辺腔、宿主細胞の細胞質、または他のレラキシンポリペプチド含有物質に対して、または、限定されないが、下記を含むいずれかの単離ステップから得られた任意のレラキシンポリペプチドに対して行うことができる：親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）、逆相HPLC（「RP-HPLC」）、拡張吸着流動床、またはいずれかの組み合わせおよび／またはそれらの、任意の適切な順での繰り返し。

【0414】

本明細書記載の技術を実行する際に使われる設備および他の必要な材料は、市販されている。ポンプ、フラクションコレクター、モニター、レコーダー、および全体システムは、例えば、Applied Biosystems（Foster City, CA）、Bio-Rad Laboratories, Inc.（Hercules, CA）、およびAmersham Biosciences, Inc.（Piscataway, NJ）から入手可能である。限定されないが、交換基質材料、メディア、および緩衝液等のクロマトグラフ用材料は、また、このような会社から入手可能である。

【0415】

本明細書記載のカラムクロマトグラフィープロセスの平衡化、および他のステップ、例えば、洗浄および溶出は、特殊な設備、例えば、ポンプを使って、より高速に行うことができる。市販のポンプには、限定されないが、HILoad（登録商標）ポンプP-50、蠕動ポンプP-1、ポンプP-901、およびポンプP-903（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）が含まれる。

【0416】

フラクションコレクターの例には、RediFracフラクションコレクター、FRA

10

20

30

40

50

C-100およびFRAC-200フラクションコレクター、ならびにSUPERFRAC（登録商標）フラクションコレクター（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）が含まれる。ミキサーも入手可能で、pHおよび線形濃度勾配を形成できる。市販のミキサーには、勾配ミキサーGM-1およびインラインミキサー（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）が含まれる。

【0417】

クロマトグラフィープロセスは、任意の市販のモニターを使ってモニターできる。このようなモニターは、UV、pH、および伝導度等の情報を集めるために使用できる。検出器の例には、モニターUV-1、UVICORD（登録商標）SII、モニターUV-MII、モニターUV-900、モニターUPC-900、モニターpH/C-900、および伝導度モニター（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）が含まれる。実際、Amersham Biosciences（Piscataway、NJ）から種々のAKTA（登録商標）システム、を含む全体システムが、市販されている。

10

【0418】

本発明一実施形態では、例えば、レラキシシポリペプチドが還元されて、最初に得られた精製レラキシシポリペプチドは、尿素中での変性により変性され、続けて、還元剤（例えば、DTT）を含むトリス緩衝液中に適切なpHで希釈することができる。別の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、尿素中で約2M～約9Mの濃度範囲で変性され、続けて、pH、約5.0～約8.0の範囲のトリス緩衝液中で希釈される。本実施形態のリフォールディング混合物は、次に、インキュベートできる。一実施形態では、リフォールディング混合物は、室温で、4～24時間インキュベートされる。還元および変性されたレラキシシポリペプチド混合物は、次に、さらに単離または精製されてもよい。

20

【0419】

本明細書で述べたように、最初のレラキシシポリペプチド混合物のpHは、いずれかの後の単離ステップの実施の前に調節してもよい。さらに、最初のレラキシシポリペプチド混合物またはいずれかの後工程のその混合物は、当技術分野で既知の技術で濃縮できる。さらに、最初のレラキシシポリペプチド混合物またはいずれかの後工程のその混合物を含む溶出緩衝液は、当業者に既知の技術を使って、次の単離ステップに適した緩衝液と交換できる。

30

【0420】

イオン交換クロマトグラフィー一実施形態および任意選択としての追加のステップでは、イオン交換クロマトグラフィーを、最初のレラキシシポリペプチド混合物に対し行うことができる。一般的なイオン交換クロマトグラフィーについては：原理と方法（PRINCIPLES AND METHODS）（Cat. No. 18-1114-21、Amersham Biosciences（Piscataway、NJ））、を参照されたい。市販のイオン交換カラムには、HITRAP（登録商標）、HIPREP（登録商標）、およびHILOAD（登録商標）カラム（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）、が含まれる。このようなカラムは、強陰イオン交換体、例えば、Qセファロース（登録商標）Fast Flow、Qセファロース（登録商標）High Performance、およびQセファロース（登録商標）XL；強陽イオン交換体、例えば、SPセファロース（登録商標）High Performance、SPセファロース（登録商標）Fast Flow、およびSPセファロース（登録商標）XL；弱陰イオン交換体、例えば、DEAEセファロース（登録商標）Fast Flow；および弱陽イオン交換体、例えば、CMセファロース（登録商標）Fast Flow（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）を利用している。陰イオンまたは陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、実質的に精製されたレラキシシポリペプチドを単離する精製プロセスの各ステージでレラキシシポリペプチドに対し実施できる。陽イオン交換クロマトグラフィーステップは、いずれか

40

50

の適切な陽イオン交換基質を使って行うことができる。有用な陽イオン交換基質には、限定されないが、繊維質、多孔性、非多孔性、微粒性、ビーズ状、または架橋陽イオン交換基質材料が含まれる。このような陽イオン交換基質材料には、限定されないが、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリラート、ポリビニル、ポリスチレン、シリカ、ポリエーテル、または前出のいずれかの複合材が含まれる。

【0421】

陽イオン交換基質は、強および弱陽イオン交換体を含むいずれかの適切な陽イオン交換体であってよい。強陽イオン交換体は、広範なpH領域でイオン化したまま残ることができる。従って、広いpH領域にわたってレキサシンに結合できる。弱陽イオン交換体は、しかし、pHに応じて、イオン化を失う可能性がある。例えば、弱陽イオン交換体は、約pH 4またはpH 5以下になると、pH機能として電荷を失う可能性がある。適切な強陽イオン交換体は、限定されないが、荷電官能基、例えば、スルホプロピル（SP）、メチルスルホナート（S）、またはスルホエチル（SE）を含む。陽イオン交換基質は、好ましくは、約2.5～約6.0のレキサシン結合pH領域を有する強陽イオン交換体であってよい。あるいは、強陽イオン交換体は、約pH 2.5～約pH 5.5のレキサシン結合pH領域を有してもよい。陽イオン交換基質は、約3.0のレキサシン結合pHを有する強陽イオン交換体であってよい。あるいは、陽イオン交換基質は、好ましくは、約6.0～約8.0のレキサシン結合pH領域を有する強陽イオン交換体であってよい。陽イオン交換基質は、好ましくは、約8.0～約12.5のレキサシン結合pH領域を有する強陽イオン交換体であってよい。あるいは、強陽イオン交換体は、約pH 8.0～約pH 12.0のレキサシン結合pH領域を有してもよい。

【0422】

レキサシンのロードの前に、陽イオン交換基質は、例えば、カラムの数倍量の希釈した弱酸、例えば、pH 3のカラム4倍量の20mM酢酸を使って平衡化できる。平衡化後、レキサシンを添加し、ここでも、弱酸溶液、例えば、弱酢酸またはリン酸溶液を使って、実質的に精製されたレキサシンの溶出の前に、カラムを1～数回洗浄できる。例えば、カラム約2～4倍量のpH 3の20mM酢酸を、カラムの洗浄に使用できる。例えば、pH 5.5の0.1M塩化ナトリウムと混合した、カラム2～4倍量のpH 5.5の0.05M酢酸ナトリウム、または0.05M酢酸ナトリウムを使ったさらなる洗浄剤も使用可能である。あるいは、当技術分野で既知の方法を使い、陽イオン交換基質を、カラムの数倍量の希釈した弱塩基を使って平衡化できる。

【0423】

あるいは、実質的に精製されたレキサシンは、レキサシンを基質から置換するために、陽イオン交換体基質を充分低いpHまたはイオン強度を有する緩衝液と接触させることにより溶出できる。溶出緩衝液のpHは、約pH 2.5～約pH 6.0の範囲であってもよい。さらに具体的には、溶出緩衝液のpHは、約pH 2.5～約pH 5.5、約pH 2.5～約pH 5.0の範囲であってもよい。溶出緩衝液は、約3.0のpHを有してもよい。さらに、溶出緩衝液の量は、広範に変動してもよく、一般的には、約2～約10カラム容量の範囲であろう。

【0424】

レキサシンポリペプチドの陽イオン交換体基質に吸着後、実質的に精製されたレキサシンポリペプチドを、レキサシンポリペプチドを基質から置換するのに充分に高いpHまたはイオン強度を有する緩衝液と接触させることにより溶出できる。実質的に精製されたレキサシンポリペプチドの高pH溶出に使用する適切な緩衝液には、限定されないが、少なくとも約5mM～少なくとも約100mMの濃度範囲のクエン酸塩、リン酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、HEPES、およびMES緩衝液を含むことができる。

【0425】

逆相クロマトグラフィー 当業者に既知の適切なプロトコルを使ってタンパク質を精製するためにRP-HPLCを行うことができる。例えば、Pearson et al., ANAL BIOCHEM. (1982) 124: 217-230 (1982); Ri

10

20

30

40

50

vier et al.、J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani et al.、J. CHROM. (1986) 359:391-402、を参照されたい。実質的に精製されたレキシシポリペプチドを単離するために、レキシシポリペプチドに対しRP-HPLCを行うことができる。この際に、限定されないが、少なくとも約C3～少なくとも約C30、少なくとも約C3～少なくとも約C20、または少なくとも約C3～少なくとも約C18の樹脂を含む各種の長さのアルキル官能性を有するシリカ誘導体化樹脂が使用できる。あるいは、高分子樹脂が使用できる。例えば、TosoHaas Amberchrome CG1000sd樹脂が使用可能で、これは、スチレンポリマー樹脂である。各種のアルキル鎖長のシアノまたは高分子樹脂もまた、使用できる。さらに、RP-HPLCカラムは、溶媒、例えば、エタノールで洗浄できる。Source RPカラムは、RP-HPLCカラムのもう一つの例である。

10

【0426】

イオン対形成剤および有機修飾剤、例えば、メタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、アセトニトリルまたはエタノールを含む適切な溶出緩衝液を、RP-HPLCカラムからレキシシポリペプチドを溶出するのに使用できる。最もよく使われるイオン対形成剤には、限定されないが、酢酸、ギ酸、過塩素酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、ヘptaフルオロ酪酸、トリエチルアミン、テトラメチルアンモニウム、テトラブチルアンモニウム、および酢酸トリエチルアンモニウム、が含まれる。溶出は、1つまたは複数の勾配または均一濃度条件を使って行うことができるが、分離時間を短くし、ピーク幅を減らすためには勾配条件が好ましい。別の方法は、異なる溶媒濃度範囲の2つの勾配の使用を含む。本明細書での使用のための適切な溶出緩衝液の例には、限定されないが、酢酸アンモニウムとアセトニトリル溶液を含んでもよい。

20

【0427】

疎水性相互作用クロマトグラフィー精製技術

レキシシポリペプチドに対し、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を行うことができる。一般的な説明は、疎水性相互作用クロマトグラフィーハンドブック：原理と方法(HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS)(Cat. No. 18-1020-90、Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)を参照されたい。本文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。適切なHIC基質には、限定されないが、アガロース、架橋アガロース、セファロース、セルロース、シリカ、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタクリルラート)基質を含むアルキルまたはアリアル置換基質、例えば、ブチル、ヘキシル、オクチルまたはフェニル置換基質、および限定されないが、ポリエチレンアミン樹脂またはブチルもしくはフェニル置換ポリ(メタクリルラート)基質を含む混合モード樹脂を含んでもよい。疎水性の相互作用カラムクロマトグラフィー用市販のソースには、限定されないが、HITRAP(登録商標)、HIPREP(登録商標)、およびHILOAD(登録商標)カラム(Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)が含まれる。

30

【0428】

簡単に説明すると、ロードの前に、HICカラムは、当業者に既知の標準的緩衝液、例えば、酢酸／塩化ナトリウム溶液またはアンモニウム硫酸塩含有HEPESを使って平衡化できる。アンモニウム硫酸塩は、HICカラムにロードのための緩衝液として使用可能である。レキシシポリペプチドをロード後、次に、カラムを、望ましくない物質を除き、HICカラム上のレキシシポリペプチドを保持できる標準的緩衝液と条件を使って洗浄できる。レキシシポリペプチドは、カラムの約3～約10倍量の標準的緩衝液、例えば、EDTAおよび平衡化緩衝液よりも低いアンモニウム硫酸塩濃度を含むHEPES緩衝液、または特に酢酸／塩化ナトリウム緩衝液で、溶出できる。また、例えば、カリウムリン酸塩勾配を使った線形減少塩勾配を、使ってレキシシ分子を溶出できる。次に、溶出剤は、例えば、濾過、例えば、透析濾過または限外濾過により濃縮することができる。透析濾過は、レキシシポリペプチドを溶出するのに使用した塩を除去するために使用で

40

50

きる。

【0429】

他の精製技術 例えば、ゲル濾過（ゲル濾過：原理と方法（GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS）（Cat. No. 18-1022-18、Amersham Biosciences、Piscataway、NJ）（参照によって本明細書に組み込まれる）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（適切な基質には、限定されないが、HA-Ultrogel、High Resolution（Calbiochem）、CHTセラミックヒドロキシアパタイト（BioRad）、Bio-Gel HTPヒドロキシアパタイト（BioRad）が含まれる）、HPLC、拡張吸着流動床、限外濾過、透析濾過、凍結乾燥、等、を使ったさらに別の単離ステップを、最初のレキシシポリペプチド混合物またはいずれかの後工程のその混合物に対し、いずれかの過剰塩を除去し、次の単離ステップまたは最終製品の製剤に対して緩衝液を適切な緩衝液で置換するために、行うことができる。

10

【0430】

当業者に既知の技術を使って、本明細書記載の各ステップで、実質的に精製されたレキシシポリペプチドを含むレキシシポリペプチドの収率を、モニターできる。このような技術は、また、最後の単離ステップ後の実質的に精製されたレキシシポリペプチドの収率を評価するために使うことができる。例えば、レキシシポリペプチドの収率は、いくつかの種々のアルキル鎖長を有する逆相高压液体クロマトグラフィーカラム、例えば、シアノRP-HPLC、C18RP-HPLC；ならびに陽イオン交換HPLCおよびゲル濾過HPLCのいずれかを使ってモニターできる。

20

【0431】

本発明の具体的実施形態では、各精製ステップ後のレキシシの収率は、各精製ステップに対し、出発材料中のレキシシの少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.9%、または少なくとも約99.99%、でありうる。

30

【0432】

純度は、標準的な方法、例えば、SDS-PAGEを使って、またはウェスタンブロットおよびELISAアッセイを使ってレキシシポリペプチドを測定することにより決定できる。例えば、ポリクローナル抗体は、負の制御酵母発酵および陽イオン交換回収から単離されたタンパク質に対して生成させることができる。抗体は、また、混入宿主細胞タンパク質の存在を検出するために使用できる。

【0433】

RP-HPLC材料のVydac C4（Vydac）は、シリカゲル粒子を含み、その表面は、C4-アルキル鎖を保持している。タンパク性不純物からのレキシシポリペプチドの分離は、疎水性の相互作用の強度の差異に基づいている。溶出は、希釈トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配を使って行われる。分取HPLCは、ステンレス鋼カラム（2.8~3.2LのVydac C4シリカゲルを充填）を使って行われる。ヒドロキシアパタイトUltrogel溶出液は、トリフルオロ酢酸を添加して酸性化され、Vydac C4カラムにロードされる。洗浄と溶出には、希釈トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配が使用される。画分が集められ、直ちにリン酸塩緩衝液で中和される。IPCの許容限度内にあるレキシシポリペプチド画分がプールされる。

40

【0434】

DEAEセファロース（Pharmacia）材料は、ジエチルアミノエチル（DEAE）基から構成され、これは、セファロースビーズの表面に教論結合している。レキシシポリペプチドのDEAE基への結合は、イオン相互作用により媒介される。アセトニト

50

リルおよびトリフルオロ酢酸は、保持されることなくカラムを通過する。これらの物質が洗い流された後、痕跡の不純物は、低pHの酢酸塩緩衝液を使ってカラムを洗浄することにより除去される。次に、カラムが中性のリン酸塩緩衝液で洗浄され、レラキシンポリペプチドが高められたイオン強度の緩衝液で溶出される。カラムにDEAE Sepharose fast flowを充填する。カラム容量は、3~10mgレラキシンポリペプチド/mlゲルの範囲のレラキシンポリペプチドのロードになるように調整される。カラムは、水および平衡化緩衝液（ナトリウム／カリウムリン酸塩）で洗浄される。HPLC溶出液のプールされた画分がロードされ、カラムが平衡化緩衝液で洗浄される。次に、カラムが洗浄緩衝液（酢酸ナトリウム緩衝液）で洗浄され、続いて、平衡化緩衝液で洗浄される。その後、レラキシンポリペプチドが溶出緩衝液（塩化ナトリウム、ナトリウム／カリウムリン酸塩）を使ってカラムから溶出され、マスター溶出プロファイルに基づいて単一画分に集められる。DEAEセファロースカラムの溶出液は、指定伝導度に調節される。得られた医薬品有効成分は、無菌濾過され、テフロンボトルに入れて、-70℃で貯蔵される。

10

【0435】

採用できるさらなる方法には、限定されないが、エンドトキシンを除去するステップが含まれる。エンドトキシンは、グラム陰性宿主細胞、例えば、大腸菌の外膜上に存在するリポ多糖類（LPS）である。エンドトキシンレベルを低減する法王は当業者には既知であり、限定されないが、シリカ担体、ガラス粉末またはヒドロキシアパタイト、逆相、親和性、サイズ排除、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、これらの方法の組み合わせ、等を使った精製技術が含まれる。混入物、例えば、対象ポリペプチド由来の共遊走タンパク質を除去するには、変更されたまたは追加の方法が必要となる可能性がある。エンドトキシンレベルの測定方法は、当業者には既知であり、限定されないが、リムルスアメボサイトライセート（LAL）アッセイが含まれる。Endosafe（登録商標）-PTSアッセイは、ハンドヘルド分光光度計に加えて、LAL試薬、発色基質、および対照標準エンドトキシンを予めロードしたカートリッジを利用する比色、シングルチューブシステムである。代替方法には、限定されないが、96ウェルフォーマットを使用する比濁法であるカイネティックLAL法が含まれる。

20

【0436】

各種の方法および手続きを使って、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンタンパク質の収率と純度を評価することができ、限定されないが、これらには、Bradfordアッセイ、SDS-PAGE、銀染色SDS-PAGE、クーマシー染色SDS-PAGE、質量分析（限定されないが、MALDI-TOFを含む）および当業者には既知のタンパク質を特徴付ける他の方法が含まれる。

30

【0437】

さらなる方法には、限定されないが、以下の方法が含まれる：タンパク質染色方法と組み合わせたSDS-PAGE、イムノブロットング、マトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）、液体クロマトグラフィー／質量分析、等電点電気泳動、分析用陰イオン交換、等電点電気泳動、および円偏光二色性。

【0438】

40

選択圧組込みと呼ばれるインビボ法は、野性型シンテターゼの無差別性を活用するために開発された。例えば、N. Budisa、C. Minks、S. Alefelder、W. Wenger、F. M. Dong、L. Moroder and R. Huber、FASEB J.、13:41（1999）、を参照されたい。細胞に特定の天然アミノ酸を供給する重要な代謝経路が遮断されている栄養要求株は、わずかの濃度の天然アミノ酸を含む最少培地中で成長するが、一方、標的遺伝子の転写は抑制されている。定常増殖相の発生で、天然アミノ酸が枯渇し、非天然アミノ酸類似体で置換される。組換えタンパク質の発現の誘導により、非天然類似体を含むタンパク質の蓄積がもたらされる。例えば、この戦略を使って、o、mおよびp-フルオロフェニルアラニンがタンパク質中に組み込まれ、UVスペクトル中に、容易に特定できる2つの特徴的ショルダーを示す。例えば

50

、C. Minks、R. Huber、L. Moroder and N. Budisa、*Anal. Biochem.*、284:29(2000)を参照；トリフルオロメチオンは、バクテリオファージT4リゾチーム中のメチオニンを置換し、キトオリゴ糖リガンドとの交互作用を ^{19}F NMRで調査するために使用された。例えば、H. Duewel、E. Daub、V. Robinson and J. F. Honek、*Biochemistry*、36:3404(1997)を参照；さらにトリフルオロロイシンは、ロイシンの代わりに組み込まれ、ロイシンジッパータンパク質の熱的および化学的安定性の増加に繋がっている。例えば、Y. Tang、G. Ghirlanda、W. A. Petka、T. Nalcajima、W. F. DeGrado and D. A. Tirrell、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*、40:1494(2001)を参照。さらに、セレノメチオンおよびテルロメチオンは、種々の組換えタンパク質中に組み込まれ、X線結晶学における相の固溶を促進する。例えば、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. Eckerskom、J. Kellermann and R. Huber、*Eur. J. Biochem.*、230:788(1995)；および、N. Budisa、W. Karnbrock、S. Steinbacher、A. Humm、L. Prade、T. Neufeld、L. Moroder and R. Huber、*J. Mol. Biol.*、270:616(1997)、を参照されたい。アルケンまたはアルキン機能性を有するメチオン類似体は、また、効率的に組み込まれ、化学的手段による追加のタンパク質の改変を可能としている。例えば、J. C. van Hest and D. A. Tirrell、*FEBS Lett.*、428:68(1998)；J. C. van Hest、K. L. Kiick and D. A. Tirrell、*J. Am. Chem. Soc.*、122:1282(2000)；および、K. L. Kiick and D. A. Tirrell、*Tetrahedron*、56:9487(2000)；米国特許第6,586,207号；米国特許公開第2002/0042097号を参照されたい。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。この方法の成功は、アミノアシル-tRNAシンテターゼによる非天然アミノ酸類似体の認識に依存し、一般的に、タンパク質翻訳の正確さを確実にするために高い選択性を必要とする。この方法の範囲を拡張する1つの方法は、アミノアシル-tRNAシンテターゼの基質特異性を緩和することであり、限られた数のケースで達成されている。例えば、大腸菌フェニルアラニル-tRNAシンテターゼ(PheRS)中のAla²⁹⁴のGlyによる置換が、基質結合ポケットのサイズを大きくし、p-Cl-フェニルアラニン(p-Cl-Phe)によるtRNA^{Phe}のアシル化が起こる。M. Tbbba、P. Kast and H. Hennecke、*Biochemistry*、33:7107(1994)を参照されたい。この変異体PheRSを含む大腸菌株は、フェニルアラニンの代わりに、p-Cl-フェニルアラニンまたはp-Br-フェニルアラニンの組み込みを可能とする。例えば、M. Ibbba and H. Hennecke、*FEBS Lett.*、364:272(1995)；and、N. Sharma、R. Furter、P. Kast and D. A. Tirrell、*FEBS Lett.*、467:37(2000)、を参照されたい。同様に、大腸菌チロシル-tRNAシンテターゼのアミノ酸結合部位近傍の点変異Phe130Serは、アザチロシンがチロシンより効率的に組み込まれるようにすることが示された。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)、を参照されたい。

【0439】

非天然アミノ酸をタンパク質中にインビボで組み込む別の戦略は、ブルーフリーディン

10

20

30

40

50

グ機序を有するシンテターゼを改変することである。これらのシンテターゼは、識別することができず、従って、同族天然アミノ酸に構造的に類似のアミノ酸を活性化する。この誤差は、別の部位で修正され、ミスチャージアミノ酸をtRNAから脱アシル化してタンパク質翻訳の正確さを維持する。シンテターゼのプルーフリーディング作用が機能しない場合は、誤って活性化された構造類似体は、編集機能を逃れ、組み込まれる可能性がある。この手法は、最近、バリル-tRNAシンテターゼ (ValRS) を使って立証された。V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P. Marliere, Science, 292:501 (2001)、を参照されたい。ValRSは、tRNAValをCys、Thr、またはアミノ酪酸 (Abu) を使って誤ってアミノアシル化できる；これらの非同族アミノ酸は、その後、編集ドメインにより加水分解される。大腸菌染色体のランダム変異誘発後、ValRSの編集部位に変異がある変異体大腸菌株が、選択された。この編集不完全ValRSは、tRNAValにCysをミスチャージする。Abuは、Cysに立体的に似ている (Cysの-SH基がAbuの-CH3で置換されている) ので、この変異体大腸菌株がAbuの存在下増殖する場合、変異体ValRSは、また、Abuをタンパク質中に組み込む。質量分析は、元のタンパク質中の各バリン位置で、約24%のバリンが、Abuにより置換されていることを示す。

【0440】

固相相合成および半合成法も、また、いくつかの新規アミノ酸を含むタンパク質の合成を可能としている。例えば、下記の出版物およびそこに引用された文献を参照されたい：Crick, F. H. C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. タンパク質用遺伝コードの一般的な性質 (General nature of the genetic code for proteins). Nature, 192:1227-1232 (1961) ; Hofmann, K., Bohn, H. ポリペプチドの研究 (Studies on polypeptides). XXXVI. S-ペプチド断片のS-タンパク質活性化効力に与えるピラゾール-イミダゾール置換の効果 (The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment), J. Am Chem Soc, 88 (24): 5914-5919 (1966) ; Kaiser, E. T. 合成手法 to 酵素を含む生物学的に活性なペプチドおよびタンパク質の合成手法 (Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes), Acc Chem Res, 22:47-54 (1989) ; Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E. T. 半合成酵素チオスブチリシンにより触媒されたペプチドセグメント結合 (Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thio subtilisin), J Am Chem Soc, 109:3808-3810 (1987) ; Schnolzer, M., Kent, S.B.H. 非保護合成ペプチド組み合わせによるタンパク質構築：骨格操作HIVプロテアーゼ (Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease), Science, 256 (5054): 221-225 (1992) ; Chaiken, I. M. 半合成ペプチドおよびタンパク質 (Semisynthetic peptides and proteins), CRC Crit Rev Biochem, 11 (3): 255-301 (1981) ; Offord, R. E. 化学手段によるタンパク質工学？ (Protein engineering by chemical means?) Protein Eng., 1 (3): 151-157 (1987) ; および、Jackson, D. Y., Burnier, J., Quan, C.

10

20

30

40

50

、Stanley、M.、Tom、J.、Wells、J. A. 非天然触媒残基を使ったリボスクレアーゼA全合成のためのペプチドリガーゼの設計 (A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues)、Science. 266 (5183): 243 (1994)。

【0441】

化学的改変は、補助因子、スピン標識およびオリゴヌクレオチド等の種々の非天然側鎖のタンパク質へのインビトロ導入のために使用されてきた。例えば、下記を参照されたい。Corey、D. R.、Schultz、P. G. ハイブリッド配列特異的単鎖デオキシリボスクレアーゼの生成 (Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease)、Science. 238 (4832): 1401-1403 (1987); Kaiser、E. T.、Lawrence D. S.、Rokita、S. E. 酵素特異性の化学的改変 (The chemical modification of enzymatic specificity)、Annu Rev Biochem. 54: 565-595 (1985); Kaiser、E. T.、Lawrence、D. S. 酵素活性部位の化学的変異 (Chemical mutation of enzyme active sites)、Science. 226 (4674): 505-511 (1984); Neet、K. E.、Nanci A、Koshland、D. E. チオールスブチリシンの特性 (Properties of thiol-subtilisin)、J Biol. Chem. 243 (24): 6392-6401 (1968); Polgar、L. et M. L. Bender. 合成により形成した活性部位を含む新規酵素、チオールスブチリシン (A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin). J. Am Chem Soc. 88: 3153-3154 (1966); および、Pollack、S. J.、Nakayama、G. Schultz、P. G. 抗体結合部位への求核試薬および分光学的プローブの導入 (Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites)、Science. 242 (4881): 1038-1040 (1988)。

【0442】

あるいは、化学修飾アミノアシル-tRNAを使う生合成法が、いくつかの生物物理学的プローブをインビトロ合成タンパク質中に組み込むために使用されてきた。下記の出版物および引用文献を参照されたい: Brunner、J. 新規光標識および架橋方法 (New Photolabeling and crosslinking methods)、Annu. Rev Biochem. 62: 483-514 (1993); および、Krieg、U. C.、Walter、P.、Hohnson、A. E. シグナル認識粒子の54-キロダルトンポリペプチドの発生期プレプロラクチンのシグナル配列の光架橋 (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)。

【0443】

以前に、非天然アミノ酸が、化学的アミノアシル化サプレッサー-tRNAの、所望のアンバーナンセンス変異を含む遺伝子でプログラムされたタンパク質合成反応への添加により、インビトロで部位特異的にタンパク質中に組み込まれうることを示した。これらの手法を使って、いくつかの共通20アミノ酸を構造的に近い相同体、例えば、特定のアミノ酸を栄養要求する株を使って、フルオロフェニルアラニンをフェニルアラニンに置換できる。例えば、Noren、C. J.、Anthony-Cahill、Griffith

、M. C.、Schultz、P. G. 非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込みのための一般的方法 (A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins)、Science、244:182-188 (1989); M. W. Nowak、et al.、Science、268:439-442 (1995); Bain、J. D.、Glabe、C. G.、Dix、T. A.、Chamberlin、A. R.、Diala、E. S. 非天然アミノ酸のポリペプチド中への生合成による部位特異的組み込み (Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide)、J. Am Chem Soc、111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al.、FASEB J. 13:41-51 (1999); Ellman、J. A.、Mendel、D.、Anthony-Cahill、S.、Noren、C. J.、Schultz、P. G. 非天然アミノ酸を部位特異的にタンパク質中に導入するための生合成方法 (Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins). Methods in Enz.、vol. 202、301-336 (1992); および、Mendel、D.、Comish、V. W. & Schultz、P. G. 拡張遺伝コードを使った部位指定変異誘発 (Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code)、Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24、435-62 (1995) を参照されたい。

【0444】

例えば、停止コドンUAGを認識し、非天然アミノ酸を使って化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAが、調製された。従来の部位指定変異誘発を使って、タンパク質遺伝子中の対象部位に停止コドンTAGが導入された。例えば、Sayers、J. R.、Schmidt、W. Eckstein、F. ホスホロチオエートベースオリゴヌクレオチド指定変異誘発における5'-3'エキソヌクレアーゼ (Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis)、Nucleic Acids Res、16(3):791-802 (1988)、を参照されたい。インビトロ転写/翻訳系で、アシル化サプレッサーtRNAと変異体遺伝子が組み合わされた場合、UAGコドンに応答して非天然アミノ酸が組み込まれ、これにより、指定位置にアミノ酸を含むタンパク質が得られた。 $[^3\text{H}]$ -Pheおよび α -ヒドロキシ酸を使って実験により、UAGコドンにより、所望のアミノ酸のみが、指定位置に組み込まれ、このアミノ酸は、タンパク質中の他のどの部位にも組み込まれないことが示された。例えば、Norcn、et al.、前出、Kobayashi et al.、(2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432; および、Ellman、J. A.、Mendel、D.、Schultz、P. G. 新規骨格構造のタンパク質中への部位特異的組み込み (Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins)、Science. 255(5041):197-200 (1992)、を参照されたい。

【0445】

tRNAは、限定されないが、化学的または酵素的アミノアシル化等の任意の方法または技術により、所望のアミノ酸でアミノアシル化されてもよい。

【0446】

アミノアシル化は、アミノアシルtRNAシンテターゼまたは限定されないが、リボザイムを含む他の酵素分子、により行われる。用語の「リボザイム」は、「触媒RNA」と同義に使われる。Cechと共同研究者 (Cech、1987、Science、236

: 1532-1539; McCorkle et al., 1987, Concepts Biochem. 64: 221-226) は、触媒として作用可能な天然RNA (リボザイム) の存在を立証した。しかし、これらの天然RNA触媒は、リボ核酸基質の切断およびスプライシングに対し作用することがわかっているが、最近のリボザイムの人工的進化に向けた開発は、触媒のレパートリーを種々の化学反応に拡張した。研究により、自らの(2')3'-末端へのアミノアシル-RNA結合を触媒できるRNA分子 (Illan gakekare et al., 1995 Science 267: 643-647)、およびアミノ酸を1つのRNA分子から別の分子に移すことができるRNA分子を特定した (Lohse et al., 1996, Nature 381: 442-444)。

10

【0447】

米国特許公開第2003/0228593号 (参照によって本明細書に組み込まれる) は、リボザイムの構築方法および天然でコードされるおよび天然ではコードされないアミノ酸を含むtRNAのアミノアシル化でのそれらの使用について記載している。限定されないが、リボザイムを含むtRNAをアミノアシル化できる基質固定型の酵素分子は、アミノアシル化産物の効率的な親和性精製を可能とする。適切な基質の例には、アガロース、セファロース、および磁気ビーズが含まれる。基質固定型のアミノアシル化用リボザイムの産生と使用については、Chemistry and Biology 2003、10: 1077-1084および米国特許公開第2003/0228593号に記載されている。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0448】

化学的アミノアシル化法には、限定されないが、アミノアシル化にシンテターゼの使用を避けるために、Hechtと共同研究者 (Hecht, S. M, Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517) およびSchultz, Chamberlin, Dougherty, 等 (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; E 30
llman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al, Nature 1992, 356, 537; Gal 40
livan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem, 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. C
hem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34) (これらは、参照によって本明細書に組み込まれる)、により導入された方法が含まれる。このような方法または他の化学的アミノアシル化法は、tRNA分子をアミノアシル化するのに使用可能である。

【0449】

触媒RNAを生成する方法は、無作為化リボザイム配列の別のプールの生成、プールに対し指定方向への進化の実施、所望のアミノアシル化活性でプールを選別、および、所望のアミノアシル化活性を示すリボザイムの配列の選択を含んでもよい。

【0450】

リボザイムは、アシル化活性を促進するモチーフおよび/または領域、例えば、GGU

50

モチーフおよびUーリッチ領域を含んでもよい。例えば、Uーリッチ領域は、アミノ酸基質の認識を促進でき、GGUーモチーフは、tRNAの3'末端を有する塩基対を形成できることが報告された。組み合わせると、GGUおよびモチーフおよびUーリッチ領域は、アミノ酸およびtRNAの両方の同時認識を促進し、それにより、tRNAの3'末端のアミノアシル化を促進する。

【0451】

リボザイムは、tRNA^{Asn}_{CCCG}とコンジュゲートされた部分的に無作為化r24miniを使ったインビトロ選択と、それに続く、活性クローン中に認められるコンセンサス配列の系統的操作により生成できる。この方法により得られる代表的リボザイムは、「Fx3リボザイム」と命名され、米国特許公開第2003/0228593号（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されており、同族非天然アミノ酸を付加された種々のアミノアシルー tRNAの合成用の多用途触媒として機能する。

10

【0452】

基質への固定化は、アミノアシル化tRNAの効率的親和性精製を可能とするために使用できる。適切な基質例には、限定されないが、アガロース、セファロース、および磁気ビーズが含まれる。リボザイムは、RNAの化学構造を利用して樹脂上に固定化できる。例えば、RNAのリボース上の3'ーシスジオールは、過ヨウ素酸塩で酸化されて、対応するジアルデヒドができ、樹脂上へのRNAの固定化を促進できる。安価なヒドラジド樹脂を含む種々の型の樹脂が使用でき、ヒドラジド樹脂の場合、還元的アミノ化により、樹脂とリボザイムの間の相互作用から不可逆的結合が作られる。アミノアシルー tRNAの合成は、このオンカラムアミノアシル化技術により、顕著に促進できる。Kourouklis et al. Methods 2005; 36: 239-4は、カラムベースアミノアシル化システムについて記載している。

20

【0453】

アミノアシル化tRNAの単離は、種々の方法で行うことができる。1つの適切な方法は、緩衝液、例えば、10mM EDTAを含む酢酸ナトリウム溶液、50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(3-プロパンスルホン酸)、12.5mM KCl、pH7.0、10mM EDTAを含む緩衝液、または単純にEDTA緩衝水(pH7.0)でアミノアシル化tRNAをカラムから溶出することである。

【0454】

アミノアシル化tRNAを、翻訳反応により作られたポリペプチド中の選択位置でtRNAがアミノアシル化された際に使用したアミノ酸を組み込むために、翻訳反応に添加することができる。本発明のアミノアシル化tRNAが使用可能な翻訳系の例には、限定されないが、細胞ライセートが含まれる。細胞ライセートは、入力mRNAからポリペプチドのインビトロ翻訳に必要な反応成分を提供する。このような反応成分の例には、限定されないが、リボソームタンパク質、rRNA、アミノ酸、tRNA、GTP、ATP、翻訳開始および伸長因子ならびに翻訳関連追加因子、が含まれる。さらに、翻訳系は、バッチ翻訳でも、区分化された翻訳であってもよい。バッチ翻訳系は、単一区画中で反応成分を結合するが、いっぽう、区分化された翻訳系は、翻訳効率を阻害する可能性のある反応産物から翻訳反応成分を分離する。このような翻訳系は、市販されている。

30

40

【0455】

さらに、結合転写／翻訳系を使用できる。結合転写／翻訳系は、入力DNAの対応するmRNAへの転写を可能とし、これが、次に、反応成分により翻訳される。市販の結合転写／翻訳の例は、Rapid Translation System (RTS, Roche Inc.)である。この系は、翻訳成分、例えば、リボソームおよび翻訳因子を提供するための大腸菌ライセートを含む混合物を含む。さらに、翻訳で使用するための入力DNAのmRNAテンプレートへの転写のために、RNAポリメラーゼが含まれる。RTSは、反応区画間に挿入する膜を介して、供給／廃棄区画および転写／翻訳区画を含む反応成分の区画化を使用できる。

【0456】

50

tRNAアミノアシル化は、限定されないが、トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ、触媒抗体、多官能性タンパク質、等含む他の薬剤によって行うことができる。

【0457】

Scientist 2005 Oct 10; pages 30-33でStephanは、天然ではコードされないアミノ酸をタンパク質に組み込むさらなる方法について記載している。Mol Cell. 2001 Oct; 8(4): 759-69でLu等は、タンパク質が化学的に非天然アミノ酸を含む合成ペプチドに連結される方法（発現タンパク質連結反応）について記載している。

【0458】

微量注入技術も、また、非天然アミノ酸をタンパク質中に組み込むために使用された。例えば、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); および、D. A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4: 645 (2000)、を参照されたい。アフリカツメガエル卵母細胞が、インビトロで作られた2つのRNA種：標的タンパク質をコードし、対象アミノ酸位置にUAG停止コドンを含むmRNAおよび所望の非天然アミノ酸でアミノアシル化したアンバーサプレッサーtRNA、を同時注入された。次に、卵母細胞の翻訳機構が、UAGにより指定される位置に非天然アミノ酸を挿入する。この方法は、膜内在性タンパク質の構造-機能のインビボ調査を可能とし、通常、インビトロ発現系の影響を受けにくい。例には、蛍光共鳴エネルギー転移による距離の測定のための蛍光アミノ酸のタキキニンニューロキニン-2受容体への組み込み、（例えば、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)、を参照）；イオンチャネル中の表面露出残基を特定するためのピオチン化アミノ酸の組み込み（例えば、J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4: 739 (1997) を参照）；イオンチャネル中の立体構造の変化をリアルタイムでモニターするためのケージ化チロシン類似体の使用（例えば、J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Neuron, 20: 619 (1998) を参照）；および、ゲーティング機構探索用イオンチャネルバックボーンを変えるためのアルファヒドロキシアミノ酸の使用（例えば、P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Cell, 96: 89 (1999)；および、T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, Nat. Neurosci., 4: 239 (2001) を参照）、を含む。

【0459】

非天然アミノ酸を直接タンパク質中にインビボで直接組み込む能力は、各種の利点を提供する。これには、限定されないが、変異体タンパク質の高収率、技術的容易さ、変異体タンパク質を細胞中で、または可能な限り生体中で調査できる可能性および治療の処置および診断用途でのこれらの変異体タンパク質の使用が含まれる。種々の大きさ、酸性度、求核性、疎水性、および他の特性を有する非天然アミノ酸をタンパク質に付与する能力は、プローブタンパク質機能を探査および新規特性を有する新規タンパク質または生物の生成の両方を行うための、合理的に、かつ系統的にタンパク質の構造を操作する我々の能力を大きく拡張できる。

【0460】

部位特異的にパラ-F-Pheを組み込む1つの試みでは、酵母アンバーサプレッサーtRNA Phe CUA / フェニルアラニル tRNA シンテターゼ対をp-F-Phe抵抗

10

20

30

40

50

性で、Phe栄養要求性大腸菌株中で使用した。例えば、R. Furter、Protein Sci.、7:419(1998)、を参照されたい。

【0461】

無細胞（インビトロ）翻訳系を使って、本発明のレラキシンポリヌクレオチドの発現を得ることも可能である。翻訳系は、細胞性でも、無細胞であってもよく、原核生物でも、真核生物であってもよい。細胞翻訳系には、限定されないが、全細胞調製、例えば、透過処理細胞または細胞培養が含まれ、この場合、所望の核酸配列は、mRNAに転写され、mRNAは翻訳される。無細胞翻訳系は、市販されており、多くの異なるタイプと系がよく知られている。無細胞系の例には、限定されないが、原核生物ライセート、例えば、大腸菌ライセート、および真核生物のライセート、例えば、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞ライセート、ウサギ網状赤血球ライセート、ウサギ卵母細胞ライセートおよびヒト細胞ライセートが含まれる。真核生物の抽出物またはライセートは、得られたタンパク質がグリコシル化、リン酸化または別の方法で修飾されているのが好ましい。理由は、多くのこのような修飾は、真核生物系のみで可能だからである。一部のこれらの抽出物およびライセートは、市販されている（Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N. Y.）。膜状抽出物、例えば、ミクロソーム膜を含むイヌ膵臓抽出物も利用可能であり、分泌タンパク質の翻訳にとって有用である。これらの系では、mRNAをテンプレート（インビトロ翻訳）として、またはDNAをテンプレート（インビトロ転写と翻訳を合わせて）として含むことができ、インビトロ合成は、リボソームにより指示される。無細胞タンパク質発現系の開発に多くの努力がなされてきた。例えば、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); および Patnaik, R. and J. R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); 米国特許第6,337,191号; 米国特許公開第2002/0081660号; 国際公開第00/55353号; 同90/05785号、を参照されたい。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドの発現に適用できる別の手法には、mRNA-ペプチド融合技術が含まれる。例えば、R. Roberts and J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302(1997); A. Frankel, et al., Chemistry & Biology 10:1043-1050(2003)、を参照されたい。この手法では、ピューロマイシンに連結されたmRNAテンプレートが、リボソーム上でペプチドに翻訳される。1つまたは複数のtRNA分子が改変された場合は、非天然アミノ酸が同様にペプチド中に組み込まれうる。最後のmRNAコドンが読み取られた後で、ピューロマイシンは、ペプチドのC末端に結合する。得られたmRNA-ペプチドコンジュゲートが、インビトロアッセイで興味ある特性を有すると分かった場合は、mRNA配列からその固有の特性を容易に明らかにできる。この方法では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドライブラリーを選別し、所望の特性を有するポリペプチドを特定できる。さらに最近では、精製された成分を含むインビトロリボソーム翻訳が天然ではコードされないアミノ酸で置換されたペプチドの合成を可能にすると報告されている。例えば、A. Forster et al., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353(2003)、を参照されたい。

【0462】

10

20

30

40

50

再構成翻訳系も使用できる。また、精製された翻訳因子を使った系では、ライセートの組み合わせまたは精製された翻訳因子、例えば、開始因子-1 (IF-1)、IF-2、IF-3 (α または β)、伸長因子T (EF-Tu)、または終結因子を補充したライセートの混合物の場合と同様に、mRNAのタンパク質への翻訳に成功している。無細胞系は、また、連結された転写／翻訳系であってもよく、この場合、DNAがこの系に導入され、mRNAに転写され、mRNAが、分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) (F. M. Ausubel et al, editors, Wiley Interscience, 1993 (本文献は、具体的に参照によって組み込まれる)) に記載のように翻訳される。真核生物の転写系に転写されたRNAは、特定の翻訳系で有利な可能性のあるヘテロ核RNA (hnRNA) の形でも、または5' -末端キャップ (7-メチルグアノシン) および3' -末端ポリAテイルの成熟mRNAの形でもよい。例えば、キャップmRNAは、網状赤血球ライセート系で高効率に翻訳される。

【0463】

レラキシンポリペプチドに結合したポリマー

本明細書記載の非天然アミノ酸ポリペプチドに対して、本明細書記載の組成物、方法、技術および戦略を使って種々の修飾を行うことができる。これらの修飾には、ポリペプチドの非天然アミノ酸成分への、限定されないが、次記のさらなる官能性の組み込みが含まれる：、標識；色素；ポリマー；水可溶性ポリマー；ポリエチレングリコール誘導体；光架橋剤；放射性核種；細胞障害性化合物；薬剤；親和標識；光親和性標識；反応性化合物；樹脂；第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体；抗体または抗体断片；金属キレート剤；補助因子；脂肪酸；炭水化物；ポリヌクレオチド；DNA；RNA；アンチセンスポリヌクレオチド；サッカライド；水可溶性デンドリマー；シクロデキストリン；抑制性リボ核酸；生体材料；ナノ粒子；スピン標識；フルオロフォア、金属含有成分；放射性成分；新規官能基；共有結合または非共有結合で他の分子と相互作用する基；フォトケージ化成分；化学線励起成分；光異性化可能成分；ビオチン；ビオチン誘導体；ビオチン類似体；重原子組み込み成分；化学的切断可能基；光切断可能基；延長側鎖；炭素結合型糖；レドックス活性剤；アミノチオ酸；毒成分；同位体標識成分；生物物理学的プローブ；リン光基；化学発光基；高電子密度基；磁性基；インターカレート基；発色団；エネルギー遷移剤；生理活性物質；検出可能標識；小分子；量子ドット；ナノトランスミッター；放射性核種標識ヌクレオチド；放射性核種標識トランスミッター；中性子捕獲剤；または上記のいずれかの組み合わせ、またはいずれかの他の望ましい化合物もしくは物質。本明細書記載の組成物、方法、技術および戦略の説明用非制限的例として、次の説明は、そこに記載された組成物、方法、技術および戦略も（必要に応じ、当業者なら本明細書の本開示を使ってできるであろう適切な修飾を加えて）限定されないが、上に挙げたものを含む他の官能性の付加に適用できるという理解の下で、非天然アミノ酸ポリペプチドへのポリマーの付加に焦点を置くことにする。

【0464】

各種のポリマーおよび他の分子は、本発明のレラキシンポリペプチドに結合し、レラキシンポリペプチドの生物学的な特性を調節でき、および／またはレラキシン分子に新規生物学的特性を与えることができる。これらのポリマーは、天然でコードされるアミノ酸経由で、天然ではコードされないアミノ酸、または天然もしくは非天然アミノ酸のいずれかの官能性置換基、または天然もしくは非天然アミノ酸に付加されたいずれかの置換基もしくは官能基経由で、レラキシンポリペプチドに連結できる。ポリマーの分子量は、限定されないが、約100Da～約100,000Da以上を含む広い範囲であってもよい。ポリマーの分子量は、約100Da～約100,000Daであってもよく、限定されないが、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,0

10

20

30

40

50

00Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Da、が含まれる。一部の実施形態では、ポリマーの分子量は、約100Da～約50,000Daである。一部の実施形態では、ポリマーの分子量は、約100Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマーの分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマーの分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマーの分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0465】

本発明は、ポリマー：タンパク質コンジュゲートの実質的に均一な製剤を提供する。本明細書で使われる「実質的に均一な」は、ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子が、総タンパク質の半分以上を越えて観察されることを意味する。ポリマー：タンパク質コンジュゲートは、生物活性を有し、本明細書で提供されるこの「実質的に均一な」ペグ化レタキシンポリペプチド製剤は、均一製剤の利点、例えば、ロットーロット間の薬物動態学に関する予測の臨床的適用の容易さ、を示すのに十分に均一である製剤である。

【0466】

ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子の混合物を調製するために選択することでも、本明細書で提供される利点は、混合物に含めるためのモノーポリマー：タンパク質コンジュゲートの比率を選択できることである。従って、必要に応じ、種々の数の結合ポリマー成分（すなわち、ジマー、トリマー、テトラマー、等）を含む種々のタンパク質の混合物を調製し、前記コンジュゲートを本発明の方法を使って調製したモノーポリマー：タンパク質コンジュゲートと結合し、所定の比率のモノーポリマー：タンパク質コンジュゲートを含む混合物を得ることができる。

【0467】

選択ポリマーは、選択ポリマーが結合されるタンパク質が、水性の環境、例えば、生理的環境の中で沈殿しないように、水溶性であってもよい。ポリマーは、分岐でも非分岐でもよい。最終製剤製品の治療上の使用のために、ポリマーは、薬学的に許容可能なものになる。

【0468】

ポリマーの例には、限定されないが、ポリアルキルエーテルおよびそのアルコキシキャッピング類似体（例えば、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシエチレン／プロピレングリコール、およびそのメトキシまたはエトキシキャッピング類似体、特に、ポリオキシエチレングリコール、後者は、ポリエチレングリコールまたはPEGとしても知られる）；ポリビニルピロリドン；ポリビニルアルキルエーテル；ポリオキサゾリン、ポリアルキルオキサゾリンおよびポリヒドロキシアルキルオキサゾリン；ポリアクリルアミド、ポリアルキルアクリルアミド、およびポリヒドロキシアルキルアクリルアミド（例えば、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミドおよびその誘導体）；ポリヒドロキシアルキルアクリレート；ポリシアル酸およびその類似体；親水性ペプチド配列；多糖類およびその誘導体、例えば、デキストランおよびデキストラン誘導体、例えば、カルボキシメチルデキストラン、デキストラン硫酸塩、アミノデキストラン；セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース；キチンおよびその誘導体、例えば、キトサン、スクシニルキトサン、カルボキシメチルキチン、カルボキシメチルキトサン；ヒアルロン酸およびその誘導体；デンプン；アルギナート；コンドロイチン硫酸塩；アルブミン；プルランおよびカルボキシメチルプルラン；ポリアミノ酸およびそれらの誘導体、例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジン、ポリアスパラギン酸、ポリアスパルトアミド；マレイン酸無水物共重合体、例えば、：スチレンマレイン酸無水物共重合体、ジビニルエチルエーテルマレイン酸無水物共重合体；ポリビニルアルコール；それらの共重合体；それらのターポリマー；それらの混合物；および上記の誘導体、が含まれる。

【0469】

ポリエチレングリコール分子のタンパク質分子に対する割合は、反応混合物中の濃度と共に変化する。一般的に、最適比率（最小限の過剰未反応タンパク質またはポリマーの存在下での反応効率の観点から）は、選択ポリエチレングリコールの分子量および利用可能反応基の数に基づいて決定できる。分子量に関しては、一般的には、ポリマー分子量が大きいくほど、タンパク質に結合可能なポリマー分子の数は少なくなる。同様に、ポリマーの分岐も、これらのパラメータを最適化する際には考慮しなければならない。一般的に、分子量が大きいくほど（または分岐部が多いほど）、ポリマー：タンパク質比率が大きい。

【0470】

本明細書で使われるように、PEG：レラキシシポリペプチドコンジュゲートについて考察する場合、用語の「治療有効量」は、患者に対する所望の利益を与える量を指す。量は、個体毎に変わり、いくつかの因子、例えば、患者の全体身体条件、治療される状態の根底にある原因に依存する。治療に使われるレラキシシポリペプチドの量は、受容可能な変化の速度を与え、有益であるレベルでの所望の応答を維持する。本組成物の治療有効量は、公に入手可能な材料と手続きを使って、当業者により容易に確認可能である。

【0471】

水溶性ポリマーは、限定されないが、直鎖、フォーク型または分岐、等などの構造型もよい。典型的には、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレングリコール）、例えば、ポリ（エチレングリコール）（PEG）であるが、ほかの水溶性ポリマーも使用できる。例として、PEGが本発明の特定の実施形態の記載に使用される。

【0472】

PEGは、よく知られた、水溶性ポリマーで、市販品として入手できる、または当業者に既知の方法に従い、エチレングリコールの開環重合により調製できる（Sandler and Karo, ポリマー合成（Polymer Synthesis）、Academic Press、New York、Vol. 3、pages 138-161）。用語の「PEG」は、広範な意味で使用され、大きさの程度、またはPEG末端の修飾の有無を問わず、いずれかのポリエチレングリコール分子を含み、レラキシシポリペプチドに連結したものとして、式： $\text{XO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Y}$ により表すことができ、ここで、 n は、2～10,000、および X は H または末端修飾であり、限定されないが、 C_{1-4} アルキル、保護基、または末端官能基、を含む。

【0473】

一部のケースでは、本発明で使用されるPEGは、一端が、ヒドロキシまたはメトキシで終結する、すなわち、 X は H または CH_3 （「メトキシPEG」）である。あるいは、PEGは、反応基で終結し、それにより、二官能性ポリマーを形成できる。典型的な反応基には、20共通アミノ酸で認められる官能基との反応によく使われる反応基（限定されないが、マレイミド基、活性炭酸塩（限定されないが、 p -ニトロフェニルエステルを含む）、活性化エステル（限定されないが、 N -ヒドロキシスクシンイミド、 p -ニトロフェニルエステル）およびアルデヒドを含む）ならびに20共通アミノ酸に不活性であるが、天然ではコードされないアミノ酸中に存在する相補的な官能基と特異的に反応する官能基（限定されないが、アジド基、アルキン基を含む）を含むことができる。上記式の Y で示される他のPEG末端は、直接または間接的に天然または天然ではコードされないアミノ酸を介してレラキシシポリペプチドに結合することに留意されたい。例えば、 Y は、ポリペプチドのアミン基（限定されないが、リシンの ϵ -アミンまたは N 末端を含む）へのアミド、カルバマートまたは尿素結合であってもよい。あるいは、 Y は、チオール基（限定されないが、システインのチオール基を含む）へのマレイミド結合であってもよい。あるいは、 Y は、通常、20共通アミノ酸を介しては利用できない残基への結合であってもよい。例えば、PEG上のアジド基は、レラキシシポリペプチド上のアルキン基と反応して、Huisingen [3+2] 付加環化産物を形成できる。あるいは、PEG上のアルキン基は、天然ではコードされないアミノ酸中に存在するアジド基と反応して、類似の産物を形成できる。一部の実施形態では、強求核剤（限定されないが、ヒドラジン、ヒドラジド

、ヒドロキシルアミン、セミカルバジドを含む)は、天然ではコードされないアミノ酸に存在するアルデヒドまたはケトン基と反応して、該当する場合には、ヒドラゾン、オキシムまたはセミカルバゾン形成でき、これは、場合によっては、適切な還元剤を使った処理によりさらに還元できる。あるいは、強求核剤が、天然ではコードされないアミノ酸を介してレラキシンポリペプチドに組み込まれ、水溶性ポリマー中に存在するケトンまたはアルデヒド基と優先的に反応させるのに使うことができる。

【0474】

実際の所望に応じ、どの分子量のPEGでも使用可能であり、分子量は、限定されないが、所望に応じ、約100ダルトン(Da)~100,000Da以上(限定されないが、場合により0.1~50kDaまたは10~40kDaを含む)を含む。PEGの分子量は、広範囲にわたってもよく、限定されないが、約100Da~約100,000Da以上が含まれる。PEGは、約100Da~約100,000Daであってもよく、限定されないが、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Daが含まれる。一部の実施形態では、PEGは、約100Da~約50,000Daである。一部の実施形態では、PEGは、約100Da~約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGは、約1,000Da~約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGは、約5,000Da~約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGは、約10,000Da~約40,000Daである。限定されないが、1~100kDaの範囲のMWを有する各鎖を有するPEG分子(限定されないが、1~50kDaまたは5~20kDaを含む)を含む分岐鎖PEGも使用できる。分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、限定されないが、約1000Da~約100,000Da以上であってもよい。分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、約1,000Da~約100,000Daであってもよく、限定されないが、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、および1,000Daを含む。一部の実施形態では、分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、約1,000Da~約50,000Daである。一部の実施形態では、分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、約1,000Da~約40,000Daである。一部の実施形態では、分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、約5,000Da~約40,000Daである。一部の実施形態では、分岐鎖PEGの各鎖の分子量は、約5,000Da~約20,000Daである。広範囲のPEG分子が、限定されないが、Shearwater Polymers, Inc. カタログ、Nektar Therapeutics カタログ、等に記載されている。これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0475】

一般的に、PEG分子の少なくとも1つの末端は、天然ではコードされないアミノ酸との反応用に利用可能である。例えば、アミノ酸側鎖との反応用にアルキンおよびアジド成分を有するPEG誘導体は、PEGを本明細書記載の天然ではコードされないアミノ酸に結合するために使用できる。天然ではコードされないアミノ酸がアジドを含む場合には、PEGは、典型的には、アルキン成分を含み、[3+2]付加環化産物を形成するか、またはホスフィン基含有活性化PEG種(すなわち、エステル、炭酸塩)を含み、アミド結

合を形成することになる。あるいは、天然ではコードされないアミノ酸がアルキンを含む場合には、PEGは、典型的には、アジド成分を含み、[3+2] H u i s g e n付加環化産物を形成することになる。天然ではコードされないアミノ酸がカルボニル基を含む場合は、PEGは、典型的には、強力な求核剤（限定されないが、ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、またはセミカルバジド官能性を含む）を含み、それぞれ対応するヒドラゾン、オキシム、およびセミカルバゾン結合を形成することになる。他の選択肢では、上述の反応基の方向の逆を使用でき、すなわち、天然ではコードされないアミノ酸のアジド成分を、アルキン含有PEG誘導体と反応させることができる。

【0476】

一部の実施形態では、PEG誘導体を有するレラキシンポリペプチド変異体は、天然ではコードされないアミノ酸の側鎖上に存在する化学官能性と反応する化学官能性を含む。

10

【0477】

一部の実施形態では、本発明は、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格を含むアジドおよびアセチレン含有ポリマー誘導体を提供する。水溶性ポリマーのポリマー骨格は、ポリ（エチレングリコール）であってもよい。しかし、限定されないが、ポリ（エチレン）グリコールおよびポリ（デキストラン）およびポリ（プロピレングリコール）等の他の関連ポリマーを含む各種水溶性ポリマーも、また、本発明の実施での使用に適切であり、用語のPEGまたはポリ（エチレングリコール）の使用は、全てのこのような分子を包含し含むことが意図されていることは理解されたい。用語のPEGは、限定されないが、二官能性PEG、多分岐PEG、誘導体化PEG、

20

【0478】

PEGは、典型的には、無職透明、無臭、水に可溶、熱に安定、多くの化学薬品に不活性であり、加水分解または変質せず、通常非毒性である。ポリ（エチレングリコール）は、生体適合性であると考えられており、すなわち、PEGは、害を与えることなく、生きている組織または生物と共存できる。さらに具体的には、PEGは、実質的に、非免疫原性であり、すなわち、PEGが体内で免疫応答を生み出す傾向はない。体内でいくつかの望ましい機能を有する分子、例えば、生理活性物質に結合した場合、PEGは、薬剤をマスクする傾向があり、どの免疫応答も減らすかまたは除去でき、それにより、生物は、その薬剤の存在に耐えることができる。PEGコンジュゲートは、実質的な免疫応答を生み出す、または凝固または他の望ましくない影響を生じる傾向はない。式—CH₂CH₂O—(CH₂CH₂O)_n—CH₂CH₂—（式中、nは、約3～約4000、典型的には、約20～約2000である）を有するPEGは、本発明での使用に適する。本発明の一部の実施形態では、約800Da～約100,000Daの分子量のPEGは、ポリマー骨格として特に有用である。PEGの分子量は、広範囲にわたってよく、限定されないが、約100Da～約100,000Da以上を含む。PEGの分子量は、約100Da～約100,000Daであってもよく、限定されないが、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Daが含まれる。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約100Da～約50,000Daである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約100Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約1,000

30

40

50

D a～約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、PEGの分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0479】

ポリマー骨格は、直鎖でも、分岐であってもよい。分岐高分子骨格は、通常、当技術分野で既知である。典型的には、分岐高分子は、中央分岐部コア部分および中央分岐部コアに連結した複数の直鎖ポリマー鎖を有する。PEGは、通常、エチレンオキシドに、種々のポリオール、例えば、グリセリン、グリセリンオリゴマー、ペンタエリスリトールおよびソルビトール、を付加して調製できる分岐型で使用される。中央分岐部は、また、リシン等のいくつかのアミノ酸から誘導できる。分岐ポリ（エチレングリコール）は、一般的

10

【0480】

分岐PEGは、また、フォーク型PEGの形でもよく、これはPEG（—YCHZ₂）_n、で表され、式中、Yは、結合基であり、Zは、規定長さの原子鎖によりCHに連結された活性化末端基である。

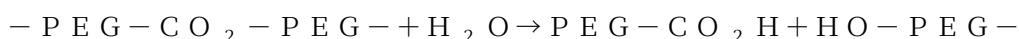
20

【0481】

さらに別の分岐型のぶら下がりPEGは、反応基例えば、PEG鎖の末端ではなくPEG骨格に沿ったカルボキシルを有する。

【0482】

これらのPEG型に加えて、ポリマーは、また、骨格中に弱いまたは分解可能な結合を持った状態で調製できる。例えば、PEGは、ポリマー骨格中に加水分解を受けやすいエステル結合を伴って調製できる。下記に示すように、この加水分解は、ポリマーの低分子量断片：



30

への切断を起こす。用語のポリ（エチレングリコール）またはPEGは、限定されないが、本明細書で開示のものを含む、当技術分野で既知の全ての型を表す、または含むことは、当業者なら理解されよう。

【0483】

多くの他のポリマーも、また、本発明での使用に適する。一部の実施形態では、2～約300の終端を有する水可溶性のポリマー骨格は、本発明に特に有用である。適切なポリマーの例には、限定されないが、他のポリ（アルキレングリコール）、例えば、ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）、その共重合体（限定されないが、エチレングリコールとプロピレングリコールの共重合体を含む）、そのターポリマー、そそれの混合物、等が含まれる。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、変えることができるが、典型的には、分子量は、約800Da～約100,000Da、場合によっては、約6,000Da～約80,000Daの範囲にある。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約10,000Daであってもよく、限定されないが、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100

40

50

Daを含む。一部の実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約50,000Daである。一部の実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。一部の実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0484】

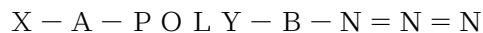
当業者なら、実質的に水溶性骨格の前述のリストは、決して網羅的ではなく、単に例示に過ぎず、上述の特性を有する全ての高分子材料が本発明での使用に適するものとして意図されていることに、気付くであろう。

【0485】

本発明の一部の実施形態では、ポリマー誘導体は、「多官能性」であり、ポリマー骨格は、官能基により官能化または活性化された少なくとも2つの終端、可能性としては、約300もの終端を有することを意味する。多官能性ポリマー誘導体には、限定されないが、2つの終端を有する直鎖ポリマーを含み、各終端は官能基に結合され、この官能基は同じでも、異なっているともよい。

【0486】

一実施形態では、ポリマー誘導体は、構造：



を有し、

式中：

N=N=Nは、アジド成分であり；

Bは、連結成分で、これは存在しても、存在しなくてもよく；

POLYは、水可溶性非抗原性のポリマーであり；

Aは、連結成分で、これは存在しても、存在しなくてもよく、またBと同じでも異なっているともよく；さらに

Xは、第2の官能基である。

AおよびBの連結成分の例には、限定されないが、18までの官能性を含む多官能化アルキル基が含まれ、1～10炭素原子を含んでもよい。ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素または硫黄は、アルキル鎖中に含まれてもよい。アルキル鎖は、また、ヘテロ原子の位置で分岐していてもよい。AおよびBの連結成分の他の例には、限定されないが、10までの官能性を含む多官能化アリール基が含まれ、5～6炭素原子を含んでもよい。アリール基は、もう一つの炭素原子、窒素、酸素または硫黄原子で置換されてもよい。適切な結合基の他の例には、米国特許第5,932,462号；同5,643,575号；および米国特許公開第2003/0143596号、に記載の結合基が含まれる。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。当業者なら、連結成分の前述のリストは、決して、網羅的ではなく、単なる例示であり、上述の特性を有する全ての連結成分が本発明での使用に適するものとして意図されていることに気付くであろう。

【0487】

Xとしての使用のための適切な官能基の例には、限定されないが、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アルコキシ、活性エステル、例えば、N-ヒドロキシサクシニミジルエステルおよび1-ベンゾトリアゾリルエステル、活性炭酸塩、例えば、N-ヒドロキシサクシニミジル炭酸塩および1-ベンゾトリアゾリル炭酸塩、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリラート、メタクリラート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、ヒドラジド、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボン酸、保護されたカルボン酸、イソシアナート、イソチオシアナート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサル、ジオン、メシラート、トシラート、トレシラート、アルケン、ケトン、およびアジド、が含まれる。当業者にはわかるように、アジド基との反応が起こらないように、選択X成分は、アジド基と相溶性で無ければならない。ア

10

20

30

40

50

ジド含有ポリマー誘導体は、ホモ二官能性であってもよく、この場合は、第2の官能基（すなわち、X）もアジド成分であることを意味し、またはヘテロ二官能性であってもよく、この場合は、第2の官能基が異なる官能基であることを意味する。

【0488】

用語の「保護された」は、特定の反応条件下で化学的に反応する官能基の反応を防ぐ保護基または成分の存在を意味する。保護基は、保護される化学反応基のタイプに依存して変わる。例えば、化学反応基がアミンまたはヒドラジドの場合は、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル（t-Boc）および9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）の群から選択できる。化学反応基がチオールの場合は、保護基はオルトピリジルジスルフィドであってもよい。化学反応基がカルボン酸、例えば、ブタン酸もしくはプロピオン酸、またはヒドロキシル基の場合は、保護基は、ベンジルまたはアルキル基、例えば、メチル、エチル、もしくはtert-ブチルであってもよい。当技術分野で既知の他の保護基も、本発明で使用可能である。

【0489】

文献にある末端官能基の具体的な例には、限定されないが、N-サクシニミジル炭酸塩（例えば、米国特許第5,281,698号、同5,468,478号参照）、アミン（例えば、Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981)、Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983) 参照）、ヒドラジド（例えば、Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978) 参照）、サクシニミジルプロピオナートおよびサクシニミジルブタノアート（例えば、Olson et al.、ポリ（エチレングリコール）化学と生物学的適用（Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications）、pp170-181、Harris & Zalipsky Eds.、ACS、Washington, D. C.、1997、を参照；また、米国特許第5,672,662号も参照）、サクシニミジルスクシナート（例えば、Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) および Joppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979) 参照）、サクシニミジルエステル（例えば、米国特許第4,670,417号参照）、ベンゾトリアゾール炭酸塩（例えば、米国特許第5,650,234号参照）、グリシジルエーテル（例えば、Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979)、Elling et al.、Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991) 参照）、オキシカルボニルイミダゾール（例えば、Beauchamp et al.、Anal. Biochem. 131:25 (1983)、Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985) 参照）、p-ニトロフェニル炭酸塩（例えば、Veronese et al.、Appl. Biochem. Biotech.、11:141 (1985)；および Sartore et al.、Appl. Biochem. Biotech.、27:45 (1991) 参照）、アルデヒド（例えば、Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)、米国特許第5,824,784号、米国特許第5,252,714号参照）、マレイミド（例えば、Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990)、Romani et al.、ペプチドとタンパク質の化学（Chemistry of Peptides and Proteins）2:29 (1984)、および Kogan、Synthetic Comm. 22:2417 (1992) 参照）、オルトピリジルジスルフィド（例えば、Woghiren et al. Bioconj. Chem. 4:314 (1993) 参照）、アクリロイル（例えば、Sawhney et al.、Macromolecules、26:581 (1993) 参照）、ビニルスルホン（例えば、米国特許第5,900,461号参照）、が含まれる。全ての上記文献と特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

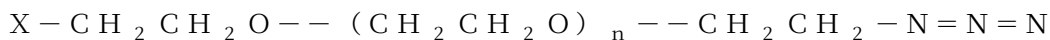
30

40

50

【0490】

本発明特定の実施形態では、本発明のポリマー誘導体は、構造：



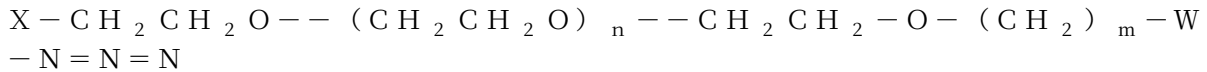
を有するポリマー骨格を含み、

式中：

Xは、上述のような官能基であり；

nは、約20～約4000である。

別の実施形態では、本発明のポリマー誘導体は、構造：



を有するポリマー骨格を含み、

式中：

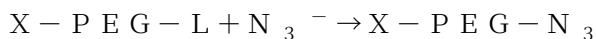
Wは、1～10炭素原子を含む脂肪族または芳香族リンカー成分；

nは、約20～約4000であり；さらに

Xは、上述のような官能基であり、mは、1～10である。

【0491】

本発明のアジド含有PEG誘導体は、当技術分野で既知の種々の方法および／または本明細書で開示の種々の方法で調製できる。以下に示す1つの方法では、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有し、第1の官能基に結合した第1の末端および適切な脱離基に結合した第2の末端を有する水溶性ポリマー骨格が、アジド陰イオン（これは、いずれかのナトリウム、カリウム、tert-ブチルアンモニウム等の内のいくつかの適切な対イオンと対形成していてもよい）と反応する。脱離基は、求核置換を受け、アジド成分により置換され、所望のアジド含有PEGポリマーを生成する。



【0492】

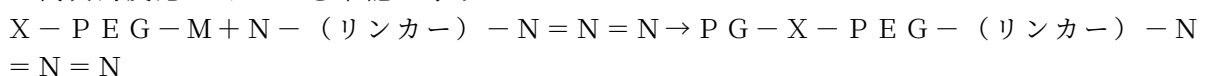
示したように、本発明での使用に適切なポリマー骨格は、式X-PEG-Lを有し、式中、PEGは、ポリ（エチレングリコール）であり、Xは、アジド基と反応しない官能基であり、Lは、適切な脱離基である。適切な官能基の例には、限定されないが、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アセタール、アルケニル、アミン、アミノオキシ、保護アミン、保護ヒドラジド、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、マレイミド、ジチオピリジン、およびビニルピリジン、ならびにケトンが含まれる。適切な脱離基の例には、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシラート、トレシラート、およびトシラートが含まれる。

【0493】

本発明のアジド含有ポリマー誘導体調製用の別の方法では、アジド官能性を有する連結剤を、平均分子量約800Da～約100,000Daの水溶性ポリマー骨格と接触させる。ここで、連結剤は、PEGポリマー上の化学官能性と選択的に反応し、アジド含有ポリマー誘導体産物を形成する化学官能性を有し、アジドは、結合基によりポリマー骨格から分離されている。

【0494】

代表的反応スキームを下記に示す：



式中：

PEGは、ポリ（エチレングリコール）であり、Xは、キャッピング基、例えば、アルコキシまたは上述のような官能基であり；さらに

Mは、アジド官能性と反応しないが、N官能基とは効率的かつ選択的に反応する官能基である。

【0495】

適切な官能基の例には、限定されないが、Nがアミンの場合は、Mとしてカルボン酸、

10

20

30

40

50

炭酸塩または活性エステル；Nがヒドラジドまたはアミノオキシ成分の場合は、Mとしてケトン；Nが求核剤の場合は、Mとして脱離基、が含まれる。

【0496】

粗製産物の精製は、既知の方法により行うことができ、これには、限定されないが、産物の沈殿反応と、必要に応じ、それに続くクロマトグラフィー、が含まれる。

【0497】

さらに具体的な例は、PEGジアミンのケースについて以下に示すが、この例では、アミンの1つが、保護基成分、例えば、tert-ブチル-Bocで保護され、得られた単一保護PEGジアミンが、アジド官能性を有する連結成分と反応する：



10

【0498】

この例では、アミン基は、種々の活性化剤、例えば、チオニル塩化物またはカルボジイミド試薬およびN-ヒドロキシスクシンイミドまたはN-ヒドロキシベンゾトリアゾールを使ってカルボン酸基に結合し、モノアミンPEG誘導体とアジド含有リンカー成分の間でアミド結合を形成できる。アミド結合の形成に成功した後で、得られたN-tert-ブチル-Boc-保護アジド含有誘導体は、生理活性分子を直接修飾するのに使用できる、または他の有用な官能基を組み込むためにさらに念入りに作り上げることができる。例えば、N-tert-Boc基は、強酸による処理により加水分解してω-アミノ-PEG-アジドを生成する事ができる。得られたアミンは、有用なヘテロ二官能性試薬の生成用の他の有用な官能性、例えば、マレイミド基、活性化ジスルフィド、活性化エステル等を組み込むための合成手段として使用可能である。

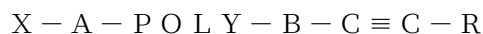
20

【0499】

ヘテロ二官能性誘導体は、異なる分子をポリマーのそれぞれの末端に結合されることが所望の場合、特に、有用である。例えば、ω-N-アミノ-N-アジドPEGは、活性化求電子基、例えば、アルデヒド、ケトン、活性化エステル、活性炭酸塩、等、を有する分子をPEGの1つの末端に、さらに、アセチレン基を有する分子をPEGのもう一つの末端に、結合するのを可能とするであろう。

【0500】

本発明の別の実施形態では、ポリマー誘導体は、構造：



30

を有し、

式中：

Rは、Hまたはアルキル、アルケン、アルコキシ、もしくはアリアルもしくは置換アリアル基であってもよく；

Bは、連結成分で、これは存在しても、存在しなくてもよく；

POLYは、水可溶性で非抗原性のポリマーであり；

Aは、連結成分で、これは存在しても、存在しなくてもよく、またBと同じであっても、異なってもよく；さらに

Xは、第2の官能基である。

【0501】

40

AとB用の連結成分の例には、限定されないが、18までの官能性を含む多官能化アルキル基が含まれ、また、1～10炭素原子を含んでもよい。ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素または硫黄は、アルキル鎖と一緒に含んでもよい。アルキル鎖は、また、ヘテロ原子の位置で分岐してもよい。AとB用の連結成分の他の例には、限定されないが、10までの官能性を含む多官能化アリアル基を含んでもよく、また、5～6炭素原子を含んでもよい。アリアル基は、もう一つの炭素原子、窒素、酸素、または硫黄原子で置換されてもよい。適切な結合基の他の例には、米国特許第5,932,462号および同5,643,575号、ならびに米国特許公開第2003/0143596号に記載の結合基が含まれる。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。当業者なら、前出の連結成分のリストは、決して網羅的なものではなく、単に例示が意図されており、上述の特性を

50

有する各種の連結成分が本発明において有用であるものとして意図されていることを認識するであろう。

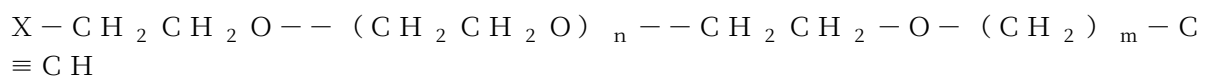
【0502】

Xとして使える適切な官能基の例には、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アルコキシ、活性エステル、例えば、N-ヒドロキシサクシニミジルエステルおよび1-ベンゾトリアゾリルエステル、活性炭酸塩、例えば、N-ヒドロキシサクシニミジル炭酸塩および1-ベンゾトリアゾリル炭酸塩、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリラート、メタクリラート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護アミン、ヒドラジド、保護ヒドラジド、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、イソシアナート、イソチオシアナート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシラート、トシラート、およびトレシラート、アルケン、ケトン、ならびにアセチレン、が含まれる。当然のことながら、選択されたX成分は、アセチレン基との反応が起こらないように、アセチレン基と相溶性でなければならない。アセチレン含有ポリマー誘導体は、ホモ二官能性であってもよく、この場合は、第2の官能基（すなわち、X）もアセチレン成分であることを意味し、またはヘテロ二官能性であってもよく、この場合は、第2の官能基が異なる官能基であることを意味する。

10

【0503】

本発明の別の実施形態では、ポリマー誘導体は、構造：



20

を有するポリマー骨格を含み、

式中：

Xは、上述のような官能基であり；

nは、約20～約4000であり；さらに

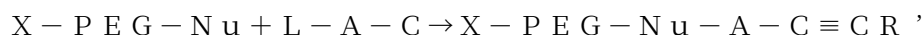
mは、1～10である。

それぞれのヘテロ二官能性PEGポリマーの具体的な例は以下に示す。

【0504】

本発明のアセチレン含有PEG誘導体は、当業者に既知の、および／または本明細書で開示の方法を使って調製できる。1つの方法では、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有し、第1の官能基に結合した第1の末端および適切な求核基に結合した第2の末端を有する水溶性ポリマー骨格がPEG上の求核基との反応に適したアセチレン官能性および脱離基の両方を有する化合物と反応する。求核成分を有するPEGポリマーおよび脱離基を有する分子が組み合わされると、脱離基が求核置換を受けて求核成分により置換され、所望のアセチレン含有ポリマーを生成する。

30



【0505】

明らかなように、反応に使用するために好ましいポリマー骨格は、式X-PEG-Nuを有し、式中、PEGは、ポリ（エチレングリコール）であり、Nuは、求核成分であり、Xは、Nu、Lまたはアセチレン官能性と反応しない官能基である。

40

【0506】

Nuの例には、限定されないが、主にSN2型機序を介して反応すると思われるアミン、アルコキシ、アリールオキシ、スルフヒドリル、イミノ、カルボキシラート、ヒドラジド、アミノオキシ基が含まれる。Nu基のさらなる例には、主に求核付加反応を介して反応すると思われる官能基が含まれる。L基の例には、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシラート、トレシラート、およびトシラートならびに求核置換を受けると予測される他の基、ならびにケトン、アルデヒド、チオエステル、オレフィン、α-β不飽和カルボニル基、炭酸塩および求核剤により付加を受けると予測される他の求電子基が含まれる。

【0507】

本発明の別の実施形態では、Aは、1～10炭素原子の脂肪族リンカーまたは6～14

50

炭素原子の置換アリール環である。Xは、アジド基と反応しない官能基、およびLは、適切な脱離基である。

【0508】

本発明のアセチレン含有ポリマー誘導体の別の調製方法では、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有し、一端に保護官能基またはキャッピング剤を持ち、他端に適切な脱離基を持つPEGポリマーと、アセチレン陰イオンとが接触させられる。

【0509】

代表的反応スキームを下記に示す：



式中：

PEGは、ポリ（エチレングリコール）であり、Xは、キャッピング基、例えば、アルコキシまたは上述のような官能基であり；さらに

R'は、H、アルキル、アルコキシ、アリールもしくはアリールオキシ基または置換アルキル、アルコキシ、アリールもしくはアリールオキシ基である。

【0510】

上記の例では、脱離基Lは、十分な濃度のアセチレン陰イオンと接触した場合に、S_N2型置換を受けるのに十分に反応性でなければならない。アセチレン陰イオンによる脱離基のS_N2置換を行うために必要な反応条件は、当業者には既知である。

【0511】

粗製産物の精製は、通常、当技術分野で既知の方法で行うことができ、これには、限定されないが、産物の沈殿反応と、必要に応じ、それに続くクロマトグラフィー、が含まれる。

【0512】

水溶性ポリマーは、本発明のレラキシンポリペプチドに結合できる。水溶性ポリマーは、レラキシンポリペプチド中に組み込まれた天然ではコードされないアミノ酸もしくは天然ではコードされないもしくは天然でコードされるアミノ酸の任意の官能基もしくは置換基、または天然ではコードされないもしくは天然でコードされるアミノ酸に付加された任意の官能基もしくは置換基を介して連結されてもよい。あるいは、水溶性ポリマーは、天然アミノ酸（限定されないが、システイン、リシンまたはN-末端残基のアミン基を含む）を介して、天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドに連結される。一部のケースでは、本発明のレラキシンポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10非天然アミノ酸を含み、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、水溶性ポリマー（限定されないが、PEGおよび／またはオリゴ糖を含む）に連結される。一部のケースでは、本発明のレラキシンポリペプチドは、水溶性ポリマーに連結された1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超の天然でコードされるアミノ酸をさらに含む。一部のケースでは、本発明のレラキシンポリペプチドは、水溶性ポリマーに連結された1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸および水溶性ポリマーに連結された1つまたは複数の天然アミノ酸を含む。一部の実施形態では、本発明で使われる水溶性ポリマーは、非コンジュゲート型に比べて、レラキシンポリペプチドの血清半減期を延長する。

【0513】

本発明のレラキシンポリペプチドに連結された水溶性ポリマーの数（すなわち、ペグ化またはグリコシル化の程度）は、変えられた（限定されないが、増加または減少を含む）薬理的、薬物動態学的または薬力学的特性、例えば、インビボ半減期、を与えるように調節できる。一部の実施形態では、レラキシンの半減期は、非改変ポリペプチドに対して、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90パーセント、2倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、50倍、または少なくとも約100倍延長される。

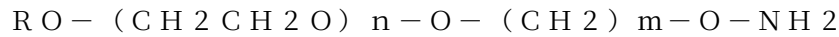
【0514】

強求核基（すなわち、ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミンまたはセミカルバジド）を含むPEG誘導体

本発明の一実施形態では、カルボニル含有天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシノポリペプチドが、PEG骨格に直接連結された末端ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド成分を含むPEG誘導体を使って改変される。

【0515】

一部の実施形態では、ヒドロキシルアミン末端PEG誘導体は、構造：



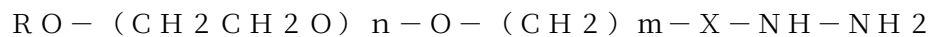
を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000（すなわち、平均分子量は、5～40kDa）である。

10

【0516】

一部の実施形態では、ヒドラジンまたはヒドラジド含有PEG誘導体は、構造：



を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000であり、Xは、任意選択で、カルボニル基（C=O）であるが、これは存在しても存在しなくてもよい。

20

【0517】

一部の実施形態では、セミカルバジド含有PEG誘導体は、構造：



を有し、

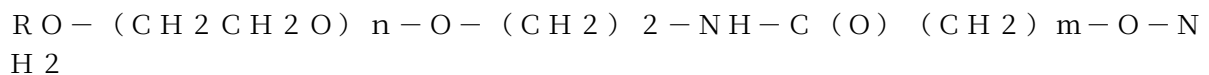
式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000である。

【0518】

本発明の別の実施形態では、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシノポリペプチドは、アミド結合によりPEG骨格に連結された末端ヒドロキシルアミン、ヒドラジド、ヒドラジン、またはセミカルバジド成分を含むPEG誘導体で改変される。

【0519】

一部の実施形態では、ヒドロキシルアミン末端PEG誘導体は、構造：



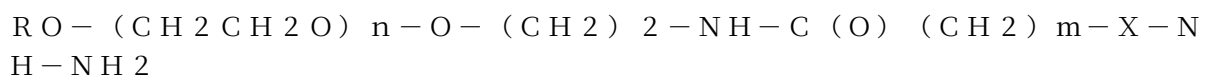
を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000（すなわち、平均分子量は、5～40kDa）である。

30

【0520】

一部の実施形態では、ヒドラジンまたはヒドラジド含有PEG誘導体は、構造：



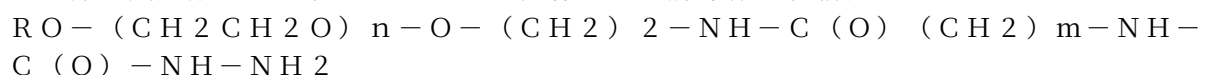
を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000であり、Xは、任意選択で、カルボニル基（C=O）であるが、これは存在しても存在しなくてもよい。

40

【0521】

一部の実施形態では、セミカルバジド含有PEG誘導体は、構造：



を有し、

50

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000である。

【0522】

本発明の別の実施形態では、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチドが、末端ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド成分を含み、分岐PEGの各鎖が10～40kDaの範囲（5～20kDaの範囲でもよい）のMWを有する分岐PEG誘導体で改変される。

【0523】

本発明の別の実施形態では、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドが、分岐構造を有するPEG誘導体で改変される。例えば、一部の実施形態では、

10

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)m-X-NH-NH_2$

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000であり、Xは、任意選択で、カルボニル基（C=O）であるが、これは存在しても存在しなくてもよい。

【0524】

一部の実施形態では、セミカルバジド基を含むPEG誘導体は、構造：

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)m-NH-C(O)-NH-NH_2$

20

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、Xは、任意選択で、NH、O、S、C(O)であるか、または存在せず、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000である。

【0525】

一部の実施形態では、ヒドロキシルアミン基を含むPEG誘導体は、構造：

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)m-O-NH_2$

を有し、

30

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、Xは、任意選択で、NH、O、S、C(O)であるか、または存在せず、mは、2～10であり、さらにnは、100～1,000である。

【0526】

水溶性ポリマーがレラキシンポリペプチドに連結する程度と部位は、レラキシンポリペプチド受容体に対するレラキシンポリペプチドの結合を調節できる。一部の実施形態では、結合は、レラキシンポリペプチド受容体に対しレラキシンポリペプチドが、平衡結合アッセイ、例えば、Spencer et al.、J. Biol. Chem.、263：7862～7867（1988）、に記載されている方法により測定して、約400nM以下のKdで、150nM以下のKdで、および場合によっては、100nM以下のKd

40

【0527】

ポリマーの活性化、ならびにペプチドのコンジュゲーションに対する方法と化学は、文献に記載されており、当技術分野で既知である。ポリマーの活性化によく使われる方法には、限定されないが、プロモシアン、過ヨウ素酸塩、グルタルアルデヒド、ビエポキシド、エピクロロヒドリン、ジビニルスルホン、カルボジイミド、ハロゲン化スルホニル、トリクロロトリアジン、等を使った官能基の活性化が含まれる（R. F. Taylor、（1991）、タンパク質固定化。基礎と応用（PROTEIN IMMOBILIZATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS）、Marcel Dekker、N. Y.；S. S. Wong、（1992）、タンパク質コンジュゲ

50

ションおよび架橋の化学 (CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING)、CRC Press、Boca Raton; G. T. Hermanson et al.、(1993)、親和性リガンド固定化技術 (IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES)、Academic Press、N. Y.; Dunn、R. L.、et al.、Eds. 高分子薬剤と薬剤デリバリーシステム (POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS)、ACS Symposium Series Vol. 469、American Chemical Society、Washington、D. C. 1991、を参照)。

【0528】

10

PEGの官能基化およびコンジュゲーションに関するいくつかの総説と論文が利用できる。例えば、Harris、Macromol. Chem. Phys. C25:325-373 (1985); Scouten、Methods in Enzymology 135:30-65 (1987); Wong et al.、Enzyme Microb. Technol. 14:866-874 (1992); Delgado et al.、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304 (1992); Zalipsky、Bioconjugate Chem. 6:150-165 (1995)、を参照されたい。

【0529】

20

また、ポリマー活性化の方法は、国際公開第94/17039号、米国特許第5、324、844号、国際公開第94/18247号、同94/04193号、米国特許第5、219、564号、米国特許第5、122、614号、国際公開第90/13540号、米国特許第5、281、698号、および国際公開第93/15189号で見つけることができ、活性化ポリマーと酵素の間のコンジュゲーションの方法は、限定されないが、凝固因子VII (国際公開第94/15625号)、ヘモグロビン (国際公開第94/09027号)、酸素運搬分子 (米国特許第4、412、989号)、リボヌクレアーゼおよび超酸化物ジスムターゼ (Veronese et al.、App. Biochem. Biotech. 11:141-52 (1985))、等で見つけることができる。全ての引用文献と特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【0530】

p-アジド-L-フェニルアラニン等の天然ではコードされないアミノ酸を含むレキシシンポリペプチドのペグ化 (すなわち、いずれかの水溶性ポリマー付加) は、いずれかの都合のよい方法で行われる。例えば、レキシシンポリペプチドは、アルキン末端mPEG誘導体を使ってペグ化される。簡単に述べると、過剰の固体mPEG (5000)-O-CH₂-C≡CHが、p-アジド-L-Phe-含有レキシシンポリペプチドの水溶液に、攪拌を加えながら室温で添加される。典型的には、水溶液は、反応が行われるべきpH (一般的には、約pH4~10) 近傍のpKaを有する緩衝液で緩衝化される。pH7.5でのペグ化のための適切な緩衝剤の例には、例えば、限定されないが、HEPES、リン酸塩、ホウ酸塩、トリス-HCl、EPPS、およびTESが含まれる。pHは、連続してモニターされ、必要に応じ、調節される。反応は、通常、約1~48時間継続させる。

40

【0531】

反応産物は、その後、疎水性相互作用クロマトグラフィーに供せられ、遊離mPEG (5000)-O-CH₂-C≡CHおよび非ブロック化PEGが分子の両端で活性化されると、レキシシンポリペプチド変異体分子と架橋を形成する可能性がある全てのペグ化レキシシンポリペプチドの高分子量複合体から、ペグ化レキシシンポリペプチド変異体が分離される。疎水性相互作用クロマトグラフィーの条件は、遊離mPEG (5000)-O-CH₂-C≡CHがカラムを通過し、一方、1つまたは複数のPEG基にコンジュゲートされた1つのレキシシンポリペプチド変異体分子を含む所望の構成物の後で、全ての架

50

橋されたペグ化レラキシシポリペプチド変異体複合体が溶出する条件である。適切な条件は、所望のコンジュゲートに対する架橋した複合体の相対的大きさに応じて変化し、当業者によって容易に決定される。所望のコンジュゲートを含む溶出液は、限外濾過で濃縮され、透析濾過により脱塩される。

【0532】

必要に応じ、疎水性のクロマトグラフィーから得たペグ化レラキシシポリペプチドは、当業者に既知の1つまたは複数の方法によりさらに精製できる。この方法には、限定されないが、親和性クロマトグラフィー；陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー（限定されないが、DEAEセファロースを使って）；シリカクロマトグラフィー；逆相HPLC；ゲル濾過（限定されないが、セファデックスG-75を使って）；疎水性相互作用クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー；限外濾過／透析濾過；エタノール沈殿；硫酸アンモニウム沈殿法；等電点電気泳動；置換クロマトグラフィー；電気泳動による方法（限定されないが、分取等電点電気泳動）、差分溶解度（限定されないが、硫酸アンモニウム沈殿法を含む）、または抽出が含まれる。見かけ分子量は、球状タンパク質標準に対する比較によりGPCから推定できる（Preneta, A Z、タンパク質精製法、実践的手法（PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH）（Harris & Angal, Eds.）IRL Press 1989、293-306）。レラキシシ-PEGコンジュゲートの純度は、タンパク質分解（限定されないが、トリプシン切断を含む）と、それに続く質量分析により評価できる。Pepinsky RB、
et al、J、Pharmacol. & Exp. Ther. 297（3）：1059-66（2001）。

【0533】

本発明のレラキシシポリペプチドのアミノ酸に連結された水溶性ポリマーは、制限無く、さらに誘導体化できる。

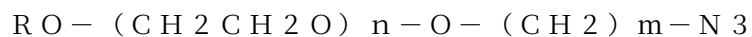
【0534】

アジド含有PEG誘導体

本発明の別の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、天然ではコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアルキン成分と反応するアジド成分を含むPEG誘導体を使って改変される。一般的に、PEG誘導体は、1～100 kDaの範囲の、また、一部の実施形態では、10～40 kDaの範囲の平均分子量を有する。

【0535】

一部の実施形態では、アジド末端PEG誘導体は、構造：

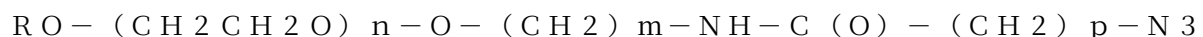


を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらに、nは、100～1,000（すなわち、平均分子量は5～40 kDa）である。

【0536】

別の実施形態では、アジド末端PEG誘導体は、構造：



を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、pは、2～10であり、さらに、nは、100～1,000（すなわち、平均分子量は5～40 kDa）である。

【0537】

本発明の別の実施形態では、アルキン含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチドは、末端アジド成分を含む分岐PEG誘導体で改変される。この分岐PEGの各鎖は、10～40 kDaの範囲のMWで、5～20 kDaの範囲のMWであってもよい。例えば、一部の実施形態では、アジド末端PEG誘導体は、下記の構造：

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)m-X-(CH_2)_pN_3$

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、pは、2～10であり、nは、100～1,000であり、さらに、Xは任意選択で、O、N、Sまたはカルボニル基（C=O）であり、それぞれのケースで、存在しても、存在しなくてよい。

【0538】

アルキン含有PEG誘導体

本発明の別の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、天然ではコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアジド成分と反応するアルキン成分を含むPEG誘導体で改変される。

10

【0539】

一部の実施形態では、アルキン末端PEG誘導体は、下記の構造：

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、さらに、nは、100～1,000（すなわち、平均分子量は5～40kDa）である。

【0540】

20

本発明の別の実施形態では、アルキン含有の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシシポリペプチドは、アミド結合によりPEG骨格に連結された末端アジドまたは末端アルキン成分を含むPEG誘導体で改変される。

【0541】

一部の実施形態では、アルキン末端PEG誘導体は、下記の構造：

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、pは2～10であり、さらに、nは、100～1,000である。

30

【0542】

本発明の別の実施形態では、アジド含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチドは、末端アルキン成分を含む分岐PEG誘導体で改変される。分岐PEGの各鎖は、10～40kDaの範囲のMWを有し、5～20kDaの範囲のMWであってもよい。例えば、一部の実施形態では、アルキン末端PEG誘導体は、下記の構造：

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)m-X-(CH_2)_pC\equiv CH$

を有し、

式中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピル、等）であり、mは、2～10であり、pは、2～10であり、nは、100～1,000あり、さらに、Xは、任意選択で、O、N、Sもしくはカルボニル基（C=O）であるか、または存在しない。

40

【0543】

ホスフィン含有PEG誘導体

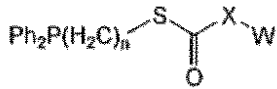
本発明の別の実施形態では、レラキシシポリペプチドは、天然ではコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアジド成分と反応するアリールホスフィン基をさらに含む活性化官能基（限定されないが、エステル、炭酸塩を含む）を含むPEG誘導体で改変される。一般的に、PEG誘導体は、1～100kDaの範囲、一部の実施形態では、10～40kDaの範囲の平均分子量を有する。

【0544】

一部の実施形態では、PEG誘導体は、構造：

50

【化 4 8】



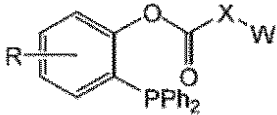
を有し、

式中、nは、1～10であり；XはO、N、Sであっても、存在しなくてもよく、Phは、フェニルであり、さらに、Wは、水溶性ポリマーである。

【0545】

一部の実施形態では、PEG誘導体は、構造：

【化 4 9】



を有し、

式中、Xは、O、N、Sであっても、存在しなくてもよく、Phは、フェニルであり、Wは、水溶性ポリマーであり、さらに、Rは、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリール基であってもよい。代表的R基には、限定されないが、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ および $-\text{NO}_2$ が含まれる。R'、R''、R'''およびR''''は、それぞれ、独立に、水素、置換または未置換ヘテロアルキル、置換または未置換アリール（限定されないが、1～3ハロゲンで置換されたアリール置換を含む）、置換または未置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を意味する。本発明の化合物が、2つ以上のR基を含む場合には、例えば、2つ以上のR'、R''、R'''およびR''''基が存在する場合に、各R基が、それぞれR'、R''、R'''およびR''''基であるように独立に選択される。R'およびR''が、同じ窒素原子に結合される場合は、それらは、窒素原子と組み合わせられ、5、6、または7員環を形成することができる。例えば、 $-\text{NR}'\text{R}''$ は、限定されないが、1-ピロリジニルおよび4-モルフォリニルを含むことが意図されている。置換基の上記考察から、当業者なら、用語の「アルキル」が、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基、例えば、ハロアルキル（限定されないが、 $-\text{CF}_3$ および $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ を含む）およびアシル（限定されないが、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、等を含む）を含むことが意図されていることを理解されよう。

【0546】

他のPEG誘導体および一般的ペグ化技術

レラキシシポリペプチドに連結できる他の代表的PEG分子、ならびにペグ化方法には、限定されないが、例えば、下記特許に記載のものが含まれる：米国特許公開第2004/0001838号；同2002/0052009号；同2003/0162949号；同2004/0013637号；同2003/0228274号；同2003/0220447号；同2003/0158333号；同2003/0143596号；同2003/0114647号；同2003/0105275号；同2003/0105224号；同2003/0023023号；同2002/0156047号；同2002/0099133号；同2002/0086939号；同2002/0082345号；同2002/0072573号；同2002/0052430号；同2002/0040076号；同2002/0037949号；同2002/0002250号；同2001/0056171号；同2001/0044526号；同2001/0021763号；米国特許第6,646,110号；同5,824,778号；同5,476,653号；同5,219,564号；同5,629,384号；同5,736,625号；同4,902,502号；同5,281,698号；同5,122,614号；同5,473,034号；同5,516,673号；同5,382,657号；同6,552,167号；同6,61

10

20

30

40

50

0, 281号;同6, 515, 100号;同6, 461, 603号;同6, 436, 386号;同6, 214, 966号;同5, 990, 237号;同5, 900, 4615, 739, 208号;同5, 672, 662号;同5, 446, 090号;同5, 808, 096号;同5, 612, 460号;同5, 324, 844号;同5, 252, 714号;同6, 420, 339号;同6, 201, 072号;同6, 451, 346号;同6, 306, 821号;同5, 559, 213号;同5, 747, 646号;同5, 834, 594号;同5, 849, 860号;同5, 980, 948号;同6, 004, 573号;同6, 129, 912号;国際公開第97/32607号;欧州特許第229, 108号;同402, 378号;国際公開第92/16555号;同94/04193号;同94/14758号;同94/17039号;同94/18247号;同94/28024号;同95/00162号;同95/11924号;同95/13090号;同95/33490号;同96/00080号;同97/18832号;同98/41562号;同98/48837号;同99/32134号;同99/32139号;同99/32140号;同96/40791号;同98/32466号;同95/06058号;欧州特許第439508号;国際公開第97/03106号;同96/21469号;同95/13312号;欧州特許第921131号;国際公開第98/05363号;欧州特許第809996号;国際公開第96/41813号;同96/07670号;欧州特許第605963号;同510356号;同400472号;同183503号および同154316号。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。本明細書記載のいずれのPEG分子も、限定されないが、単鎖、分岐鎖、分岐鎖、単官能性、二官能性、多官能性、またはこれらのいずれかの組み合わせを含むいずれの形ででも使用可能である。

10

20

【0547】

追加のポリマーおよびPEG誘導体には、限定されないが、ヒドロキシルアミン（アミノオキシ）PEG誘導体が含まれ、下記の特許に記載されている（これら全ては、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）：米国特許公開第2006/0194256号、同2006/0217532号、同2006/0217289等、米国特許仮出願第60/755, 338号;同60/755, 711号;同60/755, 018号;国際出願第PCT/US06/49397号;国際公開第2006/069246号;米国特許仮出願第60/743, 041号;同60/743, 040号;国際出願第PCT/US06/47822号;米国特許仮出願第60/882, 819号;同60/882, 500号;および同60/870, 594号。

30

【0548】

異種のFc融合タンパク質

上述のレキシシン化合物は、直接に、またはペプチドリンカーを介して免疫グロブリンのFc部に融合してもよい。免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって一緒に保持されたポリペプチド鎖を含む、典型的には、2つの軽鎖と2つの重鎖を有する、分子である。各鎖では、1つのドメイン（V）が、分子の抗体特異性に応じて、可変アミノ酸配列を有する。もう一つのドメイン（C）は、逆に同じクラスの分子に共通な定常配列を有する。

。

【0549】

40

本明細書で使用されるように、免疫グロブリンのFc部は、免疫学の分野の用語に通常与えられる意味を有する。具体的には、この用語は、抗体から2つの抗原結合領域（Fab断片）を除くことにより得られる抗体断片を指す。Fab断片を除く1つの方法は、免疫グロブリンをパインプロテアーゼで消火することである。従って、Fc部は、両重鎖由来の定常領域の凡そ同じ大きさの断片から形成され、非共有結合性相互作用およびジスルフィド結合を介して結合する。Fc部分は、ヒンジ部を含み、CH2とCH3ドメインを通して抗体のC末端まで広がることができる。ヒトおよびマウス免疫グロブリンの代表的ヒンジ部は、抗体エンジニアリング、実用ガイド（Antibody Engineering、A Practical Guide）、Borrebæck、C. A. K. ed.、W. H. Freeman and Co.、1992、で見つけることができ

50

る。ここでの教示は、参照によって本明細書に組み込まれる。F c 部分は、1つまたは複数のグリコシル化部位をさらに含むことができる。ヒンジ部、C H 2 および C H 3 ドメイン、ならびに1つのN-グリコシル化部位を含む多くの代表的F c タンパク質のアミノ酸配列は、当技術分野でよく知られている。

【0550】

異なるエフェクター機能および薬物動態学的特性を有する5つの型のヒト免疫グロブリンF c 領域：I g G、I g A、I g M、I g D、およびI g Eが存在する。I g Gは、血清中に最も多い免疫グロブリンである。I g Gは、また、全免疫グロブリン中で血清中最長半減期（23日）を有する。他の免疫グロブリンとは異なり、I g Gは、F c 受容体への結合後、効率的に再循環される。4つのI g Gサブクラス：G 1、G 2、G 3、およびG 4があり、それぞれが異なるエフェクター機能を有する。G 1、G 2、およびG 3は、C 1 q 結合し、補体を固定することができるが、一方、G 4はそれができない。G 3がG 1より効率的にC 1 q に結合できたとしても、G 1は、補体直接細胞溶解の媒介に関し、より効率的である。G 2は、非常に効率的に補体を固定する。I g GのC 1 q 結合部位は、C H 2 ドメインのカルボキシ末端領域に位置している。

10

【0551】

全てのI g Gサブクラスは、F c 受容体（C D 1 6、C D 3 2、C D 6 4）に結合でき、G 1およびG 3が、G 2およびG 4より効率的である。I g GのF c 受容体結合領域は、両ヒンジ部およびC H 2 ドメインのカルボキシ末端領域に位置する残基により形成される。

20

【0552】

I g Aは、モノマーおよびJ-鎖により一緒に保持されるダイマー型の両方で存在できる。I g Aは、血清中で2番目に多いI g であるが、半減期は6日に過ぎない。I g Aは、3つのエフェクター機能を有する。それは、マクロファージおよび好酸球（それぞれ、食作用および脱顆粒の働きをする）上のI g A特異的受容体に結合する。それは、また、未知の代替経路を介して、補体を固定することができる。

【0553】

I g Mは、ペンタマーまたはヘキサマーとして発現し、これら両方共、J-鎖により一緒に保持されている。I g Mは、5日の血清半減期を有する。それは、C H 3 ドメイン中にある結合部位を介してC 1 q に弱く結合をする。I g Dは、3日の血清半減期を有する。何のエフェクター機能がこのI g に寄与可能かは明確ではない。I g Eは、モノマーI g で、2.5日の血清半減期を有する。I g Eは、2つのF c 受容体に結合し、これらの受容体は、脱顆粒を行わせ、炎症促進性物質の放出を生ずる。

30

【0554】

所望のインビボ効果に応じて、本発明の異種の融合タンパク質は、上述のアイソタイプのいずれかを含むことができ、または補体および／またはF c 受容体結合機能が変わっている変異F c 領域を含むこともできる。従って、本発明の異種融合タンパク質は、免疫グロブリンの全F c 部、免疫グロブリンのF c 部の断片、またはインターフェロンベータ化合物に融合されたそれらの類似体を含んでもよい。

【0555】

本発明の融合タンパク質は、単鎖タンパク質から、または多連鎖ポリペプチドとして構成される。2つ以上のF c 融合タンパク質は、それらが、F c 領域間で天然に形成されているジスルフィド結合を介して相互作用するように作ることができる。これらのマルチマーは、融合タンパク質のF c 部分のN末端に融合されたインターフェロンベータ化合物に対して同質であってもよく、または異質のインターフェロンベータ化合物を含んでいてもよい。

40

【0556】

融合タンパク質の最終構造に関係なく、F c またはF c 様領域は、N末端で融合されたインターフェロンベータ化合物のインビボ血漿半減期を延長する役割をすることができる。また、融合タンパク質化合物のインターフェロンベータ成分は、インターフェロンベータ

50

タの少なくとも1つの生物活性を保持していなければならない。治療上のまたは循環半減期の増加は、本明細書記載のまたは当技術分野で既知の方法を使って立証することができる。この場合、融合タンパク質の半減期がインターフェロンベータ化合物単独の半減期と比較される。生物活性は、当技術分野で既知のインビトロおよびインビボ方法により測定できる。

【0557】

タンパク質分解により作られたIgG Fc領域は、インタクトIgG分子と同じインビボ半減期を有し、Fab断片は、急速に分解するので、半減期を延長する関連配列は、CH2および／またはCH3ドメイン中に存在すると考えられている。さらに、高親和性Fc受容体またはC1qに結合しないIgG変異体の異化率は、親野性型抗体のクリアランス速度からは判別不能であり、異化の部位は、Fc受容体またはC1q結合に関与する部位とは異なることを示すことが、文献で示されている[Wawrzyniczak et al.、(1992) Molecular Immunology 29:221]。マウスIgG1 Fc領域を使った部位特異的変異誘発調査は、異化率を制御するIgG1 Fc領域の部位は、CH2-CH3ドメイン界面に位置することを示唆した。Fc領域は、異化部位で改変し、融合タンパク質の半減期を最適化することができる。本発明の融合タンパク質に使われるFc領域は、IgG1由来でも、またはIgG4 Fc領域由来でもよく、ヒンジ部を含むCH2およびCH3領域の両方を含んでもよい。

【0558】

—異種アルブミン融合タンパク質

本明細書記載のレラキシンは、直接またはペプチドリンカー、水溶性ポリマー、もしくはプロドラッグリンカーを介してアルブミンまたはそれらの類似体、断片、もしくは誘導体に融合されてもよい。一般的に、本発明の融合タンパク質の一部であるアルブミンタンパク質は、ヒトを含むいずれの種からのクローン化アルブミン由来であってもよい。人血清アルブミン(HSA)は、66,500の式量を有する585アミノ酸の単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖から構成される。ヒトHASのアミノ酸配列は既知である[Meloun, et al. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, et al. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, et al. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747参照、これらは、参照によって本明細書に組み込まれる]。アルブミンの種々の多形変異体ならびに類似体および断片が記載されている[Weitkamp, et al.、(1973) Ann. Hum. ジェネット. 37:219を参照]。例えば、欧州特許第322,094号では、種々のより短い形のHSAが記載されている。これらのHSA断片のいくつかは、開示されており、HSA(1-373)、HSA(1-388)、HSA(1-389)、HSA(1-369)、およびHSA(1-419)ならびに1-369および1-419の間の断片が含まれる。欧州特許第399,666号は、HSA(1-177)およびHSA(1-200)ならびに断片HSA(1-177)およびHSA(1-200)間の断片を含むアルブミン断片を開示している。

【0559】

本発明の異種融合タンパク質は、断片、類似体、および誘導体を含むいずれかのアルブミンタンパク質に結合したレラキシン化合物を含み、このような融合タンパク質は、生物学的に活性であり、レラキシン化合物単独よりも長い血漿半減期を有することは理解されよう。従って、融合タンパク質のアルブミン部は、必ずしも天然ヒトアルブミンと等しい血清半減期を有することを必要としない。天然ヒトアルブミンおよび対象レラキシン化合物の半減期に対し、より長い半減期、または中間的な半減期を有する断片、類似体、および誘導体が既知であるか、または生成される可能性がある。

【0560】

本発明の異種の融合タンパク質は、レラキシン化合物中、および／または融合タンパク質のFcまたはアルブミン部中に、保存的アミノ酸置換を有するタンパク質を包含する。

「保存的置換」は、アミノ酸の、同じ正味電子電荷および凡そ同じ大きさと形を有する別のアミノ酸との置換である。脂肪族または置換脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、側鎖中の炭素およびヘテロ原子合計数が、約4未満だけ異なる場合は、凡そ同じ大きさを有する。側鎖中の分岐部の数が、1つ未満だけ異なる場合は、それらはほぼ同じ形を有する。側鎖中にフェニルまたは置換フェニル基を有するアミノ酸は、凡そ同じ大きさと形を有すると考えられる。他に特に本明細書で提供される場合を除いて、保存的置換は、天然アミノ酸で行われるのが好ましい。

【0561】

野性型アルブミンおよび免疫グロブリンタンパク質は、種々のソースから入手可能である。例えば、これらのタンパク質は、検出可能レベルで対象mRNAを発現する組織または細胞から調製されたcDNAライブラリーから入手できる。ライブラリーは、特定の対象タンパク質に対する公表されたDNAまたはタンパク質配列を使って設計されたプローブで選別できる。例えば、免疫グロブリン軽鎖または重鎖定常領域は、Adams, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Gough et al. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027-6031; Rice et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) *Nature* 298:286-288; およびMorrison, et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256、に記載されている。アルブミンタンパク質およびDNA配列を開示しているいくつかの文献には、Meloun, et al. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et al. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; およびMinghetti, et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747、が含まれる。

【0562】

本発明の異種融合タンパク質のキャラクタリゼーション

本発明の融合タンパク質をキャラクタライズする多くの方法が存在する。これらの方法の一部には、限定されないが：タンパク質染色方法と組み合わせたSDS-PAGE、または抗IgGまたは抗HSA抗体を使ったイムノブロッティング、が含まれる。他の方法には、例えば、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化質量分析(MALDI-MS)、液体クロマトグラフィー／質量分析、等電点電気泳動、分析陰イオン交換、等電点電気泳動、および円偏光二色性、が含まれる。

【0563】

血清アルブミンに対する親和性強化

また、種々の分子を本発明のレラキシンポリペプチドに融合し、レラキシンポリペプチドの血清半減期を調製できる。一部の実施形態では、分子は、本発明のレラキシンポリペプチドに連結または融合され、動物中の内在性血清アルブミンに対する親和性を強化する。

【0564】

例えば、一部のケースでは、レラキシンポリペプチドおよびアルブミン結合配列の組換え融合体が作られ、代表的アルブミン結合配列には、限定されないが、レンサ球菌Gタンパク質由来のアルブミン結合ドメイン(例えば、Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) およびSjolander et al., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997) 参照)、またはアルブミン結合ペプチド、例えば、Dennis, et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) に記載のものが含まれる。

【0565】

他の実施形態では、本発明のレラキシンポリペプチドは、脂肪酸でアシル化される。一部のケースでは、脂肪酸が血清アルブミンに対する結合を促進する。例えば、Kurtzhals, et al., Biochem. J. 312: 725-731 (1995) を参照されたい。

【0566】

他の実施形態では、本発明のレラキシンポリペプチドは、血清アルブミン（限定されないが、人血清アルブミンを含む）に直接融合される。当業者なら、各種の他の分子もまた、本発明のレラキシンに連結され、血清アルブミンまたは他の血清成分への結合を調節できることに気付くであろう。

【0567】

レラキシンポリペプチドのグリコシル化

本発明は、1つまたは複数のサッカライド残基を有する天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドを含む。サッカライド残基は、天然（限定されないが、N-アセチルグルコサミンを含む）でも、または非天然（限定されないが、3-フルオロガラクトースを含む）であってもよい。糖類は、天然ではコードされないアミノ酸に、NまたはO結合型グリコシド結合（限定されないが、N-アセチルガラクトース-L-セリンを含む）でも、または非天然結合（限定されないが、オキシムまたは対応するC-またはS-連結グリコシド）で結合してもよい。

【0568】

サッカライド（限定されないが、グリコシルを含む）成分は、レラキシンポリペプチドにインビボまたはインビトロで付加できる。本発明の一部の実施形態では、カルボニル含有の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドは、アミノオキシ基で誘導体化したサッカライドで改変され、オキシム結合を介して連結された対応するグリコシル化ポリペプチドを生成する。天然ではコードされないアミノ酸に結合するとすぐに、サッカライドは、グリコシルトランスフェラーゼおよび他の酵素を使った処理によりさらに仕上げられ、レラキシンポリペプチドに結合したオリゴ糖を生成することができる。例えば、H. Liu, et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)、を参照されたい。

【0569】

本発明の一部の実施形態では、カルボニル含有天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドは、アミノオキシ誘導体として調製された確定した構造を有するグリカンで直接改変される。当業者なら、他の官能性、例えば、アジド、アルキン、ヒドラジド、ヒドラジン、およびセミカルバジドが、サッカライドを天然ではコードされないアミノ酸に連結させるために使用できることに気付くであろう。

【0570】

本発明の一部の実施形態では、アジドまたはアルキニル含有天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドが、次に、限定されないが、それぞれ、アルキニルまたはアジド誘導体を使った、限定されないが、Huisgen [3+2] 付加環化反応により改変できる。この方法は、タンパク質の非常に高い選択性での改変を可能とする。

【0571】

レラキシンドダイマーおよびマルチマー

本発明は、また、は、また、レラキシンおよびレラキシン類似体の組み合わせ、例えば、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマー（すなわち、トライマー、テトラマー、等）を提供し、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンが、別のレラキシンもしくはそのレラキシン変異体またはレラキシンもしくはそのレラキシン変異体ではないいずれかの他のポリペプチドに、ポリペプチド骨格に直接的にまたはリンカーを介して結合している。モノマーに比べて、増加した分子量のために、レラキシンドダイマーまたはマルチマーコンジュゲートは、新しいまたは望ましい特性を示すことができ、これには、限定されないが、モノマーレラキシンに比べて、異なる薬理学的、薬物動態学的、薬力学的、調節された治療の半減期、または調節され

10

20

30

40

50

た血漿半減期が含まれる。モノマーレラキシン類似体の例に関しては、例えば、Balschmidt、P.、et al.、1992年11月17日発行米国特許第5,164,366号；Brange、J.、et al.、1997年4月8日発行米国特許第5,618,913号；Chance、R. E.、et al.、1996年5月7日発行米国特許第5,514,646号；およびErtl、J.、et al.、1998年12月23日発行欧州特許第885,961号、を参照されたい。本発明の一部の実施形態は、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸残基を含むモノマーレラキシン類似体を提供し、また、一部の実施形態では、これらは、位置B28が、Asp、Lys、Ile、Leu、ValまたはAlaであり、位置B29のアミノ酸残基は、LysまたはProであるモノマーレラキシン類似体；Lys(B28)Pro(B29)-ヒトレラキシンを有するモノマーレラキシン類似体；モノマーレラキシン類似体Asp(B28)-ヒトレラキシン；およびモノマーレラキシン類似体Lys(B3)Ile(B28)-ヒトレラキシン、を含む。一部の実施形態では、本発明のレラキシンドダイマーがレラキシン受容体のシグナル伝達を調節する。他の実施形態では、本発明のレラキシンドダイマーまたはマルチマーが、レラキシン受容体アンタゴニスト、アゴニスト、またはモジュレーターとして作用する。

【0572】

一部の実施形態では、ダイマーまたはマルチマーを含むレラキシン中に存在する1つまたは複数のレラキシン分子は、水溶性ポリマーに連結された天然ではコードされないアミノ酸を含む。

【0573】

一部の実施形態では、レラキシンポリペプチドは、限定されないが、Asn-Lysアミド結合またはCys-Cysジスルフィド結合等を介して直接に連結される。一部の実施形態では、レラキシンポリペプチド、および／または連結非レラキシン分子は、ダイマー化を促進するために別々の天然ではコードされないアミノ酸を含み、限定されないが、第1のレラキシンポリペプチドの1つの天然ではコードされないアミノ酸中のアルキンおよび第2の分子の第2の天然ではコードされないアミノ酸中のアジドがHuisgen[3+2]付加環化を介してコンジュゲートされる。あるいは、レラキシン、および／またはケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を含む連結非レラキシン分子は、ヒドロキシルアミン含有天然ではコードされないアミノ酸を含む第2のポリペプチドにコンジュゲートされることができ、そのポリペプチドは、対応するオキシムの形成を介して反応する。

【0574】

あるいは、2つのレラキシンポリペプチド、および／または連結非レラキシン分子は、リンカーを介して連結される。いずれかのヘテロまたはホモ二官能性リンカーは、2つの分子、および／または連結非レラキシン分子を連結するために使用でき、それらの分子は同じ一次配列を持っても、異なる一次配列を持っていいてもよい。一部のケースでは、レラキシン、および／または連結非レラキシン分子を一緒に繋ぎ止めるために使用されるリンカーは、二官能性PEG試薬であってもよい。リンカーは、広い範囲の分子量または分子長を持つことができる。より大きな、またはより小さな分子量リンカーは、レラキシンおよび連結実体間またはレラキシンおよびその受容体間、または、もしあれば、連結実体およびその結合相手間の、所望の空間関係または高次構造を提供するのに使用できる。より長い、またはより短い分子長を有するリンカーは、また、レラキシンおよび連結実体間、または、もしあれば、連結実体およびその結合相手間の所望の空隙または柔軟性を与えるのに使用できる。

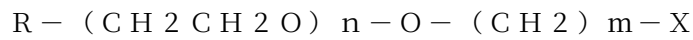
【0575】

一部の実施形態では、本発明は、ダンベル構造を有する水可溶性二官能性リンカーを提供し、これは、下記を含む：a) ポリマー骨格の第1の末端の少なくともアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはカルボニル含有成分；およびb) ポリマー骨格の第2の末端の少なくとも第2の官能基。第2の官能基は、第1の官能

基と同じであっても、異なってもよい。第2の官能基は、一部の実施形態では、第1の官能基と反応しない。一部の実施形態では、本発明は、分岐分子構造の少なくとも1つのアームを含む水可溶性化合物を提供する。例えば、分岐分子構造は、樹状であってもよい。

【0576】

一部の実施形態では、本発明は、水溶性活性化ポリマーとの反応により形成された1つまたは複数のレラキシシポリペプチドを含むマルチマーを提供する。前記水溶性活性化ポリマーは、構造：



を有し、

式中、nは、約5～3,000であり、mは、2～10であり、Xは、アジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、アミノオキシ基、ヒドロキシルアミン、アセチル、またはカルボニル含有成分であってもよく、さらに、Rは、キャッピング基、官能基、または脱離基で、これらは、Xと同じでも異なってもよい。Rは、例えば、下記からなる群より選択される官能基であってもよい：ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アルコキシル、N-ヒドロキシサクシニミジルエステル、1-ベンゾトリアゾリルエステル、N-ヒドロキシサクシニミジル炭酸塩、1-ベンゾトリアゾリル炭酸塩、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリラート、メタクリラート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護アミン、ヒドラジド、保護されたヒドラジド、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、イソシアナート、イソチオシアナート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサル、ジオン、メシラート、トシラート、およびトレシラート、アルケン、およびケトン。

【0577】

レラキシシポリペプチドの活性およびレラキシシ受容体に対するレラキシシポリペプチドの親和性の測定

レラキシシポリペプチド活性は、標準的または既知のインビトロまたはインビボアッセイを使って測定できる。レラキシシポリペプチドは、当技術分野で既知の適切な方法により、生物活性を分析できる。このようなアッセイには、限定されないが、インターフェロン（「IFN」）応答遺伝子活性化、受容体結合アッセイ、抗ウイルス活性アッセイ、細胞変性阻止アッセイ、（Famillietti et al., Meth. Enzymol. 78:387-394）、抗増殖性アッセイ、（Aebersold and Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582）、免疫調節アッセイ（米国特許第4,914,033号；同4,753,795号）、およびMeager, J. Immunol. Meth., 261:21-36（2002）に記載されているような、MHC分子の誘導をモニターするアッセイ（例えば、Hokland et al., Meth. Enzymol. 119:688-693）、が含まれる。

【0578】

3T3-L1脂肪細胞のブドウ糖取込は、下記の方法を使って評価できる。3T3-L1細胞をアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC, Rockville, Md.）から入手する。細胞をダルベッコ変法イーグル培地中に10%鉄富化胎仔ウシ血清を含む増殖培地（GM）中で培養する。標準的脂肪細胞分化のために、細胞が培養密度に到達した2日後（day0と呼ぶ）、10%胎仔ウシ血清、10μg/mlのレラキシシ、1μMデキサメタゾン、および0.5μMイソブチルメチルキサンチンを含む分化培地（DM）に、細胞を48時間接触させる。次に、10%ウシ胎仔血清、および10μg/mlのレラキシシを含む分化後培地中で細胞を維持する。インビトロ効力は、当業者に既知のブドウ糖取込アッセイで測定できる。インビトロ効力は、細胞ベースアッセイにおけるレラキシシ化合物のブドウ糖取込測定値として定義され、レラキシシ化合物の生物学的効力の尺度である。それは、EC50として表現でき、これは、単一用量反応実験で50%活性を生ずる化合物の有効濃度である。

【0579】

0. 1 mM 2-デオキシ-D-[14C] ブドウ糖の蓄積によりアッセイされる、ブドウ糖輸送アッセイ—レラキシン依存性—ヘキソース取込は、以下のように測定される：12 ウェルプレートに入れた 3T3-L1 脂肪細胞を、37℃に暖めた、0. 2% BSA 含有 KRP 緩衝液 (136 mM NaCl、4. 7 mM KCl、10 mM NaPO₄、0. 9 mM CaCl₂、0. 9 mM MgSO₄、pH 7. 4) で 2 回洗浄後、0. 2% BSA を含む リボビット L-15 培地中で 37℃、2 時間、室内気中でインキュベートし、再度 0. 2% BSA 緩衝液を含む KRP で 2 回洗浄した後、KRP、0. 2% BSA 緩衝液中で、ワートマニン非存在 (Me2SO のみ) 下、またはワートマニン存在下、37℃で 30 分間、室内気中でインキュベートした。次に、レラキシンを加えて、100 nM の最終濃度にし、15 分間保持し、最後の 4 分間で、2-デオキシ-D-[14C] ブドウ糖の取込を測定する。10 μM サイトカラシン B の存在下測定した非特異的取込を、全体値から差し引いた。タンパク質濃度を Pierce ビシニコニン酸アッセイで測定する。取込は常に、実験毎に、3 回または 4 回繰り返して測定される。レラキシンの存在下の 3T3-L1 脂肪細胞の FGF-21 による短期および長期前処理の効果を検討することができる。

10

【0580】

ブドウ糖輸送アッセイ—レラキシン非依存性—3T3-L1 繊維芽細胞を 96 ウェルプレートに播種し、2 週間、脂肪細胞 (脂肪細胞 (adipocyte)) に分化させる。分化後、それらを実験培地中で飢餓状態にさせ、本発明の種々のレラキシンポリペプチドで 24 時間処理する。処理に際し、細胞を 0. 1% BSA 含有 KRBH 緩衝液で 2 回洗浄する。標識ブドウ糖の存在下、KRBH 緩衝液中でブドウ糖取込を行う。これにより、本発明により産生された種々のレラキシンポリペプチドおよび類似体、ならびにペグ化されているもの (ペグ化が天然分子の効率の低下の原因であることがわかっている) の定性的評価が可能となり、また、異なるインスリンの効力を比較できる。さらに、エクスピボ組織モデルを使って、本発明のレラキシンポリペプチドが、ブドウ糖取込を誘導することが示される可能性がある。

20

【0581】

エクスピボブドウ糖輸送モデルでは、ブドウ糖輸送アッセイは、以下のように記載される：Krebs-Henseleit 緩衝液ストック溶液—ストック 1：NaCl (1. 16 M)；KCl (0. 046 M)；KH₂PO₄ (0. 0116 M)；NaHCO₃ (0. 0253 M)。ストック 2：CaCl₂ (0. 025 M)；MgSO₄ (2H₂O) (0. 0116 M)。BSA：ICN Cohn 画分 V、透析なしで直接に脂肪酸不含 BSA を使用。培地調製：50 ml の Krebs ストック 1 を 395 ml の dH₂O に添加し、95% O₂/5% CO₂ を含むガスを 1 時間流す。50 ml のストック 2 を加え、dH₂O で 500 ml にする。500 mg の ICN 脂肪酸不含 BSA を加える。プレインキュベーションおよびインキュベーション培地：32 mM マンニトール、8 mM ブドウ糖、洗浄培地：40 mM マンニトール、2 mM ビルビン酸塩。輸送培地：39 mM マンニトール、1 mM 2-DG；32 mM マンニトール、8 mM 3-O-MG。レラキシン溶液：(ブタレラキシン [Lilly] 100, 000, 000 μU/ml)：2000 μU/ml または 13. 3 nM の最終濃度。放射性標識培地調製：使用した特異的活性：2 DG = 1. 5 mCi/ml；3-O-MG = 437 μCi/ml；または、マンニトール = 8 μCi/ml。ラットを 0. 1 cc のネブタール/100 g 体重を使って麻酔する。筋肉組織を摘出し、0. 9% 食塩水ですすいだ後、プレインキュベーション培地 (2 ml) 中に 29℃で 1 時間置く。筋肉組織をインキュベーション培地 (2 ml；レラキシンまたは試験化合物を含むこと以外は、プレインキュベーションと同じ) に移し、30 分間インキュベートする (実験条件に依存する)。その後、筋肉組織を、移し、29℃で、培地 (2 ml) を使って 10 分間洗浄し、次に、標識培地 (1. 5 ml) に移し、10 分間 (3-O-MG) または 20 分間 (2 DG) 保持する。筋肉組織をトリミングし、秤量して、ドライアイス上のポリプロピレンチューブに入れる。1 ml の 1N KOH をチューブに加

30

40

50

え、10～15分間、70℃の水浴中に置き、数分毎にチューブをボルテックスする。チューブを氷上で冷却し、1mlの1N HClを加え、よく混合する。200μlの上清を二通りにシンチレーションバイアルに入れ、既知の放射能基準と比較してシンチレーションカウンターでカウントする。

【0582】

収縮のため、プレインキュベーション／インキュベーション培地中で筋肉を最初1時間インキュベートする。1時間後、各対（ラット当たり1対）の1つの筋肉を刺激装置にピン留めし、もう一方の筋肉をインキュベーション培地の入った新しいフラスコに移す。1トレイン0.1msecの各衝撃を使って70Hzの200msecトレインにより収縮した筋肉を刺激する。トレインは、1/secで、10～15Vで2x10分間送出し、1分安静を挟む。刺激時間の最後に、筋肉を刺激装置から取り出し、洗浄培地中に10分間置き、続けて、標識培地中に上記で大略述べたように置く。

10

【0583】

本発明のレラキシン、レラキシンポリペプチド、および／またはレラキシン類似体の平均量は、変わってもよいが、特に、有資格医師の推奨と処方に基づかなければならない。本発明のレラキシン、レラキシンポリペプチド、および／またはレラキシン類似体の正確な量は、治療される状態、治療される患者の状態の正確な型および／または重症度、ならびに組成物中の他の成分、等の因子に影響を受ける選択の問題である。本発明は、また、治療有効量の別の活性薬剤の投与を提供する。投与される量は、レラキシン、利用できるレラキシン治療法、および／または他のレラキシン類似体を使った治療に基づいて当業者により容易に決定できる。

20

【0584】

本発明の医薬組成物は、従来 방식으로製造可能である。

【実施例】

【0585】

以下の実施例は、例示のために提供されており、請求発明を制限するものではない。

【0586】

実施例1

この実施例は、天然ではコードされないアミノ酸のレラキシン中への組込み部位の可能な多くの選択基準セット中の1つを記載する。

30

【0587】

図1～4は、レラキシンの構造および配列を示し、下の表は、A鎖、B鎖、レラキシンおよびプロレラキシンを有する配列を含む。レラキシンポリペプチドは、天然でコードされるアミノ酸を天然ではコードされないアミノ酸で置換することにより生成された。各ポリペプチドは、パラアセチルフェニルアラニン（pAcFまたはpAF）で置換された1つのアミノ酸を有していた。生成ポリペプチドは、リーダー配列を欠き、A／B鎖レラキシンポリペプチド（配列番号1～3）であった。各生成ポリペプチドは、配列番号4の1、5、18、13、2の位置、または既知のレラキシン配列のいずれかのA鎖のこれらの位置、または配列番号5もしくは6の5、7、18、28と同じいずれかの既知のレラキシン配列のB鎖中の位置、の1つに、天然ではコードされないアミノ酸置換を有していた。図2は、PyMOLソフトウェア（DeLano Scientific; Palo Alto, CA）を使って標識されたヒトレラキシンおよび本発明のレラキシンポリペプチド中のパラアセチルフェニルアラニンで置換されたものに対応する一部のアミノ酸の構造を示す。

40

【0588】

タンパク質データベース、または他のデータベースからの結晶構造の使用と比較を含む、天然ではコードされないアミノ酸の組込みが好ましい部位の別の選択基準セットは、レラキシンの構造のモデル化に使用され、1）それらの受容体への結合を妨害しない、および2）タンパク質の内側に存在しないと思われる残基が特定される。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸が、限定されないが、1つまたは複

50

数のレラキシンの以下の位置に組み込まれる：配列番号4の1、5、18、13、2、またはいずれかの既知のレラキシン配列のA鎖のこれらの位置、または配列番号5もしくは6の5、7、18、28と同じいずれかの既知のレラキシン配列のB鎖中の位置。

【0589】

以下の基準を使って、天然ではコードされないアミノ酸の導入のためのレラキシンおよびレラキシン類似体の各位置を評価した：残基は（a）構造分析に基づいて判断して、受容体への結合を妨害してはならない、b）アラニンまたは相同体系統の変異導入法による変異導入を受けていてはならない（c）表面が露出し、さらに周辺残基との最小限のファンデルワールスまたは水素結合相互作用を示していなければならない、（d）レラキシン変異体中で、欠失しているか、または可変でなければならない、（e）天然ではコードされないアミノ酸での置換に際し保存的变化を生ずる可能性がある、および（f）非常柔軟な領域または構造的に強固な領域のいずれかで見つかる可能性がある。加えて、レラキシン分子について、Cxプログラム（Pintare et al. (2002) Bioinformatics, 18, pp980）を利用して各タンパク質原子に対する突出の程度を評価するためのさらなる計算を行ってもよい。

【0590】

一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンのA鎖中の1つまたは複数の下記的位置に組み込まれる：位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25（すなわち、タンパク質のカルボキシル末端）（配列番号4または配列番号1～3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンのB鎖中の1つまたは複数の下記的位置に組み込まれる：位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30（すなわち、タンパク質のカルボキシル末端）（配列番号5もしくは6または配列番号1～3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシン中の1つまたは複数の下記的位置に組み込まれる：1、5、31、2、13、29、18、52（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンの下記の下記の1つまたは複数の位置に組み込まれる：5、31、2、13、29、18、52（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンの下記の下記の1つまたは複数の位置に組み込まれる：1、5、31、2、13、29（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンの下記の下記の1つまたは複数の位置に組み込まれる：5、31、2、13、29（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンの下記の下記の1つまたは複数の位置に組み込まれる：1、5、31、2、13（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。一部の実施形態では、1つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸がレラキシンの下記の下記の1つまたは複数の位置に組み込まれる：5、31、2、13（配列番号1または配列番号2および3の対応するアミノ酸）。

【0591】

実施例2

この実施例は、大腸菌中の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドのクローニングおよび発現について詳述する。

【0592】

レラキシンのクローニング方法は、当業者には既知である。レラキシン用ポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列およびレラキシンの宿主細胞中へのクローニングについては、米国特許第4,758,516号；同5,166,191号；同5,179,195号

、5, 945, 402号; および同5, 759, 807号; に詳細に記述されている。これらの特許は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0593】

レラキシンをコードするcDNAは、配列番号12として示され、成熟ポリペプチドアミノ酸配列は、配列番号1として示される。

【表4-1】

表1：引用されたレラキシンの配列

配列番号	配列名	配列
1	レラキシン アミノ酸 配列	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	レラキシン アミノ酸 配列 B1 Ala	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	プロレラキ シンアミノ 酸配列	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
4	レラキシン A鎖, アミ ノ酸配列	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	レラキシン B鎖, アミ ノ酸配列	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	B1 Alaを有 するレラキ シンB鎖, アミノ酸配 列	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	Cペプチド アミノ酸 配列	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	レラキシン リーダー アミノ酸 配列	MKKNIAFLLR
9	インスリン リーダー アミノ酸 配列	MIEGGR
10	レラキシン A鎖, 核酸 配列	Caactctacagtgcattggctaataaatggttgccatggttggtgtacaaaa gatctcttgctagattttgc
11	レラキシン B鎖, 核酸 配列	Gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcg cgcagattgccatttgcgcatgagcacctggagc
12	レラキシン, AおよびB	caactctacagtgcattggctaataaatggttgccatggttggtgtacaaaa gatctcttgctagattttgc

10

20

30

40

【表 4－2】

	鎖，核酸配列	gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcg cgcagattgccatttgcggc atgagcacctggagc
13	レラキシンリーダー核酸配列	Atgaaaaagaatatcgcatcttcttcttaaaccgg
14	インスリンリーダー核酸配列	Atgattgaaggtggtcgt
15	レラキシン発現構築物アミノ酸配列の例	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQI AICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGGG PGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC

10

【0594】

直交性 tRNA (O-tRNA) および直交性アミノアシル tRNA シンテターゼ (O-RS) を含む導入された翻訳系を使用して、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンまたはレラキシン類似体を発現させる。O-RS は、天然ではコードされないアミノ酸を有する O-tRNA を優先的にアミノアシル化する。次に、翻訳系は、コードされたセクターコドンに応答して、天然ではコードされないアミノ酸をレラキシンまたは

適切な O-RS および O-tRNA 配列は、「アミノアシル-tRNA シンテターゼ組成物およびその使用」のタイトルの国際公開第 2006/068802 号 (E9; 配列番号 16) および「tRNA 組成物およびその使用」のタイトルの国際公開第 2007/021297 号 (F13; 配列番号 17) に記載されている。これらの特許は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【表 5 - 1】

表 2 : 引用された配列

配列番号 18	M. ジャナスキー mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
配列番号 19	HLAD03;最適化アンバーサプレッサーtRNA	tRNA
配列番号 20	HL325A;最適化 AGGA フレームシフトサプレッサーtRNA	tRNA
配列番号 21	p-アジド-L-フェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ p-Az-PheRS (6)	RS
配列番号 22	p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ p-BpaRS (1)	RS
配列番号 23	プロパルギルフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ プロパルギル-PheRS	RS
配列番号 24	プロパルギル-フェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ プロパルギル-PheRS	RS
配列番号 25	プロパルギル-フェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ プロパルギル-PheRS	RS
配列番号 26	アミノアシル tRNA シンテターゼ組み込み用 of p-アジド-フェニルアラニン p-Az-PheRS (1)	RS
配列番号 27	p-アジドフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ p-Az-PheRS (3)	RS
配列番号 28	p-アジドフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ p-Az-PheRS (4)	RS
配列番号 29	p-アジドフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ p-Az-PheRS (2)	RS
配列番号 30	p-アセチルフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ (LW1)	RS
配列番号 31	p-アセチルフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ (LW5)	RS

10

20

【表 5 - 2】

配列番号 32	p-アセチルフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ (LW6)	RS
配列番号 33	p-アジドフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ (AzPheRS-5)	RS
配列番号 34	p-アジドフェニルアラニン組込み用アミノアシル tRNA シンテターゼ (AzPheRS-6)	RS

30

【0595】

改変レラキシンまたはレラキシン類似体遺伝子および直交性アミノアシル tRNA シンテターゼ / tRNA 対 (所望の天然ではコードされないアミノ酸特異的) を含むプラスミドを使った大腸菌の形質転換により、天然ではコードされないアミノ酸のレラキシンポリペプチド中への部位特異的組み込みが可能となる。

【0596】

野性型成熟レラキシンは、標準的プロトコルを使って cDNA 合成反応に続く PCR により増幅され、pET30 (NcoI-BamHI) にクローニングされる。配列確認の前に、またはその後に、N 末端 HHHHHHSGG 配列を含むレラキシンが、大腸菌リポタンパク質プロモーター配列 (Miller, J. H., Gene, 1986) 由来の合成プロモーターの構成的制御下のメタノコッカスジャナスキー (Mj tRNA^{Tyr}/CUA) 由来のアンバーサプレッサーチロシル tRNA^{Tyr}/CUA、ならびに大腸菌 GlnRS プロモーターの制御下の直交性チロシル tRNA-シンテターゼ (Mj TyrRS) を含む抑制ベクター中にサブクローニングされる。レラキシンの発現は、T7 プロモーターの制御下で行われる。アンバー変異が、標準的 quick change mutation プロトコルを使って導入される (Stratagene; LaJolla、

40

50

California)。構築物は、検証された配列である。

【0597】

長時間作用型レラキシン化合物の試験は、STZ糖尿病ラットモデル（PCO08-400-209）を使って行うことができる。

【0598】

パラアセチルフェニルアラニン（pAcF）を使った抑制

プラスミド（例えば、pt_RLX_BA1_AV13am_p1395（AXID2381））を使って、大腸菌株W3110B57中に形質転換し、RLX-BA1-AV13pAF W3110 B2大腸菌株を産生した。ここでのT7ポリメラーゼの発現は、アラビノース誘導性プロモーターの制御下で行った。一晚の細菌培養液を、2XYT培地含有振盪フラスコ中で1：100に希釈し、37℃で約0.8のOD₆₀₀まで増殖させた。アラビノース（最終0.2%）およびパラアセチルフェニルアラニン（pAcF）を最終濃度の4mMまでの添加によりタンパク質発現を誘導した。培養液を37℃で5時間インキュベートした。細胞を沈殿物にし、B-PER溶解緩衝液（Pierce）100ul/OD/ml + 10ug/ml DNアーゼに再懸濁後、37℃で30分間インキュベートした。細胞性物質を遠心分離で除去し、上清を取り出した。沈殿物を、等量のSDS-PAGEタンパク質ロード緩衝液中に再懸濁した。全試料をMESおよびDTTを使って4～12%PAGEゲルにロードした。レラキシンの精製方法は、当業者には既知であり、SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析、またはエレクトロスプレーイオン化オントラップ質量分析、等により確認される。

10

20

【0599】

Histaグ変異体レラキシンタンパク質は、当業者には既知の方法を使って精製できる。ProBondニッケルキレート樹脂（Invitrogen、Carlsbad、CA）を、製造メーカーから提供された標準的Histaグタンパク質精製方法に従って使用できる。タンパク質機能測定は、当技術分野で既知の方法、本出願および組み込まれた文献で提供される方法、により行うことができ、また、代わりに、生きている細胞のELISAを開発し、本発明のレラキシンポリペプチドを評価することができる。

【表 6 - 1】

表 3 : レラキシン変異体の分析

バッチ / 説明	SDS-PAGE	LAL (EU/mg)	A280 での 濃度	RP-HPLC 純度	SE-HPLC 純度
WT レラキシン ³	非還元試料 主要バンドが 6kDa の MW 標 準近傍に移動	試験せず	2.4	91.2%	試験せず
20K ペグ化 Q1pAF ^{1,3,4}	非還元試料 主要バンドが 49 と 38 kDa の MW 標準の 間に移動	7.7	3.4	100%	試験せず
20K ペグ化 A5pAF ^{1,3,4}		3.6	2.4	100%	試験せず
20K ペグ化 R18pAF ^{1,3,4}		16.1	2.4	100%	試験せず
20K ペグ化 E5pAF ^{2,3}		試験せず	0.6	99.8%	試験せず
20K ペグ化 V7pAF ^{2,3,4}		10.5	2.3	99.4%	試験せず
20K ペグ化 A18pAF ^{2,3}		試験せず	2.0	99.0%	試験せず
20K ペグ化 W28pAF ^{2,3,4}		9.1	2.2	99.4%	試験せず
20K ペグ化 V13pAF ^{1,3,4}		5.1	3.7	99.5%	試験せず
20K ペグ化 E5pAF ²		試験せず	0.6	99.6%	試験せず
20K ペグ化 L2pAF ¹		0.0	1.6	99.5%	試験せず
WT レラキシン ³	非還元試料 主要バンドが 6kDa の MW 標 準近傍に移動	0.1	2.5	85.6%	試験せず
20K ペグ化 Q1pAF ^{1,3}	非還元試料 主要バンドが 49 と 38 kDa の MW 標準の 間に移動	<0.4	2.3	99.3%	99.3%
5K ペグ化 V13pAF ^{1,3}	非還元試料 主要バンドが 14kDa の MW 標準近傍に移 動	5.4	1.5	99.4%	99.8%

10

20

30

40

【表 6 - 2】

10K ペグ化 V13pAF ^{1,3}	非還元試料 主要バンドが 28 と 17kDa の MW 標準の 間に移動	9.8	1.8	99.4%	99.5%
20K ペグ化 V13pAF ^{1,3}	非還元試料 主要バンドが 49 と 38kDa の MW 標準の 間に移動	4.7	1.9	99.0%	99.5%
30K ペグ化 V13pAF ^{1,3}	非還元試料 主要バンドが 62 と 49 kDa の MW 標準の 間に移動	8.0	2.1	99.5%	99.8%

¹ A 鎖上の pAcF 置換² B 鎖上の pAcF 置換³ B 鎖上の Asp の Ala への置換 (BA1)⁴ 初期 PK に使用

【表 7 - 1】

表 4 : レラキシン変異体の失活

変異体	インビトロ 活性減少 倍数	PEG サイズ	インビボ PK 期間 HL (hr)	インビボ 薬学	振盪フ ラスコ	発酵力価 (細胞ペース ト)	分析的キャラク タリゼーション
RLX-A- AV13	17	5K, 10K, 20K, 30K	2.6 (5K), 8.7 (10K), 13.8 (20K), 26.8 (30K)		yes	1 gm/L	SDS-PAGE, conc., LAL, RP-HPLC, SE- HPLC
RLX-A- AQ1	12	20K	10.7	20K 有効性を 示す	yes	720 mg/L	SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL, SE-HPLC
RLX-A- AA5	12	20K	12.2		yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A- BV7	15	20K	13.1		yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A- AL2	17	20K			yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A- BE5	17	20K			yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A- AR18	21	20K	12.5		yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-BE 5	22	20K			yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A- BA18	48	20K			yes		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC

【表 7-2】

RLX-A-8W28	48	20K	13.9		yes		SDS-PAGE, CONC., RP-HPLC, LAL
------------	----	-----	------	--	-----	--	-------------------------------------

【0600】

実施例 3

この実施例は、プロレラキシシポリペプチドの大腸菌による発現について詳述する。大腸菌は、88 アミノ酸からなる単鎖タンパク質としてプロレラキシシを発現した。トリプシンおよびカルボキシペプチダーゼによる消化で、ペプチドとリーダー配列の連結は取り除かれる。得られたペプチドは、インスリンスーパーファミリーの小さい 6 kDa の 2 鎖ペプチドメンバーであり、24 残基の A 鎖および 29 残基の B 鎖から構成される。構造的折り畳みは、2 つの鎖間 (Cys 11-Cys 36、および Cys 24-Cys 48) および 1 つの鎖内 (Cys 10-Cys 15) ジスルフィド結合により一緒に保持されている 2 つのペプチド鎖を特徴とする。ヒトレラキシシ-2 の結晶構造に基づく三次構造は、3 つのヘリカルセグメントおよび疎水性のコアを封入する短い伸長領域を含むコンパクトな折り畳みを示した。

10

【0601】

1 つまたは複数の天然ではコードされないアミノ酸を有するレラキシシは、特有の化学作用を提供し、天然アミノ酸のパラアセチルフェニルアラニン (pAcF) による置換により、生合成により組み込まれた化学的反応性のカルボニル基を含む特異的ペグ化組換え変異体を可能とし、ポリ(エチレン)グリコール (PEG) に対する特有の共有結合部位を提供する。

20

【0602】

実施例 4

この実施例は、大腸菌によるプロレラキシシポリペプチド発現について詳述する。

【0603】

この実施例は、5 L の発酵槽を使ったレラキシシポリペプチド産生のスケールアップについて記載する。これらの方法およびスケールアップは、10 L、30 L、150 L および 1000 L バッチに対しても使用できる。本発明の一部の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 2 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 4 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 6 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 8 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 10 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 15 g のレラキシシタンパク質が産生される。本発明の別の実施形態では、1 L 当たりの細胞培養に対し、少なくとも 20 g のレラキシシタンパク質が産生される。

30

【0604】

2. 1 シード振盪フラスコ

プラスミド p t _ R L X _ B A 1 _ A V 1 3 a m _ p l 3 9 5 (A X I D 2 3 8 1) を含む大腸菌株 W 3 1 1 0 B 5 7 [F - I N (r r n D - r r n E) l a m d a - a r a B : : g 1 t e t A f h u A : : d h f r o m p T : : c a t] を使って、R L X - B A 1 - A V 1 3 p A F を産生する。単一の研究細胞バンク (R C B) バイアルを -80 °C から取り出し、室温で解凍し、次に、50 μL を使って、250 mL のバッフルしたエルレンマイヤーフラスコ中の、50 mL の 50 μg/mL カナマイシン硫酸塩を補充した種培地 (合成培地) に播種した。初代種培養液を 37 °C、250 rpm (1 インチ偏心距離) で約 18 時間増殖させた。初代種培養液を、50 μg/mL カナマイシン硫酸塩を補充した 100 mL の種培地を含む 500 mL のバッフルしたエルレンマイヤーフラスコ中の

40

50

2次種培養液中で、600nm波長(OD600)で測定した光学密度値の0.05まで継代培養した。二次種培養液を、37℃、250rpm(1インチ偏心距離)で約8時間またはOD600が2~4に達する時間まで増殖させた。

【0605】

2.2 発酵槽

Sartorius Biostat B5-L容器を50μg/Lのカナマイシン硫酸塩を補充した2.1Lの産生培地(合成培地)で満たした。二次種培養液を使って発酵槽で初期OD600の0.035濃度で播種した。培養液を37℃で増殖させ、溶解酸素を一次攪拌(480~1200rpm)カスケードおよび二次O₂カスケードを使って30%(空気飽和)維持に設定した。6psi背圧を伴った5LPMの空気流量を発酵の間維持した。培養液のpHを15%水酸化アンモニウムの添加により7.2±0.05に設定し、泡制御の必要に応じ、Dow ChemicalのP2000消泡剤を加えた。培養液が35±5のOD600に達すると(バッチ培地中の初期グリセリンがほぼ消費されたとき)、200mLの大量供給を開始し、同時に、pH設定を7.2~6.6に調節した。最初の大量供給の後で、0.25mL/L/分の速度で連続供給を開始し、回収まで継続した。供給開始直後、2.5mL/L(0.2g/L最終培養液容量)の100g/L L-Ala-pAcFジペプチド水溶液を発酵槽に加えた。ジペプチドの添加の15分後、培養液をL-アラビノース(処方PTR-FGF-002に記載)を2g/L(最終培養液容量)の濃度まで添加し誘導した。培養液をアラビノース添加後6時間増殖させ、採取した。

【0606】

図5は、これらの方法で産生した、A鎖の13番目のアミノ酸位置に、バリンを置換したAlaおよびパラアセチルフェニルアラニンとして鎖B1アミノ酸を有するプロレラキシンのSDS-PAGEゲルを示す。

【0607】

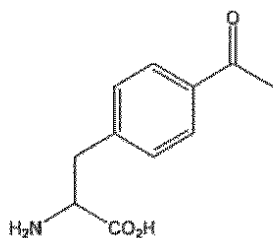
実施例5

この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入およびアミノオキシ含有PEGとのその後の反応に関し詳述する。

【0608】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシンポリペプチドは、その後、約5,000MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1(すなわち、N末端)の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22(すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号3、5、7、9、11の対応するミノ酸)のそれぞれの残基、および位置1(すなわち、N末端)の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32(すなわち、配列番号2のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号4、6、8、10、12の対応するアミノ酸)のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化50】

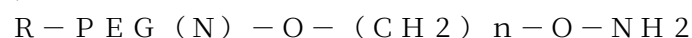


【0609】

p-アセチルフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みで利用される配列は、上記実施例2で記載の、配列番号1および2（レラキシンのAおよびB鎖）、および配列番号16または17（muttRNA、M. スジャナスキー）、および15、29、30または31（TyrRSLW1、5、または6）である。

【0610】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



を有するアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、およびNは約5,000MWである。25mM MES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH6.0、25mM Hepes（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アセチルフェニルアラニン含有レラキシンを、10～100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10～16時間攪拌する（Jencks、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEG-レラキシンを適切な緩衝液中に希釈する。

【0611】

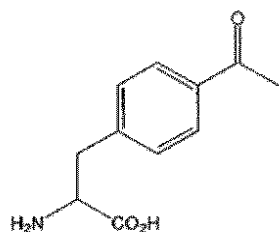
実施例6

この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGとの反応に関し、詳述する。

【0612】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシンポリペプチドは、その後、約20,000MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応するアミノ酸）のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化51】



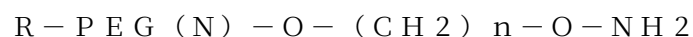
。

【0613】

p-アミノフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号4および5または6（レラキシンのAおよびB鎖）、ならびに配列番号16または17（muttRNA、M. ジャナスキー）、ならびに上述の配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0614】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、さらにNは約20,000MWである。25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH6.0、25mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシンを、10~100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10~16時間攪拌する (Jenkins, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp475)。次に、速やかな精製および分析のために、PEG-レラキシンを適切な緩衝液中に希釈する。

10

【0615】

実施例7

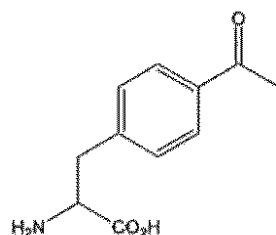
この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGとの反応に関し、詳述する。

【0616】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシンポリペプチドは、その後、約20,000MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1 (すなわち、N末端) の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53 (すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応するアミノ酸位置) のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

20

【化52】



30

。

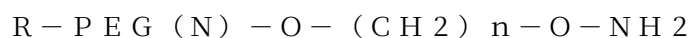
【0617】

p-アミノフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号13、および配列番号16または17 (muttRNA、M. ジャナスキー)、ならびに上述配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0618】

40

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、さらに、Nは約20,000MWである。25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH6.0、25mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシンを、10~100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で1

50

0～16時間攪拌する（Jencks、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEGーレラキシンを適切な緩衝液中に希釈する。

【0619】

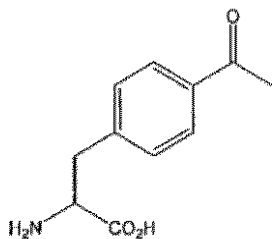
実施例8

この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGとの反応に関し、詳述する。

【0620】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシンポリペプチドは、その後、約20,000 MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応するアミノ酸位置）のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化53】



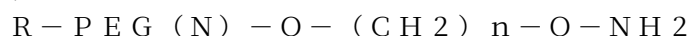
。

【0621】

p-アミノフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号1、および配列番号16または17（muttRNA、M. ジャナスキー）、ならびに上述の配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0622】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、さらに、Nは約20,000 MWである。25mM MES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH6.0、25mM Hepes（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシンを、10～100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10～16時間攪拌する（Jencks、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEGーレラキシンを適切な緩衝液中に希釈する。

【0623】

実施例9

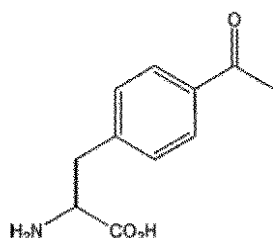
この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGと

の反応に関し、詳述する。

【0624】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシシポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシシポリペプチドは、その後、約30,000 MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応する位置）のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化54】



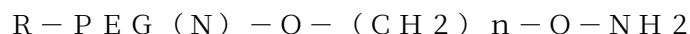
。

【0625】

p-アミノフェニルアラニンのレラキシシ中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号1（または配列番号2、もしくは3）、および配列番号16または17（muttRNA、M. ジャナスキー）、ならびに上述の配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0626】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、さらに、Nは約30,000 MWである。25 mM MES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH 6.0、25 mM HEPES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH 7.0、または10 mM 酢酸ナトリウム（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH 4.5中に、10 mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシシを、10～100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10～16時間攪拌する（Jenkins、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp 475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEG-レラキシシを適切な緩衝液中に希釈する。

【0627】

実施例10

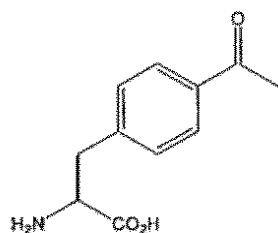
この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGとの反応に関し、詳述する。

【0628】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシシポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシシポリペプチドは、その後、約40,000 MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、4

5、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応する位置）のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化55】



10

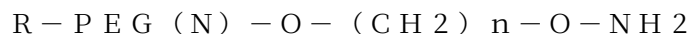
。

【0629】

p-アミノフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号13（または配列番号1、2、もしくは14）、および配列番号16または17（muttRNA、M. ジャナスキー）、ならびに上述の配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0630】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは3、さらに、Nは約40,000MWである。25mM MES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH6.0、25mM HEPES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシンを、10～100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10～16時間攪拌する（Jenkins、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEG-レラキシンを適切な緩衝液中に希釈する。

20

30

【0631】

実施例11

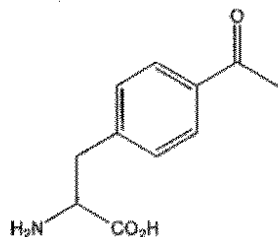
この実施例は、カルボニル含有アミノ酸の導入と、その後のアミノオキシ含有PEGとの反応に関し、詳述する。

【0632】

この実施例は、ケトン含有天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシンポリペプチドの生成方法を示す。このレラキシンポリペプチドは、その後、約10,000MWのアミノオキシ含有PEGと反応する。位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応する位置）のそれぞれの残基は、別々に下記の構造を有する天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

40

【化 5 6】



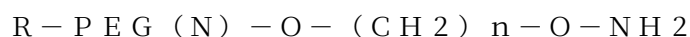
【0 6 3 3】

10

p-アミノフェニルアラニンのレラキシン中への部位特異的組み込みに利用される配列は、配列番号13（または配列番号1、2、もしくは14の対応する位置）、および配列番号16または17（muttRNA、M. ジャナスキー）、ならびに上述の配列およびp-アミノフェニルアラニンの部位特異的組み込みのために組み込まれた配列である。

【0 6 3 4】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシシポリペプチド変異体は、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応する。

式中、Rはメチル、nは3、さらに、Nは約10,000MWである。25mM MES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH6.0、25mM HEPES（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム（Sigma Chemical、St. Louis、MO）pH4.5中に、10mg/mLの濃度で溶解された精製p-アミノフェニルアラニン含有レラキシシを、10～100倍過剰のアミノオキシ含有PEGと反応させ、室温で10～16時間攪拌する（Jencks、W. J. Am. Chem. Soc. 1959、81、pp475）。次に、速やかな精製および分析のために、PEG-レラキシシを適切な緩衝液中に希釈する。

20

【0 6 3 5】

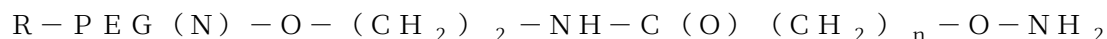
実施例12

30

アミド結合を介してPEGに連結されたヒドロキシルアミン基から構成されるPEGとのコンジュゲーション。

【0 6 3 6】

下記の構造を有するPEG試薬は、実施例3～9で記載された方法を使ってケトン含有天然ではコードされないアミノ酸に結合される：



式中、R=メチル、n=4およびNは約5,000MW～40,000MWである。反応、精製、および分析条件は、当技術分野で記載の通りであり、既知である。

【0 6 3 7】

実施例13

40

この実施例は、2つの異なる天然ではコードされないアミノ酸のレラキシシポリペプチドおよびレラキシシ類似体ポリペプチドへの導入に関し、詳述する。

【0 6 3 8】

この実施例は、下記の残基中の2つの位置にケトン官能性を含む天然ではコードされないアミノ酸を組み込んだレラキシシポリペプチドの生成方法を示す：位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応

50

する位置)。レラキシシポリペプチドは、セクターコドンが核酸内の2つの異なる部位に導入されることを除いて、上述と同様に調製される。

【0639】

実施例14

この実施例は、レラキシシポリペプチドまたはレラキシシ類似体ポリペプチドのヒドラジド含有PEGへのコンジュゲーションおよびその後のインサイツ還元に関し詳述する。

【0640】

カルボニル含有アミノ酸を組み込んだレラキシシポリペプチドは、上述の方法に従って調製される。改変されるとすぐに、下記の構造を有するヒドラジド含有PEGがそのレラキシシポリペプチドにコンジュゲートされる：

$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-X-NH-NH_2$
 式中、R=メチル、n=2、および、N=5,000;10,000、20,000;30,000;または40,000MWであり、さらに、Xは、カルボニル(C=O)基である。精製p-アセチルフェニルアラニン含有レラキシシを、0.1~10mg/mLの濃度で、25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH6.0、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH4.5中に溶解し、1~100倍過剰のヒドラジド含有PEGと反応させ、ストック1M NaCNBH₃ (Sigma Chemical, St. Louis, MO)を加えて、対応するヒドラゾンを経インサイツ還元した後、H₂Oに溶解し最終濃度の10~50mMにする。反応は、4℃~RTの温度で18~24時間、暗所で行われる。約pH7.6の1Mトリス (Sigma Chemical, St. Louis, MO)を50mMの最終トリス濃度にまで添加して、反応を停止するか、または反応物を速やかな精製のために適切な緩衝液中に希釈する。

【0641】

実施例15

この実施例は、レラキシシポリペプチドまたはレラキシシ類似体ポリペプチドのヒドラジド含有PEGへのコンジュゲーションおよびその後のインサイツ還元に関し詳述する。

【0642】

カルボニル含有アミノ酸を組み込んだレラキシシポリペプチドは、上述の方法に従って調製される。改変されるとすぐに、下記の構造を有するヒドラジド含有PEGがそのレラキシシポリペプチドにコンジュゲートされる：

$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-X-NH-NH_2$
 式中、R=メチル、n=2、および、N=20,000MWであり、さらに、Xは、カルボニル(C=O)基である。精製p-アセチルフェニルアラニン含有レラキシシを、0.1~10mg/mLの濃度で、25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH6.0、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH7.0、または10mM酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH4.5中に溶解し、1~100倍過剰のヒドラジド含有PEGと反応させ、ストック1M NaCNBH₃ (Sigma Chemical, St. Louis, MO)を加えて、対応するヒドラゾンを経インサイツ還元した後、H₂Oに溶解し最終濃度の10~50mMにする。反応は、4℃~RTの温度で18~24時間、暗所で行われる。約pH7.6の1Mトリス (Sigma Chemical, St. Louis, MO)を50mMの最終トリス濃度にまで添加して、反応を停止するか、または反応物を速やかな精製のために適切な緩衝液中に希釈する。

【0643】

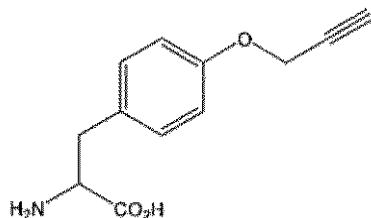
実施例16

この実施例は、アルキン含有アミノ酸のレラキシシポリペプチドまたはレラキシシ類似体ポリペプチド中への導入、およびmPEG-アジドを使った誘導体化に関し詳述する。

【0644】

位置 1（すなわち、N 末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号 1 のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号 2 および 3 の対応する位置）の残基はそれぞれ、下記の天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化 57】



10

。

【0645】

p-プロパルギルチロシンのレラキシンへの部位特異的組み込みに利用される配列は、上述の配列番号 1（または配列番号 2 もしくは 3 の対応する位置）、配列番号 16 または 17（muttRNA、M. ジャナスキー）、および 22、23 または 24 である。プロパルギルチロシン含有レラキシンポリペプチドは、大腸菌中で発現し、上述の条件を使って精製される。

20

【0646】

精製プロパルギルチロシン含有レラキシンを 0.1～10 mg/mL の濃度で PB 緩衝液（100 mM ナトリウムリン酸塩、0.15 M NaCl、pH=8）に溶解し、10～1000 倍過剰のアジド含有 PEG を反応混合物に添加する。その後、触媒量の CuSO₄ および Cu ワイヤを反応混合物に加える。混合物をインキュベーション（限定されないが、室温または 37℃ で約 4 時間、または 4℃ で一晩）後、H₂O を添加し、混合物を透析膜を通して濾過する。この試料で、限定されないが、実施例 3 の記載と類似の方法で、付加の分析を行うことができる。この実施例では、PEG は、下記の構造を有する：

$$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N_3$$

式中、R はメチル、n は 4、および、N = 5, 000; 10, 000、20, 000; 30, 000; または 40, 000 MW である。

30

【0647】

実施例 17

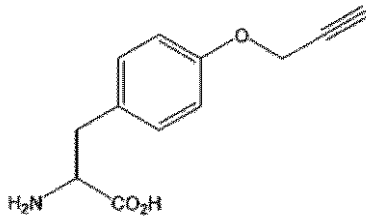
この実施例は、レラキシンポリペプチド中の大きな、疎水性のアミノ酸のプロパルギルチロシンによる置換に関し詳述する。

【0648】

レラキシンの、位置 1（すなわち、N 末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号 1 のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号 2 および 3 の対応する位置）の 1 つの領域内に存在する Phe、Trp または Tyr 残基は、上述のように、下記の天然ではコードされないアミノ酸により置換される：

40

【化 5 8】



。

【0649】

10

変更されるとすぐ、PEGを、アルキン含有アミノ酸を含むレラキシソポリペプチド変異体に結合させる。PEGは、下記の構造を有する：

Me-PEG(N)-O-(CH₂)₂-N₃

また、結合方法は、上述の実施例の方法に類似となろう。これにより、天然の大きな疎水性アミノ酸とほぼ等配電子であり、ポリペプチド内の異なる部位のPEG誘導体で変更されている、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシソポリペプチド変異体が生成されることになる。

【0650】

実施例 18

この実施例は、1つまたは複数のPEGリンカーで分離された、レラキシソポリペプチドホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーの生成に関し詳述する。レラキシソポリペプチドマルチマーは、プロインスリンの間で、または本発明の成熟A鎖およびB鎖レラキシソポリペプチドの間で形成されてもよい。

20

【0651】

上記実施例で産生されたアルキン含有レラキシソポリペプチド変異体を、式：

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

の二官能性PEG誘導体と反応させる。

式中、nは4であり、PEGは、約5,000；10,000；20,000；30,000；または40,000 MWの平均MWを有し、対応するレラキシソポリペプチドホモダイマーを生成する。ここで、2つのレラキシソ分子は、PEGにより物理的に分離されている。類似の方式で、レラキシソポリペプチドを、1つまたは複数の他のポリペプチドに結合させ、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーを形成できる。結合、精製、および分析は、上記の実施例のように行える。

30

【0652】

実施例 19

この実施例は、1つまたは複数のPEGリンカーにより分離されたレラキシソポリペプチドホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーの生成に関し詳述する。

レラキシソポリペプチドマルチマーは、A鎖と他のA鎖の間、またはB鎖と他のB鎖の間で形成されてもよい。

40

【0653】

上記実施例で産生されたアルキン含有レラキシソポリペプチド変異体を、式：

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

の二官能性PEG誘導体と反応させる。

式中、nは4であり、PEGは、約5,000；10,000；20,000；30,000；または40,000 MWの平均MWを有し、対応するレラキシソポリペプチドホモダイマーを生成する。ここで、2つのレラキシソ分子は、PEGにより物理的に分離されている。類似の方式で、レラキシソポリペプチドを、1つまたは複数の他のポリペプチド

50

に結合させ、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーを形成できる。結合、精製、および分析は、上記実施例のように行える。

【0654】

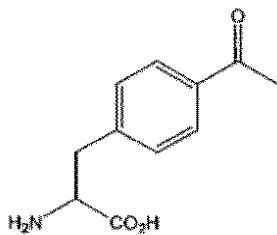
実施例20

この実施例は、サッカライド成分のレラキシンポリペプチドへの結合に関し詳述する。

【0655】

位置1（すなわち、N末端）の前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54（すなわち、配列番号1のタンパク質のカルボキシル末端または配列番号2および3の対応する位置）の1つの残基が、上述のように、下記の天然ではコードされないアミノ酸で置換される：

【化59】



。

【0656】

改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）のβ-連結アミノオキシ類似体と反応させる。レラキシンポリペプチド変異体（10mg/mL）およびアミノオキシサッカライド（21mM）を水性100mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）中で混合し、37℃で7～26時間インキュベートする。サッカライドコンジュゲートレラキシンポリペプチド（5mg/mL）をUDP-ガラクトース（16mM）およびβ-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ（0.4ユニット/mL）と一緒に、150mMのHEPES緩衝液（pH7.4）中、室温で48時間インキュベートする事により、第2のサッカライドを第1のサッカライドに酵素的に連結する（Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970、245、5057-5061）。

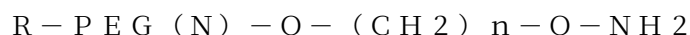
【0657】

実施例22

この実施例は、ペグ化レラキシンポリペプチドアンタゴニストの生成に関し詳述する。

【0658】

限定されないが、レラキシン受容体結合に関与する残基、等の残基は、上述のように下記の天然ではコードされないアミノ酸で置換される。改変されるとすぐに、カルボニル含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体を、式：



のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。

式中、Rはメチル、nは4、および、Nは5,000；10,000；20,000；30,000；または40,000MWであり、ポリペプチド内の単一部位でPEG誘導体により改変されている、天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドアンタゴニストを生成する。結合、精製、および分析は、上述のように行われる。

【0659】

実施例21

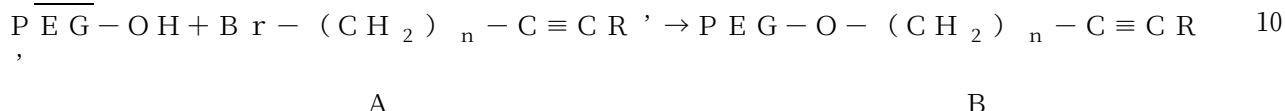
レラキシン分子が直接連結されているレラキシンポリペプチドホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーの生成。

【0660】

アルキン含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体は、別のアジド含有アミノ酸を含むレラキシンポリペプチド変異体に直接結合させることができる。類似の方式で、レラキシンポリペプチドポリペプチドを、1つまたは複数の他のポリペプチドに結合させ、ヘテロダイマー、ホモマルチマー、またはヘテロマルチマーを形成できる。マルチマー形成に関するさらなる説明は、上記実施例16と17で提供されており、結合、精製、および分析は、上述のように行われる。

【0661】

実施例22

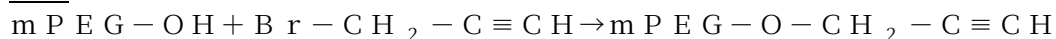


【0662】

ポリアルキレングリコール (P-OH) をアルキルハロゲン化物 (A) と反応させ、エーテル (B) を形成する。これらの化合物では、n は、1~9 の整数であり、R' は、直鎖または分岐鎖、飽和または不飽和の C1~C20 アルキルもしくはヘテロアルキル基であってよい。R' は、また、C3~C7 飽和または不飽和の環式アルキルもしくは環式ヘテロアルキル、置換または未置換アリールもしくはヘテロアリール基、または置換または未置換アルカリル (アルキルは、C1~C20 飽和または不飽和アルキル) もしくはヘテロアルカリル基であってよい。典型的には、PEG-OH は、800~40,000 ダルトン (Da) の分子量のポリエチレングリコール (PEG) またはモノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) である。

【0663】

実施例23

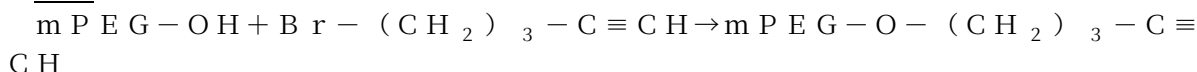


【0664】

分子量 20,000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g、0.1 mmol、Sunbio) の mPEG-OH を、THF (35 mL) 中で、NaH (12 mg、0.5 mmol) で処理した。キシレン (0.56 mL、5 mmol、50 当量、Aldrich) 中の 80% 重量溶液として溶解した臭化プロパルギル溶液、および触媒量の KI をその溶液に添加し、得られた混合物を 2 時間加熱還流した。水 (1 mL) を添加し、溶媒を真空下除去した。残渣に CH₂Cl₂ (25 mL) を添加し、有機層を分離させ、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥し、容量を約 2 mL に縮減した。この CH₂Cl₂ 溶液をジエチルエーテル (150 mL) に滴下した。得られた沈殿物を集め、冷ジエチルエーテルで数回洗浄し、乾燥して、プロパルギル-O-PEG を得た。

【0665】

実施例24

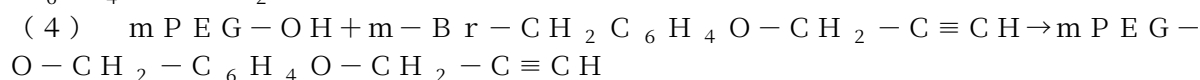
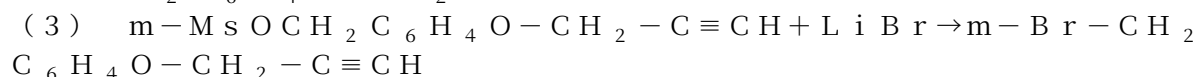
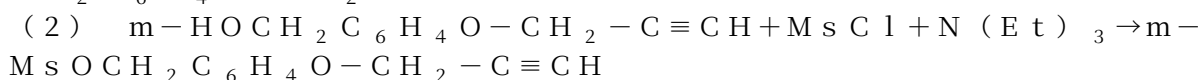
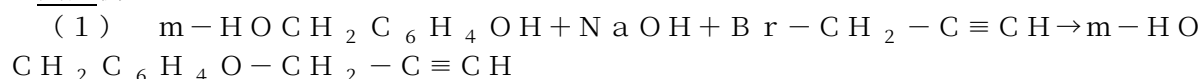


【0666】

分子量 20,000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g、0.1 mmol、Sunbio) の mPEG-OH を、THF (35 mL) 中で、NaH (12 mg、0.5 mmol) で処理した。50 当量の 5-ブロモ-1-ペンチン (0.53 mL、5 mmol、Aldrich) および触媒量の KI をその混合物に添加した。得られた混合物を 16 時間加熱還流した。水 (1 mL) を添加し、溶媒を真空下除去した。残渣に CH₂Cl₂ (25 mL) を添加し、有機層を分離させ、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥し、容量を約 2 mL に縮減した。この CH₂Cl₂ 溶液をジエチルエーテル (150 mL) に滴下した。得られた沈殿物を集め、冷ジエチルエーテルで数回洗浄し、乾燥して、対応するアルキンを得た。5-クロロ-1-ペンチンも類似の反応で使用できる。

【0667】

実施例 2 5



【0668】

10

3-ヒドロキシベンジルアルコール (2.4 g、20 mmol) の THF (50 mL) および水 (2.5 mL) 中溶液に、最初に、粉末水酸化ナトリウム (1.5 g、37.5 mmol) を加え、次に、キシレン (3.36 mL、30 mmol) 中の 80% 重量溶液として溶解した臭化プロパルギル溶液を加えた。反応混合物を 6 時間加熱還流した。この混合物に、10% クエン酸 (2.5 mL) を加え、真空下で溶媒を除去した。残渣を酢酸エチル (3 x 15 mL) で抽出し、合わせた有機層を飽和 NaCl 溶液 (10 mL) で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥後、濃縮して 3-プロパルギルオキシベンジルアルコールを得た。

【0669】

20

塩化メタンスルホニル (2.5 g、15.7 mmol) およびトリエチルアミン (2.8 mL、20 mmol) を、化合物 3 (2.0 g、11.0 mmol) の CH₂Cl₂ 中溶液に 0℃ で添加し、反応物を冷蔵庫中に 16 時間置いた。通常の後処理後、メシラートを淡黄色オイルとして得た。このオイル (2.4 g、9.2 mmol) を THF (20 mL) に溶解し、LiBr (2.0 g、23.0 mmol) を添加した。反応混合物を 1 時間加熱還流した後、室温に冷却した。この混合物に、水 (2.5 mL) を添加し、真空下、溶媒を除去した。残渣を酢酸エチル (3 x 15 mL) で抽出し、合わせた有機層を飽和 NaCl 溶液 (10 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥後、濃縮して、所望の臭化物を得た。

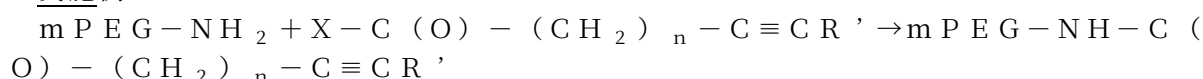
【0670】

30

20 kDa の mPEG-OH (1.0 g、0.05 mmol、Sunbio) を THF (20 mL) に溶解し、この溶液を氷浴中で冷却した。NaH (6 mg、0.25 mmol) を激しく攪拌しながら数分かけて添加し、続いて、上記で得た臭化物 (2.55 g、11.4 mmol) および触媒量の KI を加えた。冷却浴を取り除き、得られた混合物を 12 時間加熱還流し、水 (1.0 mL) を混合物に加えて、溶媒を真空下除去した。残渣に CH₂Cl₂ (25 mL) を加え、有機層を分離させ、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥して、容量を約 2 mL に縮減した。これをエーテル溶液 (150 mL) に滴下して、白色沈殿が生成し、これを集め PEG 誘導体を得た。

【0671】

実施例 2 6



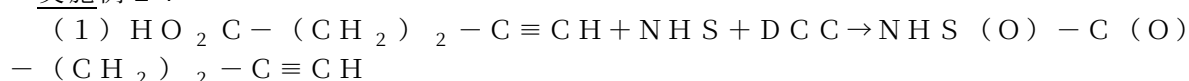
40

【0672】

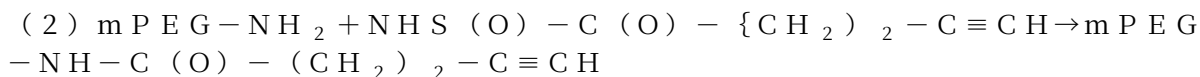
末端アルキン含有ポリ (エチレングリコール) ポリマーも、また、上記のように、末端官能基含有ポリ (エチレングリコール) ポリマーを、アルキン官能性を有する反応性分子に結合させることにより得ることができる。n は、1 ~ 10 である。R' は、H または C₁ ~ C₄ の低分子アルキル基であってよい。

【0673】

実施例 2 7



50



【0674】

4-ペンチン酸(2.943 g、3.0 mmol)を CH_2Cl_2 (25 mL)に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(3.80 g、3.3 mmol)およびDCC(4.66 g、3.0 mmol)を添加し、溶液を室温で一晩攪拌した。得られた粗製NHSエステル7を、さらなる精製をせずに、以下の反応で使用した。

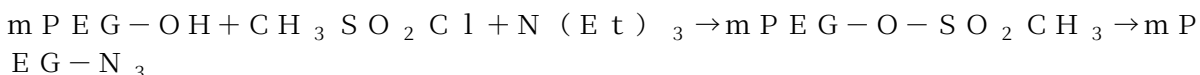
【0675】

分子量5,000 Da(mPEG-NH₂、1 g、Sunbio)のmPEG-NH₂をTHF(50 mL)に溶解し、混合物を4℃に冷却した。NHSエステル7(400 mg、0.4 mmol)を、激しく攪拌を加えながら、何回かに分けて添加した。室温に暖める間、混合物を3時間攪拌し続けた。その後、水(2 mL)を添加し、溶媒を真空下除去した。残渣に CH_2Cl_2 (50 mL)を加え、有機物を分離させ、無水 Na_2SO_4 上で乾燥して、容量を約2 mLに縮減した。この CH_2Cl_2 溶液をエーテル(150 mL)に滴下した。得られた沈殿を集め真空乾燥した。

【0676】

実施例 28

この実施例は、ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホニルエステル(ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホナートまたはメシラートと呼ばれる)の調製の典型例である。対応するトシラートおよびハロゲン化物も類似の方法で調製できる。



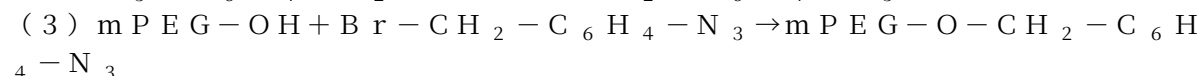
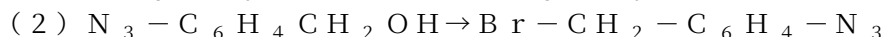
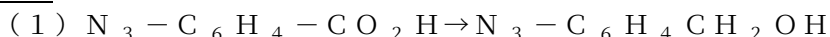
【0677】

150 mLのトルエン中のmPEG-OH(MW=3,400、25 g、10 mmol)を窒素雰囲気下で2時間共沸蒸留し、溶液を室温に冷却した。40 mLの無水 CH_2Cl_2 および2.1 mLの無水トリエチルアミン(15 mmol)をその溶液に添加した。溶液を氷浴中で冷却し、1.2 mLの蒸留塩化メタンスルホニル(15 mmol)を滴下した。溶液を窒素雰囲気下、室温で一晩攪拌し、2 mLの無水エタノールを加えて反応を停止させた。混合物を真空下で留去して、主に、トルエン以外の溶剤を除去し、濾過して、再度真空下濃縮した後、100 mLのジエチルエーテル中で沈殿させた。濾液を冷ジエチルエーテルで数回洗浄し、真空乾燥してメシラートを得た。

【0678】

メシラート(20 g、8 mmol)を75 mLのTHFに溶解し、溶液を4℃に冷却した。この冷却溶液に、ナトリウムアジド(1.56 g、24 mmol)を加えた。反応物を窒素雰囲気下で2時間加熱還流した。溶剤を留去し、残渣を CH_2Cl_2 (50 mL)で希釈した。有機画分を NaCl 溶液で洗浄し、無水 MgSO_4 上で乾燥した。容量を20 mLに縮減し、150 mLの冷無水エーテルを加えて、生成物を沈殿させた。

【0679】

実施例 29

【0680】

4-アジドベンジルアルコールは、米国特許第5,998,595号(参照によって本明細書に組み込まれる)に記載の方法を使って産生出来る。塩化メタンスルホニル(2.5 g、15.7 mmol)およびトリエチルアミン(2.8 mL、20 mmol)を、4-アジドベンジルアルコール(1.75 g、11.0 mmol)の CH_2Cl_2 中溶液に0℃で添加し、反応物を冷蔵庫中に16時間置いた。通常の後処理後、メシラートを淡黄色オイルとして得た。このオイル(9.2 mmol)をTHF(20 mL)に溶解し、L

10

20

30

40

50

i B r (2 . 0 g 、 2 3 . 0 m m o l) を加えた。反応混合物を1時間加熱還流し、室温に冷却した。この混合物に、水 (2 . 5 m L) を加え、溶媒を真空下除去した。残渣を酢酸エチル (3 x 1 5 m L) で抽出し、合わせた有機層を飽和 N a C l 溶液 (1 0 m L) で洗浄後、無水 N a 2 S O 4 上で乾燥し、濃縮して、所望の臭化物を得た。

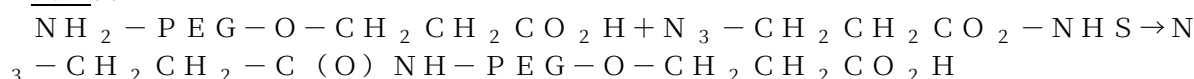
【0681】

20 k D a の m P E G - O H (2 . 0 g 、 0 . 1 m m o l 、 S u n b i o) を T H F (3 5 m L) 中の N a H (1 2 m g 、 0 . 5 m m o l) で処理し、触媒量の K I と一緒に臭化物 (3 . 3 2 g 、 1 5 m m o l) をその混合物に添加した。得られた混合物を12時間加熱還流した。水 (1 . 0 m L) を混合物に加え、溶媒を真空下で除去した。残渣に C H 2 C l 2 (2 5 m L) を加え、有機層を分離させ、無水 N a 2 S O 4 上で乾燥後、容量を約 2 m L に縮減した。エーテル溶液 (1 5 0 m L) への滴下により、沈殿を生じさせ、これを集めて m P E G - O - C H 2 - C 6 H 4 - N 3 を得た。

10

【0682】

実施例30



【0683】

N H 2 - P E G - O - C H 2 C H 2 C O 2 H (M W 3 , 4 0 0 D a 、 2 . 0 g) を N a H C O 3 飽和水性溶液 (1 0 m L) に溶解し、溶液を 0 ° C に冷却した。3-アジド-1-N-ヒドロキシスクシンイミドプロピオナート (5 当量) を激しく攪拌しながら添加した。3時間後、20 m L の H 2 O を加え、混合物を室温でさらに45分攪拌した。p H を 0 . 5 N H 2 S O 4 を使って3に調節し、N a C l を約 1 5 w t % の濃度まで加えた。反応混合物を C H 2 C l 2 (1 0 0 m L x 3) で抽出し、N a 2 S O 4 上で乾燥して濃縮した。冷ジエチルエーテルで析出させた後、生成物を濾過により集め、真空乾燥してω-カルボキシアジドPEG誘導体を得た。

20

【0684】

実施例31



【0685】

当技術分野で知られているように調製し、T H F 中で - 7 8 ° C 冷却したリチウムアセトリド (4 当量) の溶液に、T H F に溶解した m P E G - O M s 溶液を激しく攪拌しながら滴下した。3時間後、反応物を室温まで暖め、1 m L のブタノールを添加して反応停止させた。20 m L の H 2 O を加え、混合物を室温でさらに45分攪拌した。p H を 0 . 5 N H 2 S O 4 を使って3に調節し、N a C l を約 1 5 w t % の濃度まで加えた。反応混合物を C H 2 C l 2 (1 0 0 m L x 3) で抽出し、N a 2 S O 4 上で乾燥後、濃縮した。冷ジエチルエーテルで析出させた後、生成物を濾過により集め、真空乾燥して1- (ブター3-イニルオキシ) -メトキシポリエチレングリコール (m P E G) を得た。

30

【0686】

実施例32

アジドおよびアセチレン含有アミノ酸は、L. Wang、et al.、(2001)、Science 292:498-500、J. W. Chin et al.、Science 301:964-7 (2003)、J. W. Chin et al.、(2002)、Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin、& P. G. Schultz、(2002)、Chem Bio Chem 3 (11):1135-1137; J. W. Chin、et al.、(2002)、PNAS United States of America 99:11020-11024; および、L. Wang、& P. G. Schultz、(2002)、Chem. Comm.、1:1-11、に記載の方法を使って、部位選択的にタンパク質中に組み込むことができる。アミノ酸が組み込まれるとすぐに、p H 8 のリン酸塩緩衝液 (P B) 中の 0 . 0 1 m M タンパク質を使っ

40

50

て、2 mMのPEG誘導体、1 mMのCuSO₄、および約1 mgのCuワイヤーの存在下、37℃で4時間、付加環化反応が行われる。

【0687】

実施例33

この実施例は、p-アセチル-D、L-フェニルアラニン（pAF）およびm-PEG-ヒドロキシルアミン誘導体の合成に関し記載する。

【0688】

ラセミpAFは、Zhang、Z.、Smith、B. A. C.、Wang、L.、Brock、A.、Cho、C. & Schultz、P. G.、Biochemistry、(2003) 42、6735-6746、に以前に記載された方法を使って合成される。

10

【0689】

m-PEG-ヒドロキシルアミン誘導体を合成するために、以下の方法が完成されている。(N-t-Boc-アミノオキシ)酢酸(0.382 g、2.0 mmol)および1、3-ジイソプロピルカルボジイミド(0.16 mL、1.0 mmol)のジクロロメタン(DCM、70 mL)中溶液(室温(RT)で1時間攪拌されている)に、メトキシポリエチレングリコールアミン(m-PEG-NH₂、7.5 g、0.25 mmol、Mt.30 K、BioVectraより入手)およびジイソプロピルエチルアミン(0.1 mL、0.5 mmol)を加える。反応物をRTで48時間攪拌後、約100 mLに濃縮する。混合物を冷エーテル(800 mL)に滴下する。t-Boc保護生成物析出し、濾過により集めて、エーテル3 x 100 mLで洗浄する。DCM(100 mL)に再溶解し、エーテル(800 mL)中で2回析出させて、これをさらに精製する。生成物を真空乾燥し、7.2 g(96%)を得て、NMRおよびニンヒドリン試験で確認する。

20

【0690】

上記で得られた保護生成物(7.0 g)の脱Bocを、50%TFA/DCM(40 mL)中、0℃で1時間、その後、RTで、1.5時間、行う。真空下でほとんどのTFAを除去後、ジオキサン(1 mL)中の4N HClを残渣に添加することにより、ヒドロキシルアミン誘導体のTFA塩をHCl塩に変換する。沈殿物をDCM(50 mL)の溶解し、エーテル(800 mL)中で再析出させる。最終生成物(6.8 g、97%)を濾過して集め、エーテル3 x 100 mLで洗浄し、真空乾燥して、窒素下で貯蔵する。他のPEG(5 K、20 K)ヒドロキシルアミン誘導体も、同じ方法を使って合成される。

30

【0691】

実施例34

ペグ化レラキシンのインビボ調査

PEG-レラキシン、非改変レラキシンおよび緩衝液をマウスまたはラットに投与する。結果は、非改変レラキシンに比べて、本発明のペグ化レラキシンの優れた活性および延長された半減期が示されることになると思われる。同様に、改変レラキシン、非改変レラキシン、および緩衝液をマウスまたはラットに投与する。

【0692】

薬物動態解析

40

本発明レラキシンポリペプチドは、静脈内または皮下経路でマウスに投与される。動物は、投薬前および投薬後の種々の時点で採血される。血漿は、各試料から集められ、ラジオイムノアッセイで分析される。排出半減期は、計算でき、本発明の天然ではコードされないアミノ酸を含むレラキシンポリペプチドおよび野生型レラキシンまたは種々のレラキシン類似体ポリペプチドの間で比較できる。同様に、本発明のレラキシンポリペプチドは、カニクイザルにも投与できる。動物は、投薬前および投薬後の種々の時点で採血される。血漿は、各試料から集められ、ラジオイムノアッセイで分析される。

【0693】

ポリペプチドは、複数の用量、連続注入、または単一用量、等によりマウスに投与できる。

50

【0694】

実施例35

レラキシンは、Novagen発現システム（誘導可能T7プロモーター；pET System Manual、version9、に詳細に記載されている。このマニュアルは、参照によって組み込まれる）、発現ベクターpET30aおよび発現株BL21（DE3）を使って発現される。

【0695】

2mLのLB／カナマイシン（10μg／mL）培養液は、所望の類似体で形質転換されたBL21（DE3）プレートからのスワイプにより播種される。これにより、コロニー間の発現レベルの変動を引き起こす効果が低減される。この培養液は、37℃で激しく振盪を加えながら一晩増殖され、翌日、10mLのLB／カナマイシン培養液は、一晩培養液（OD600：約0.4～0.5）由来の1mLを播種される。一晩培養液の残りのmLは、グリセリンストックとして凍結してもよい。

10

【0696】

増殖培養液の10mLを37℃にして、OD600が0.8～0.9に達するまで250rpmで30～45分間振盪を加える。これを、次に、1mMのIPTGで誘導し（1mLを非誘導培養液対照として取っておいてもよい）、通常、誘導後3～4時間で採取してSDS-PAGEで解析した。

【0697】

発現の経時変化（例えば、誘導後1、2、4、6時間の時点およびO／N）を取って、蓄積、タンパク質安定性、等の速度を測定することも可能である。

20

【0698】

ゲル分析：誘導後の所望の時点で、培養液から1mLを採取し、細胞を遠心沈降させ、2X SDS-PAGEの100μLに再懸濁し、超音波処理して粘度を下げ、10μLをSDS-PAGEに供する。必要に応じ、非誘導対照または対照、および／または既知の陽性対照または標準と比較することができ、発現レベルを推定することができる（例えば、良好発現は、>100μg／mLであろう）。ウェスタンブロット分析もまた使用できる。4mLの培養液を残しておくこと、封入体を調製すること（不溶性の類似体を発現させる場合は）、および高発現タンパク質の同一性を確認するためにこれらの質量分析を行うことも、また、可能である。

30

【0699】

より大規模のタンパク質発現に対しては、>250mLのLB／カナマイシン（10μg／mL）に250μLの凍結グリセリンストックを播種し、一晩増殖させる。次の日、10X 1L LB／カナマイシン培養液に、一晩培養液由来の25mLを播種する（OD600：約0.1）。

【0700】

1Lの培養液を37℃、250rpmでOD600が0.8～0.9に達するまで約2時間増殖させる。次に、1mMのIPTGで誘導し、誘導後4時間で、または翌朝採取する（採取には、4,000rpmで15分の遠心分離を使ってもよい）。エンドトキシンを減らし精製を促進することを望む場合は、ペレットを50mMトリス-HCl、pH8.0（容器をすすぐには、ペレット当たり50mL＋50mL）ですすぐ。ペレットを一緒にプールし、再度遠心分離を行う。

40

【0701】

実施例36

ピキア発現試験－DNA調製、電気穿孔、発現プロトコル

この実施例は、本発明のレラキシンポリペプチドをピキア中で調製するプロトコルを提供する。配列番号34、35、36、および37が使用され、ピキア中へのクローニングのためにプラスミドが使用でき、このまたは他の改変プラスミド（改変は、当技術分野で既知の方法を使ってプラスミドに加えられる）を使って、ピキア中でレラキシンポリペプチドのタンパク質発現を得ることができる。

50

【0702】

プロトコルのday 1に、典型的には、消化される μg DNA当たり、2 Uの酵素を使った一晚の消化があり、また、50 mLフラスコ中の10 mL YPhyD培養液中で、30℃、260 rpmで振盪しながらグリセリンストックを一晚播種する。

【0703】

DNA調製

最初、1/10容量の無菌の3M NaOAc、次に、0.7容量の無菌のIPAを加えてDNAを析出させ、試料を激しく混合し、-20℃または-70℃で凍結まで一晚析出を続ける。その後、DNAを遠心分離（卓上遠心機、14,000 rpm/10分）によりペレット化し、上清を取り除き、ペレットを500 μL の無菌の70% ETOHで洗浄する。遠心分離（卓上遠心機、14,000 rpm/10分）を行い、上清をデカント後、ペレットを15～20分間空気乾燥する。DNAペレットを無菌の水で1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に再懸濁し、ピキアを10 μg DNAで形質転換する。

10

【0704】

電気穿孔

OD₆₀₀の一晚培養液をYPhyDでOD₆₀₀=0.2に希釈する。OD₆₀₀が0.8～1.0になるまで、260 rpm、30℃で培養液を振盪する。遠心分離（4000 rpm/5分）により細胞を集める。培地をデカントし、20 mLの氷冷無菌水で細胞を洗浄し、再度デカントし、繰り返す。水洗後、20 mLの氷冷無菌1 Mソルビトールでペレットを洗浄し、デカント後、洗浄細胞ペレットを600 μL の1 M冷ソルビトールに再懸濁し、その後これを氷上で貯蔵してもよい。

20

【0705】

無菌の1.5 mLエッペンドルフチューブ中で洗浄細胞からの50 μL を10 μg の直鎖状DNAと混ぜ、ゆっくり混合し、氷上で25分間インキュベートする。長いピペットチップを使って、細胞/DNA混合物を予め冷やした0.2 cmキューベットに移す。次の設定のBioRad GenePulsar II装置を使って細胞を電気穿孔する：2000 V、200 オーム、25 μF d（単一パルスを使用）。その後、直ちに、0.5 mLのYPhyD培地をキューベットに加え、ピペット操作により混合する。全含有物を無菌の丸底チューブに移し、30℃で30分間ゆっくり（200 rpm）振盪する。播種して、細胞を均等に広げ、プレートを反転させながら30℃で3日間インキュベートする。

30

【0706】

インキュベーションの3日後、ループを使ってコロニーを採取し、50 mLフラスコ中の10 mLのBYPhyD培地に播種し、30℃で3日間インキュベートする。20 μl プレート上のコロニーを数え、平均数を記録し、その後、株名およびクローン番号、レタキシシン（すなわち、発現タンパク質）、ならびに日付の標識を付けた2セットのクライオバイアルを最初に用意して、細胞を採取する。培養液を15 mLコニカルチューブに移し、各培養液のOD₆₀₀を測定し、培養液をYPhyD培地で1:50または1:20に希釈する。培養液の一定分量をグリセリンストック用に保存する。その後、酵母をRT、4000 rpmで5分間ペレット化し、上清を新しく標識した15 mLコニカルチューブに移し、分析データ採取用に必要となるまで、-20または-80℃で貯蔵する。

40

【0707】

タンパク質発現解析

試料を4～12% NuPAGE TBゲル（Novex）にかける。SDS-PAGE試薬はInvitrogenから入手、ウェスタンブロットまたは染色ゲル分析により解析。

培地の配合

Buffered Yeast Phytone Dextrose (BYPhyD)

酵母エキス 10 g/L

ファイトンペプトン 20 g/L

1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH6) 100 mL/L

10X YNB 100 mL/L

50

20%デキストロース 100mL/L
 Yeast Phytone Dextrose (YPhyD)
 酵母エキス 10g/L
 ファイトンペプトン 20g/L
 20%デキストロース 100mL/L
 10X YNB (13.4%酵母ニトロゲンベース、硫酸アンモニウム含有、アミノ酸不含)
 酵母ニトロゲンベース、 134g/L
 【0708】

実施例37

レラキシナ21G産生

この実施例では、4.0L培養液を発酵させて、13.4gウエット細胞ペーストを生じ、トリトン-X100含有および不含の場合について、封入体調製を行った。この方式で、2.07gウエット封入体を産生し、その後、可溶化およびリフォールディングを行った。封入体を、3mMの最終濃度に相当する、1gのウエット封入体(1B)当たり200mLのH₂Oに再懸濁し、再懸濁液にシステインを加えた。次に、pHを11.5へ増加し、RTで1時間かけて1Bを可溶化した。その後、可溶化物のpHを10.6±0.1に下げて、リフォールディングを起こさせ、2~8℃で約72時間貯蔵した。これらの結果を図10に示す。最終pH3.0、0.45μMに達するまでHClを加えることにより、リフォールディング反応を停止させ、濾過後、さらに処理するまで、2~8℃で貯蔵した。

【0709】

リフォールディングされたタンパク質を、トリス塩基を使ってリフォールディング停止後のpHを8.0に上げることににより精製し、Q HPカラムに直接ロードした。この場合に示された装填物の伝導率は、>3.5mS/cmであった。操作条件は：(A)20mMトリス、8.0；(B)20mMトリス、8.0；200mM NaCl、を使い、30CVに対し0~100%B、とした。正確にリフォールディングされたプロインシュリンをプールし、79mgのプロインシュリンを回収した。

【0710】

限外濾過／透析濾過(UF/DF)を行い、25mMの亜鉛を使って析出させ、析出したタンパク質に、20mMのNaOAc、4.0を加えて2mg/mLの濃度にし、これに、30%ACN、5mM EDTAおよび20K PEGを加えて、最終の10:1のタンパク質対PEGモル比率とし、28℃で48~72時間インキュベートした。

【0711】

PEG反応物を0.5X PEG緩衝液Aで1:10(0.22μM)に希釈し、濾過後、SP650Sカラムに供した。操作条件は：(A)10mM NaOAc、4.0、1mM EDTA；(B)10mM NaOAc、4.0、1mM EDTA、0.4M NaCl；20CVに対し0~50%Bとし、PEG試料は10mMクエン酸Na、6.5；150mM NaCl中で処方した。これは図12に示す。

【0712】

これらの方法は、非天然アミノ酸を有し、精製およびペグ化変異体の最終タンパク質量が0.1~22mgの範囲の、種々のレラキシノポリペプチドを産生するのに使用された。ACNは、PEG反応でPEG/タンパク質混合物の可溶化を助けることが明らかになり、また、pI(等電点)での亜鉛沈殿が、CANの存在下の濃縮を促進した。

【0713】

実施例38

天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの安全性および／または有効性のヒト臨床試験

【0714】

目的：皮下に投与した天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化組換えヒトレラキ

10

20

30

40

50

シンの安全性および薬物動態学を観察すること。

【0715】

患者：20～40才、体重60～90kgの18名の健康なボランティアを本試験に登録。被験者は、実験室での血液学または血清化学に関する臨床的に有意な異常な数値がなく、尿毒性検査、HIV検査、およびB型肝炎表面抗原が陰性である。被験者は、次記のいずれかの証拠があつてならない：高血圧症；何らかの原発性血液疾患の病歴；顕著な肝臓、腎臓、心臓血管、消化管、尿生殖器、代謝、神経疾患の病歴；貧血または発作障害の病歴；細菌または哺乳類由来生成物、PEG、または人血清アルブミンに対する既知の感受性；カフェイン含有飲料に対する習慣性および大量消費者；試験登録の30日以内のいずれか他の臨床試験への参加または輸血または献血の実施；試験登録の3ヶ月以内にレ
10
ラキシンを受けた；試験登録の7日以内に病気をした；および試験登録の14日以内の試験前身体検査または臨床実験室評価で顕著な異常があつた。全ての被験者は、安全性に関し評価可能であり、薬物動態解析用の全ての血液収集は、予定通り行われる。全ての試験は、倫理委員会承認および患者の同意を得て行った。

【0716】

試験デザイン：これは、健康な男性ボランティアによるフェーズI、単一施設、非盲検、無作為化、2期クロスオーバー試験である。18人の被験者は、2つの治療順群（9人被験者／群）の1つに無作為に割り当てられる。レラキシンは、等用量の天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンおよび選択された市販製品を使って、2つの別々の投薬期間にわたりボーラスs.c.注射として大腿上方に投与される。市販製品の投
20
与の用量と頻度は、パッケージラベルのインストラクションの通りである。市販製品を使った追加の投薬、投薬頻度、または要望による他のパラメータは、追加の被験者群を含めることにより、試験に追加できる。各投薬期間は、14日間の休薬期間で分離されている。被験者は、それぞれ2つの投薬期間に対し、少なくとも投薬前の12時間および投薬後の72時間試験施設に拘束される。しかし、投薬期間の間は拘束されない。さらにペグ化レラキシンで試験されるべき追加の投薬、頻度、または他のパラメータがある場合は、追加の被験者群が加えられる。試験レラキシン製剤は、天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンである。

【0717】

血液サンプリング：直接静脈穿刺によりレラキシン投与前後に連続的に血液が採取される。血清レラキシン濃度測定用の静脈血液サンプル（5mL）が、投薬の約30、20、および10分前に（3ベースライン試料）、および投薬後の凡そ次の時間：30分ならびに1、2、5、8、12、15、18、24、30、36、48、60および72時間に
30
採取される。各血清試料は、2つの分割量に分けられる。全ての血清試料は、-20℃で貯蔵される。血清試料は、ドライアイスに乗せて輸送される。day1の最初の投与の直前に、day4の朝に、day16の投与の直前に、およびday19の朝に、空腹時臨床実験室試験（血液学、血清化学、および尿検査）が行われる。

【0718】

生化学分析方法：血清レラキシン濃度の測定に、ELISAキットが使われる。

【0719】

安全性測定：各投薬の直前（Day1および16）、ならびに各投薬後6、24、48、および72時間にバイタルサインが記録される。安全性測定は、有害事象の発生率と型および臨床実験室試験のベースラインからの変化に基づいている。さらに、血圧を含むバイタルサイン測定値の試験前からの変化、および身体検査結果が評価される。
40

【0720】

データ分析：投与後の血清濃度値は、それぞれの投与後の値から、投薬30、20、および10分前に集めた3つの試料由来のレラキシンレベルの平均化から決めた平均ベースラインレラキシン濃度を差し引くことにより、投与前ベースラインレラキシン濃度に対し補正される。投与前の血清レラキシン濃度が、アッセイの定量化レベルより低い場合は、その濃度は、平均値の計算に含まれない。薬物動態学的パラメータは、ベースラインレ
50

キシンの濃度に対し補正された血清濃度データから決定される。薬物動態学的パラメータは、最新バージョンのBIOAVLソフトウェアを使って、Digital Equipment CorporationのVAX8600コンピュータシステム上でのモデル非依存法により計算される。下記の薬物動態学パラメータを測定する：ピーク血清濃度（ C_{max} ）；ピーク血清濃度までの時間（ t_{max} ）；線形台形則を使用して計算された時間0から最後の血液サンプリング時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC）：（AUC₀₋₇₂）；および消失速度定数から計算された消失半減期（ $t_{1/2}$ ）。消失速度定数は、 $\log$ －線形濃度－時間プロットの終末相線形領域における連続データ点の線形回帰により推定される。各治療に対し、薬物動態学的パラメータの平均、標準偏差（SD）、および変動係数（CV）が計算される。パラメータ平均の比率（保存製剤／非保存製剤）が計算される。

10

【0721】

安全性の結果：有害事象の発生率は、治療群全体に均等に分布している。ベースラインまたは試験前臨床の実験室試験もしくは血圧からの臨床的に有意な変化は無く、また、試験前の身体検査結果およびバイタルサイン測定値からの顕著な変化は無い。2つの治療群に対する安全性プロファイルは、類似であると考えべきである。

【0722】

薬物動態学的結果：天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの受けた後の全ての18人の被験者の各測定時点での平均血清レラキシン濃度－時間プロファイル（ベースラインレラキシンレベルに対し無補正）。全ての被験者は、正常な生理学的範囲内で、投与前ベースラインレラキシン濃度を有するはずである。薬物動態学的パラメータは、投与前平均ベースラインレラキシン濃度に対し補正された血清データから測定され、 C_{max} および t_{max} が求められる。いずれの選択された臨床的比較器に対しても、平均 t_{max} は、天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの t_{max} よりも有意に短い。消失半減期の値は、天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの消失半減期と比較して、試験した前臨床の比較器に対して、有意に短い。

20

【0723】

本試験は、健康な男性被験者で行われているが、他の患者集団；例えば、糖尿病の男性もしくは女性患者、癌の男性もしくは女性患者または慢性腎不全、小児腎不全患者、自己術前貯血プログラムを実施中の患者、または待機手術の予定のある患者でも、類似の吸収特性および安全性プロファイルが予測されるであろう。

30

【0724】

結論として、天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの単回用量皮下投与は、健康な男性被験者に対し安全で、耐容性良好であると思われる。比較に基づく有害事象発生率、臨床の実験室の値、バイタルサイン、および身体検査結果に基づいて、市販の形態のレラキシンおよび天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンの安全性プロファイルは、同等であると思われる。天然ではコードされないアミノ酸を含むペグ化レラキシンは、潜在的に大きな臨床的有用性を患者および医療提供者に提供する。

【0725】

実施例39

40

レラキシンの機能アッセイ開発

この実施例は、レラキシンの機能アッセイの詳細を提供する。ヒト末梢血単球、THP-1細胞を、陽性対照イソプロテレノールおよびフォルスコリンと一緒に使って、測定可能なcAMP増加を立証した。THP-1細胞を、500uM IBMX中で30分間プレインキュベートし、2uMフォルスコリンで20分間RLXとの同時刺激を行った。イソプロテレノール、フォルスコリン、ならびに野性型A（B鎖の第1アミノ酸位置にアラニンを含む）、および変異体RLX-BA1-AV13pAF（B鎖の第1アミノ酸位置にアラニンの骨格アミノ酸配列を有し、A鎖の位置13（バリン）のpAF置換を有し、結合した4つの異なるサイズ；5K、10K、20K、および30KのPEGを有するレラキシン変異体）を含むレラキシンポリペプチドを用いた（表5

50

)。

【表 8】

表 5 : 機能アッセイ E C 5 0 未加工値 [n g / m L]

試料	11/4/2010	11/5/2010	11/5/2010
RLX-D-WT	1.5	1.5	1.0
RLX-A-WT-001	3.6	3.3	2.6
RLX-A-AQ1-20KPEG-001		38	
RLX-A-AA5-20KPEG-001		41	
RLX-A-AV13-20KPEG-001		56	
RLX-A-AR18-20KPEG-001		68	
RLX-A-BV7-20KPEG-001	54		
RLX-A-BA18-20KPEG-001	172		
RLX-A-BW28-20KPEG-001	172		
RLX-A-BE5-20KPEG-001			45
RLX-D-BE5-20KPEG-001			58
RLX-D-AL2-20KPEG-001			43

10

【0726】

実施例 40

この実施例は、S D ラットの単回皮下注射後の 20 k D a ペグ化レラキシンポリペプチ
ドの薬物動態学的特性を評価する。

20

【0727】

約 7 ~ 8 週齢 (試験開始時約 280 g) の S p r a g u e - D a w l e y (S D) ラッ
トを C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s (C R L) から入手した。
この動物は、C R L での頸静脈カテーテル挿入を受けた。試験の前に動物を 3 日間順化し
た。

【0728】

動物は、d a y 1 に単回皮下注射を受け、その後の 80 時間にわたり P K 試料が集めら
れた。血清濃度分析用血液サンプルが、下記のサンプリングスケジュール (サンプリング
時間は、おおよその時間である) に従って、P E G - レラキシンで処理された動物から採
取された：

30

【0729】

D a y 1 : 投与前、投与後 1、2、4、8、12、25、34、50、58、73 およ
び 80 時間目

【0730】

化合物濃度は、A m b r x で開発されたアッセイに基づく架橋 E C L A を使って測定さ
れた。濃度は、対応する投与化合物から生成される検量線を使って計算され、エクセルス
プレッドシートフォーマットで報告された (付録参照)。薬物動態学的パラメータは、モ
デル化プログラム W i n N o n l i n (P h a r s i g h t、バージョン 5.1) を使っ
て推定された。個別動物データに対し、l i n e a r - u p / l o g - d o w n 台形積分
を含むノンコンパートメント解析を使用し、濃度データを均等重みとした。2 - コンパー
トメント、一次消失モデルおよび G a u s s - N e w t o n (L e v e n b e r g - H a
r t l e y) モデル適合方程式を使って、コンパートメント解析を行った。表 6 は、時間
に対する群平均 P E G - レラキシン血清濃度値を示す。図 8 は、投与した全 P E G - レラ
キシン化合物についての、時間に対する群平均血清濃度の比較である。全用量群は、測定
可能なレベルの血清 P E G - レラキシンを有していた。

40

【0731】

0.5 m g / k g P E G 20 K - A Q 1 - R L X の S C 投与動物に対する個別血清濃度
V S 時間のプロットを図 9 に示す。0.5 m g / k g P E G 20 K - A A 5 - R L X の S
C 投与動物に対する個別血清濃度 V S 時間のプロットを図 10 に示す。0.5 m g / k g

50

PEG 20 K-A R 1 8-R L X の S C 投与動物に対する個別血清濃度 V S 時間のプロットを図 1 1 に示す。0. 5 m g / k g P E G 2 0 K-B V 7-R L X の S C 投与動物に対する個別血清濃度 V S 時間のプロットを図 1 2 に、0. 5 m g / k g P E G 2 0 K-B W 2 8-R L X の S C 投与動物に対する個別血清濃度 V S 時間のプロットを図 1 3 に、0. 5 m g / k g P E G 2 0 K-A V 1 3 の S C 投与動物に対する個別血清濃度 V S 時間のプロットを図 1 4 に、それぞれ示す。

【 0 7 3 2 】

皮下投与動物に対する血清濃度 V S 時間データのノンコンパートメント解析を表 6 にまとめる。

【表 9 - 1】

群	被験物質	用量 (mg/kg)	経路	性別	時間 (hr)	平均濃度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	投与前	定量限界 未満	評価せず ^a	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	1	30.8	19.4	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	2	87.4	25.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	4	184.8	50.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	8	237.6	61.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	12	371.2	106.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	25	394.0	50.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	34	278.7	59.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	50	63.4	11.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	58	45.6	6.8	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	73	20.3	5.6	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	80	11.6	1.3	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	投与前	定量限界 未満	評価せず ^a	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	1	19.9	6.4	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	2	100.1	51.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	4	185.0	104.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	8	264.7	128.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	12	434.3	135.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	25	438.0	55.2	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	34	353.5	44.2	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	50	86.9	19.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	58	62.4	10.6	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	73	32.8	8.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄	80	22.1	5.4	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	投与前	定量限界 未満	評価せず ^a	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	1	33.9	17.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	2	109.7	32.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	4	172.7	48.2	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	8	270.5	55.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	12	332.5	57.7	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	25	398.6	37.6	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	34	264.3	33.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	50	76.7	6.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	58	61.8	9.0	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	73	25.0	4.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄	80	14.9	3.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄	投与前	定量限界 未満	評価せず ^a	5
4	20KPEG-8V7	0.5	SC	雄	1	25.7	4.6	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄	2	98.9	20.1	5

10

20

30

40

【表 9 - 2】

4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	4	248.5	75.5	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	8	343.5	81.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	12	457.3	91.0	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	25	518.5	57.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	34	270.4	64.5	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	50	104.0	14.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	58	63.5	8.1	5
4	20KPEG-8V7	0.5	sc	雄	73	26.0	3.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	sc	雄	80	22.6	2.6	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	投与前	定量限界未満	評価せず	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	1	36.4	15.4	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	2	107.9	61.5	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	4	228.5	86.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	8	380.9	144.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	12	486.6	135.4	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄	25	511.0	60.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	34	404.8	51.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	50	184.2	31.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	58	122.3	37.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	73	48.8	6.1	5
5	20KPEG-BW28	0.5	sc	雄	80	37.1	5.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	投与前	定量限界未満	評価せず	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	1	44.9	16.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	2	138.9	60.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	4	345.7	117.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	8	533.6	157.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	12	630.1	201.2	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	25	742.5	117.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	34	540.7	31.0	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	50	320.9	21.3	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	58	209.4	22.5	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	73	75.0	4.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	sc	雄	80	58.7	7.7	5

【表 10】

表 7

	AQ1-RLX	AA5-RLX	AR18-RLX	BV7-RLX	BW28-RLX	AV13-RLX
消失 HL (hr)	10.7	12.2	12.5	13.1	13.9	14.6
C _{max} (ng/mL)	394.0	438.0	345.9	471.6	511.0	742.5
T _{max} (hr)	25.0	25.0	25.0	12.0	25.0	25.0
AUC _{inf} (ng*hr/mL)	14237.9	16095.9	12985.5	17260.9	22191.2	32230.5
V _z (mL/kg)	540.7	547.4	694.7	546.9	452.6	325.4
CL (mL/hr)	35.1	31.1	38.4	28.9	22.5	15.5
MRT (hr)	26.7	29.4	27.7	27.9	31.1	32.7

濃度 VS 時間曲線をノンコンパートメント解析 (Pharsight、バージョン 4.1) により評価した。群あたりの N = 5 ラット；消失 HL：消失半減期；C_{max}：測定最大血清濃度；T_{max}：C_{max} に達した時間；AUC_{inf}：無限大に外挿された全血清試料／時点に対する濃度－時間曲線下面積；CL：見かけの合計血清クリアランス；V

z：終末相の間の見かけの分布量

血清濃度測定に使ったECLIA法で投与溶液を測定した。投与溶液をアッセイの範囲に入るように希釈した。全ての20KPEG-RLX投与溶液が、指定の30パーセントの理論値からのズレ(PDT)内に入った。下表8に、本試験用投与溶液分析の結果をまとめる。

【表11】

表 8

緩衝液中の投与前 (DSA1)	名目濃度 (ng/mL)	希釈係数	濃度 (ng/mL)	%PDT
RLX A-AQ1-20K PEG	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K PEG	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K PEG	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K PEG	500000	20000	571645	14

10

【0733】

実施例 4 1

20

この実施例は、SDラットの単回皮下注射後の野性型(WT)レラキシン化合物の薬物動態学的特性を評価する。

【0734】

約5週齢(試験開始時約280g)のSDラットをCharles River Laboratories(CRL)から入手した。この動物は、CRLでの頸静脈カテーテル挿入を受けた。試験の前に動物を3日間順化した。

【0735】

動物は、day 1に単回皮下注射を受け、その後の12時間にわたりPK試料が集められた。血清濃度分析用血液サンプルが、下記のサンプリングスケジュール(サンプリング時間は、おおよその時間である)に従って、WT rhレラキシンで処理された動物から採取された：Day 1：投与前、投与後0.33、0.66、1、1.5、2、3、4、5、6、9および12時間目。

30

【0736】

化合物濃度は、Ambrxで開発されたアッセイに基づく架橋ECLIAを使って測定された。濃度は、対応する投与化合物から生成される検量線を使って計算され、エクセルスプレッドシートフォーマットで報告された(付録参照)。薬物動態学的パラメータは、モデル化プログラムWinNonlin(Pharsight、バージョン5.1)を使って推定された。個別動物データに対し、linear-up/log-down台形積分を含むノンコンパートメント解析を使用し、濃度データを均等重みとした。

【0737】

40

表9は、時間に対する群平均wt rhレラキシン血清濃度値を示す。図1は、wt rhレラキシンに対する群平均血清濃度VS時間の関係を比較したものである。全動物は測定可能なレベルの血清レラキシンを有していた。

【0738】

0.5mg/kg wtレラキシンのSC投与動物に対する個別血清濃度VS時間のプロットを図2に示す。皮下投与動物の血清濃度VS時間データのノンコンパートメント解析を表2にまとめる。表9は、投与溶液分析のまとめである。投与溶液は、30%未満またはそれに等しいPDTの許容基準を満たした。

【表 1 2】

表 9

群	被験物質	用量 (mg/kg)	経路	性別	時間 (hr)	平均濃度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	投与前	定量限界 未満	評価せず	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	0.33	244.0	18.7	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	0.66	227.9	45.6	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	1	211.7	45.9	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	1.5	166.7	38.7	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	2	119.9	24.5	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	3	52.5	23.0	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	4	24.1	11.4	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	5	7.7	2.6	5
1	wt rh レラキシン	0.5	SC	雄	6	定量限界 未満	評価せず	5
1	wt rh レラキシン	0.5	sc	雄	9	定量限界 未満	評価せず	5
1	wt rh レラキシン	0.5	sc	雄	12	定量限界 未満	評価せず	5

【表 1 3】

表 1 0. SD ラットに投与した wt rh レラキシンの薬物動態学的パラメータ値

	wt rh レラキシン
消失 HL (hr)	0.8 (0.1)
C _{max} (ng/mL)	258.1 (26.1)
T _{max} (hr)	0.5 (0.2)
AUC _{inf} (ng*hr/mL)	508.9 (81.8)
V _z (mL/kg)	1159 (284)
CL (mL/hr)	1006 (185)
MRT (hr)	1.56 (0.16)

濃度 VS 時間曲線をノンコンパートメント解析 (Pharsight、バージョン 4.1) により評価した。群あたりの N = 5 ラット；消失 HL：消失半減期；C_{max}：測定最大血清濃度；T_{max}：C_{max} に達した時間；AUC_{inf}：無限大に外挿された全血清試料／時点に対する濃度－時間曲線下面積；CL：見かけの合計血清クリアランス；V_z：終末相の間の見かけの分布量。括弧中の数字は、標準偏差を意味する。

表 1 1

血清濃度測定に使った ECLA 法で投与溶液を測定した。投与溶液をアッセイの範囲に入るように希釈した。全ての wt rh レラキシン投与溶液が、指定の 30 パーセントの理論値からのズレ (PDT) 内に入った。下表 3 に、本試験用投与溶液分析の結果をまとめる。

【表 1 4】

表 1 1. 被験物質の投与溶液分析

投与溶液分析	名目濃度 (ng/mL)	希釈係数	濃度 (ng/mL)	%PDT
製剤緩衝液中の 0.5 mg/mL 投与前 (DSA1)	250000	10000	208830	-16
血清中 0.5 mg/mL 投与 前 (DSA2)	250000	10000	225898	-10

【0 7 3 9】

10

実施例 4 2

この実施例は、SDラットの単回皮下注射後の野性型 20 kDa ペグ化レラキシン化合物の薬物動態学的特性を評価する。

【0 7 4 0】

約 7～8 週齢（試験開始時約 280 g）の SDラットを Charles River Laboratories (CRL) から入手した。この動物は、CRLでの頸静脈カテーテル挿入を受けた。試験の前に動物を 3 日間順化した。動物は、day 1 に単回皮下注射を受け、その後の 82 時間にわたり PK 試料が集められた。血清濃度分析用血液サンプルが、下記のサンプリングスケジュール（サンプリング時間は、おおよその時間である）に従って、PEG-レラキシンで処理された動物から採取された：Day 1：投与前、投与後 1、3、5、10、25、34、48、58、72 および 82 時間目。

20

【0 7 4 1】

化合物濃度は、Ambrx で開発されたアッセイに基づく架橋 ECLA を使って測定された。濃度は、対応する投与化合物から生成される検量線を使って計算され、エクセルスプレッドシートフォーマットで報告された（付録参照）。薬物動態学的パラメータは、モデル化プログラム WinNonlin (Pharsight、バージョン 5.1) を使って推定された。個別動物データに対し、linear-up/log-down 台形積分を含むノンコンパートメント解析を使用し、濃度データを均等重みとした。2-コンパートメント、一次消失モデルおよび Gauss-Newton (Levenberg-Hartley) モデル適合方程式を使って、コンパートメント解析を行った。

30

【0 7 4 2】

表 1 2 は、群平均 PEG-レラキシン血清濃度値 vs 時間の関係を示す。

【表 15 - 1】

表 12

群	被験物質	用量 (mg/kg)	経路	性別	時間 (hr)	平均濃度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	投与前	定量限界未満	評価せず	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	1	2912.8	203.7	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	3	1310.8	115.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	5	700.7	68.3	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	10	241.6	27.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	25	61.2	5.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	34	27.0	2.6	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	48	13.7	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	58	8.0	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	72	4.3	1.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄	82	2.2	0.6	4
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	投与前	定量限界未満	評価せず	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	1	16.3	4.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	3	75.8	20.2	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	5	96.3	26.7	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	10	135.1	30.1	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	25	257.4	48.5	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	34	184.9	26.8	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	48	159.9	31.7	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	58	86.5	24.6	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	72	20.3	1.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄	82	11.8	1.1	5

10

20

30

【表 15-2】

3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	投与前	定量限界未 満	評価せず	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	1	12.8	1.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	3	45.3	6.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	5	62.2	8.6	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	sc	雄	10	90.1	10.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	25	127.4	20.2	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	34	83.2	13.8	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄	48	32.6	2.6	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	sc	雄	58	16.3	0.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	sc	雄	72	4.9	0.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	sc	雄	82	2.7	0.4	3
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	投与前	定量限界未 満	評価せず	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	1	5.7	1.5	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	3	26.4	6.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	5	37.2	8.6	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	10	50.1	6.1	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	25	75.9	8.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	34	46.9	6.7	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	48	20.8	8.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	58	8.4	2.4	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	72	2.3	0.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	sc	雄	82	1.3	0.4	5

【0743】

実施例 4 3

この実施例は、雌ロングエバンスラットにおける野性型レラキシンおよびPEG-レラキシン変異体の薬理学的活性用量および全身性暴露を評価する。

【0744】

これらのシグナル生成試験の目的は、インビボ活性を確立し、PEG-レラキシン変異体の薬理学的に活性な用量を決定することであった。これらの目的を達成するために、生理学的に関連するレラキシン応答性評価項目を、雌ロングエバンスラットで評価した。この項目には、水摂取量、尿量、ならびに選んだ尿および血液臨床化学が含まれる。候補評価項目の特定を可能とするために、最初に（フェーズ1）、インビトロでの目標抑制の0.3X、1Xおよび10Xの血漿中濃度を達成するために計算された容量で野性型レラキシンを試験した。目標用量は、ボラス静脈内（IV）投与、続いて、6時間の連続注入により送達された。0.3X、1X、および10Xの野性型レラキシン容量は、それぞれ、ピークルに比べて、95%、68%、および32%の水摂取量の増加を誘導した。平均血漿ナトリウム濃度のベースラインから2および6時間の変化は、ピークル（0X）に対しては-9.5および1.2mEq/L；0.3Xでは-5.8および-9.0mEq/L；1Xでは1.0および-1.5mEq/L；10Xでは-4.7および-1.4mEq/L、であった。ベースラインから2および6時間の血漿モル浸透圧濃度の変化は、ピークル（0X）に対しては-20.7および1.0mosmol/kg水；0.3Xでは-11.0および-19.1mosmol/kg水；1Xでは0.3および-4.4mosmol/kg水；10Xでは-10.3および-3.8mosmol/kg水、であった。

【0745】

PEG-レラキシン（フェーズ2）を、 $1\mu\text{L}/\text{g}$ 体重のボーラス容量で投与し、血液を投与の2および6時間後に集め、また、尿を投与後6時間間隔で集めた。0.1X、0.3Xおよび1X用量でのPEG-レラキシン処理により、ピークル群に比べて、それぞれ、93%、128%および105%の水摂取量の増加が生じた。ベースラインから2および6時間の平均血漿ナトリウム濃度の変化は、ピークル（0X）に対し2.5および1.5mEq/L；0.1Xでは-1.5および-4.8mEq/L；0.3Xでは-4.0および-2.9mEq/L；1Xでは-2.3および-4.0mEq/Lであった。ベースラインから2および6時間の血漿モル浸透圧濃度の変化は、ピークル（0X）に対しては4.5および2.1mosmol/kg水；0.1Xでは-5.1および-11.0mosmol/kg水；0.3Xでは-8.2および-5.0mosmol/kg水；1Xでは-5.6および-9.5mosmol/kg水であった。野性型またはPEG-レラキシンによる処理後の尿臨床化学値明確な変化は無かった。これらのデータは、インビボ活性を立証し、また、その後のPEG-レラキシンを使ったインビボ疾患モデル試験に対する理論的な用量選択を可能とする。

【表16】

表13：動物群のデザイン

群	被験物質	動物ID	血漿中濃度(目標に対する増加倍数)	IV ボーラス投与濃度(mg/mL)	IV 注入濃度(mg/mL) ^c	# 動物/群
フェーズ1 野性型レラキシン投与 ^a						
1	野性型レラキシン	1F001-1F004	1X	0.003	0.08	4
2	野性型レラキシン	2F001-2F004	10X	0.03	0.8	4
3 ^b	野性型レラキシン	3F001-3F004	ピークル	ピークル	ピークル	4
4 ^b	野性型レラキシン	4F001-4F004	0.3X	0.001	0.026	4

^a群1および2（1xおよび10x）を最初に評価し、また、飲料水消費、ヘマトクリット、および尿量に与える被験物質関連効果が明らかたために、第2セットのラットに対する用量は、それぞれ、群3と4のピークルと0.3Xに修正された。群1と2の間には、少なくとも36時間の休薬期間があった。また、群3と4の間には、少なくとも36時間の休薬期間が生じた。

^b群1のラットは、第2の無作為化を受け、休薬期間後、群2に割り当てられた。群3のラットは、第2の無作為化を受け、群4に割り当てられ、動物番号001～004は、群1と3であったため、そのまま群2と4に残された；しかし、群番号命名の群2と群4は、チューブラベルと試料特定をわかりやすくするために、使用された。

^c野性型レラキシンは、 $100\mu\text{L}$ のボーラス容量、続けて、 $50\mu\text{L}/\text{時間}$ の注入速度で静脈内注入された。

【表17】

表14：

群	被験物質	動物ID	血漿中濃度(目標に対する増加倍数)	IV ボーラス投与濃度(mg/mL) ^a	# 動物/群
フェーズ2 PEG-レラキシン投与					
5	PEG-レラキシン	5F001-5F004	ピークル	NA	4
6	PEG-レラキシン	6F001-6F004	0.3X	0.03	4
7	PEG-レラキシン	7F001-7F004	0.1X	0.01	4
8	PEG-レラキシン	8F001-8F004	1.0X	0.1	4

^aボーラス用量は、 $1\mu\text{L}/\text{g}$ 体重の容量で投与された。

【0746】

フェーズ1 野性型レラキシシ

供給メーカーの手術により両側頸静脈カテーテルを留置された12～14週齢の雌ロングエバンスラットをCharles River Laboratoriesから入手した。2セットの4匹のラットを使用した、各セットを、2種の用量の野性型レラキシシの評価に使用した。群1と3は、それぞれ、群2と4に再使用されたために、群1と2ならびに群3と4の間に36時間以上の休薬期間を入れた。ラットは、食物および水を自由に利用できるようにし、投与の開始前夜、およびIVボラス投与および注入投与の開始後6時間、Culex ABS代謝ケージングシステム (Culex Automated Blood Sampler、Bioanalytical System Inc) に

10

【0747】

フェーズ1 野性型レラキシシ投与

フェーズ1では、各ラットは、1時間のIVボラスおよび6時間のIV注入を受けた。すなわち、外科的埋め込み頸静脈カテーテル経由のIVボラス注射、続いて外科的埋め込み頸静脈カテーテル経由のIV注入を受けた。第1セットの群1と2のラットおよび第2セットの群3と4のラットの間に、少なくとも36時間が休薬期間として与えられた。

【0748】

フェーズ2 PEG-レラキシシ

供給メーカーの手術により両側頸静脈カテーテルを留置された12～14週齢の雌ロングエバンスラットをCharles River Laboratoriesから入手した。4セットの4匹のラットを使用し、各セットを、1種の用量のPEG-レラキシシの評価に使用した。PEG-レラキシシを投与されたラットは、ペグ化合物の長期の血漿暴露のために、休薬期間後、再使用しなかった。ラットは、食物および水を自由に利用できるようにし、Culex ABS代謝ケージに収容した。

20

【0749】

フェーズ2 PEG-レラキシシ投与

フェーズ2では、ラットは、外科的埋め込み頸静脈カテーテル経由の1時間のIV注射を受けた。

【0750】

全てのボラスおよびIV投与溶液は、以下の全投与量溶液用の解凍および混合インストラクションに従って処方された：

30

【0751】

各投与製剤用の凍結試料ボトルを、解凍プロセスに対する1時間毎の検査を入れながら、4℃で3～4時間解凍する。解凍が完了するとすぐに、製剤を泡を生じさせないように注意し、ゆっくり反転させながら混合した。静脈内投与の直前に各製剤をゆっくり、かつ完全に混合するように注意した。各投与製剤を投与に使用するまで4℃に維持した。

【0752】

投与量を、調製の直前に準備し、各群は、下記の濃度の投与を受けた：

【表 18】

フェーズ 1 (群 1～4)	群 1: (1X)	IV ボーラス 0.003 mg/mL
		IV 注入 0.08 mg/mL
	群 2: (10X)	IV ボーラス 0.03 mg/mL
	群 3: (ピークル)	ボーラスおよび注入
	群 4: (0.3X)	IV ボーラス 0.001 mg/mL
		IV 注入 0.026 mg/mL
フェーズ 2 (群 5～8)		
	群 5: ピークル	IV ボーラス NA
	群 6: (0.3X)	IV ボーラス 0.03 mg/mL
	群 7: (0.1X)	IV ボーラス 0.01 mg/mL
	群 8: (1.0X)	IV ボーラス 0.1 mg/mL

【0753】

この試験で使用された動物は、体重測定値、頸静脈カテーテル開存性および機能性からの受容可能な所見に基づいて選択された。試験開始前にまたは投与開始後の血液収集期間の間に、投薬または血液収集に不適切なカテーテルであると特定された動物は、試験からはずされ、適切なカテーテルのラットと入れ替えられた。カテーテル留置ラットと化合物投与の入れ替えは、投薬スケジュール、スタッフの都合、およびベンダーからのラットの受入を考慮して、可能な限り早期に行われる。

【0754】

フェーズ 1：動物は、試験前体重に従って、無作為化され、群 1 に割り当てられる。投与の完了後、群 1 のラットは、休薬期間後、第 2 の無作為化を受け、群 2 に再割り当てされる。投与の完了後、群 3 のラットは、休薬期間後、第 2 の無作為化を受け、群 4 に再割り当てされる。

【0755】

フェーズ 2：動物は、試験前体重に従って、無作為化され、群 5～8 に割り当てられる。

【0756】

投与開始後、毎日、約 30 分ならびに 1、2、4、および 6 時間目。身体的および行動の変化の目視検査を行い、動物の身体姿勢、被毛、活性、排泄物、等の変化を調べた。投与前に、定期的に体重を測定し、記録した。

【0757】

血液および尿試料、収集、処理、および分析

フェーズ 1 試験プロトコル

ベースライン尿収集は、投与前夜に開始され、15～18 時間続けられ、冷却（ウェットアイス）バイアル中に集められた。ベースライン血液サンプル（約 400 μ L 全血）は、ベースライン尿収集の最後に集められた。実験の当日に、ラットは、被験物質 IV ボーラス注射に続けて、シリンジポンプ（Harvard 11 plus）で左頸静脈カテーテル経由、50 μ L/時間の量の一定の注入速度で 6 時間連続注入により野性型レラキシ

ン投与を受けた。レラキシシン注入の2時間および6時間後、2つの追加の血液サンプル（各約400 μ L全血）を集めた。全血液サンプルを、Culex ABSプログラム化サンプリング法を使って、右頸静脈カテーテル経由でK3 EDTA抗凝固剤含有試料チューブに集め、処理するときまで試料を冷蔵環境中に貯蔵した。レラキシシン注入の持続期間中を通して、尿を冷却バイアル中に連続的に集めた。各収集からの合計尿容量を記録し、2～5 mLの各尿試料を約-80℃維持に設定されたSeventh Wave Labsフリーザー中に貯蔵した。ボトル+水の注入前後の重量を比較することにより、6時間注入期間中の水摂取量を記録した。6時間の連続注入後、注入ポンプを停止し、第2の用量評価を受けさせる前に、少なくとも36時間の休薬期間をラットに取らせた。

【0758】

連続IV注入は、目標の安定な血漿薬剤濃度を維持するために必要であった。

フェーズ2試験プロトコル

ベースライン尿収集は、投与前夜に開始され、15～18時間続けられ、冷却バイアル中に集められた。ベースライン血液サンプル（約400 μ L全血）は、ベースライン尿収集の最後に集められた。実験当日、ラットは、10 mL/kg/日（1回用量）を越えない量で、単回用量のPEG-レラキシシンを静脈内に投与された。レラキシシン注入の2時間および6時間後、2つの追加の血液サンプル（各約400 μ L全血）を集めた。全血液サンプルを、Culex ABSプログラム化サンプリング法を使って、右頸静脈カテーテル経由でK3 EDTA抗凝固剤含有試料チューブに集め、処理するときまで試料を冷蔵環境中に貯蔵した。サンプリングの間、PEG-レラキシシン投与後0～6時間目に、尿を冷却バイアル中に連続的に集めた。各収集からの合計尿容量を記録し、2～5 mLの各尿試料を約-80℃維持に設定されたSeventh Wave Labsフリーザー中に貯蔵した。投与6時間後、鼠を死亡させた。薬剤注入期間の最初と最後のボトル+水の重量を比較することにより、6時間注入期間中の水摂取量を記録した。

【0759】

病理学

本実施例で既に記載のように、尿試料を集めた。2～5 mLの冷却尿試料をドライアイス上で凍結し、クレアチニンクリアランス測定用の尿クレアチニンおよびBUNの分析のためにドライアイス上に置いてAVLに輸送するまで、約-80℃で維持するように設定されたフリーザー中に貯蔵した。

【0760】

血液サンプルを、抗凝固剤をしてK₃ EDTAを使ったCulex ABSを使って集めた。15 μ Lの全血サンプルを未処理毛細管に入れ、一端を粘土でシールし、ヘマトクリット遠心機（International Equipment Company、IEC MB遠心機）で5分間、遠心分離した。製造メーカーから提供されたマイクロヘマトクリット読み取り装置を使って、ヘマトクリット結果を得た。

【0761】

収集スケジュールおよび下記に挙げた手続きに従って、野性型およびPEG-レラキシシンの全身性暴露測定ができるように血液を集めた。3つの収集間隔があった。収集時点は、フェーズ1およびフェーズ2に対し、投与後0、2、および6時間とした。フェーズ1：各時点当たり8動物。フェーズ2：各時点当たり16動物。収集容量は、約400 μ Lの全血。群1～8の全動物は、3つの時点で採血した：野性型レラキシシンIV投与およびPEG-レラキシシン投与群のIV投与後に対し、それぞれ、ベースライン（投与前t=0）ならびに注入開始後2時間および6時間。IV注入投与の開始時間および実際の各採血の時間を各動物の生データに記録した。スポンサーの判断により、試験実施の間、全身性暴露測定用としてAmbrexに血液を送らなかった。試料を約-80℃維持に設定のSeventh Wave Labsフリーザー中で冷凍保存し、スポンサーに返却する予定である。

【0762】

フェーズ1野生型レラキシシンの結果

ピークル（0X）処理ラットの6時間注入の間の平均水摂取量は、1.8 mL/100 g 体重であり、0.3X、1Xおよび10X野性型レラキシン処理ラットで、それぞれ、3.6、3.1、および2.4 mL/100 g 体重に増加した。これらは、0.3X、1Xおよび10X投与群で、ピークルに対し、それぞれ、95%、68%、32%の増加である。

【0763】

ベースライン、投与開始後2および6時間の平均ヘマトクリットは、ピークル処理ラットで、それぞれ、35.1%、35.0%、および34.3%；0.3X群では33.1%、33.7%、および32.3%；1X群では31.4%、32.0%および33.7%；10X群では29.7%、31.9%および30.4%であった。

10

【0764】

6時間注入の間の0.3X、1Xおよび10X群の平均尿量は、ピークル（0X）処理に対して、それぞれ、1.8、1.5、1.2および1.2 mL/100 g 体重であった。

【0765】

ベースライン、投与開始後2および6時間の平均血漿ナトリウム濃度は、ピークル（0X）群では139.3、129.8、140.5 mEq/L；0.3X群では141.8、136.0および132.8 mEq/L；1X群では138.8、139.8および137.3 mEq/L；10X群では137.0、132.3および135.6 mEq/Lであった。2および6時間でのベースラインからの変化は、ピークル（0X）群に対し9.5および1.2 mEq/L；0.3Xに対し-5.8および-9.5 mEq/L；1Xに対し1.0および-1.5 mEq/L；10Xに対し-4.7および-1.4 mEq/Lであった。

20

【0766】

血漿モル浸透圧濃度は、下記式を使って計算した：モル浸透圧濃度（OSM）=（2 * Na）+（Glucose/18）+（BUN/2.8）。ベースライン、開始後2および6時間の平均血漿モル浸透圧濃度は、0.3X群では277.3 mosmol/kg水；1X群では291.0、291.3および286.6 mosmol/kg水；10X群では286.4、276.1および282.6 mosmol/kg水であった。2および6時間でのベースラインからの変化は、ピークル（0X）では-10.7および1.0 mosmol/kg水；0.3Xでは-11.0および-19.1 mosmol/kg水；1Xでは0.3および-4.4 mosmol/kg水；10Xでは-10.3および-3.8 mosmol/kg水であった。BUN/Cr、Na排出の尿臨床化学データを下表にまとめる：

30

【表19】

表3. 野性型レラキシン（フェーズ1試験）の尿臨床化学データの要約

群	BUN /Cr	標準 誤差	Na 排出 (mEq/hr)	標準誤 差	BUN 排出 (mg/hr)	sem	CrCl (mL/min /100g)	標準誤 差
ピークル(ベースライン)	36	12	0.083	0.010	13.5	4.4	0.65	0.04
ピークル(6hr 試験)	26	3	0.079	0.018	9.4	2.3	0.60	0.15
0.3X (ベースライン)	66	9	0.055	0.005	17.3	3.9	0.38	0.06
0.3X (6hr 試験)	43	6	0.071	0.015	12.1	1.3	0.45	0.07
1X (ベースライン)	18	2	0.046	0.010	7.6	1.5	0.62	0.09
1X (6hr 試験)	19	4	0.030	0.003	4.6	1.5	0.36	0.05
10X (ベースライン)	21	2	0.063	0.001	8.5	1.1	0.69	0.04
10X (6hr 試験)	17	4	0.055	0.005	4.9	0.7	0.81	0.11

40

【表 2 0】

表 4. 野性型レラキシシ (フェーズ 1 試験) の尿臨床化学生データ

用量	群	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl (ml/min/100g)
ピークル	3F001 T0	68232	136	119	84	1080	0.702
ピークル	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0.257
ピークル	3F002 T0	68234	122	130	59	980	0.692
ピークル	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0.979
ピークル	3F003 T0	68236	276	130	54	2950	0.694
ピークル	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0.552
ピークル	3F004 T0	68238	355	126	52	3000	0.522
ピークル	3F004 T6	68239	176	152	71	1320	0.614
0.3X	4F001 T0	68791	272	47	22	1950	0.413
0.3X	4F001 T6	68792	174	112	25	1500	0.356
0.3X	4F002 T0	68793	274	68	42	1860	0.522
0.3X	4F002 T6	68794	180	88	42	1500	0.657
0.3X	4F003 T0	68795	230	54	25	1800	0.329
0.3X	4F003 T6	68796	180	82	60	1880	0.449
0.3X	4F004 T0	68797	225	68	23	1440	0.260
0.3X	4F004 T6	68798	365	152	68	3100	0.352
1X	1F001-T0	67488	194	<40	64	1480	0.526
1X	1F001-T6	67489	138	62	57	960	0.394
1X	1F002-T0	67487	203	74	93	1540	0.579
1X	1F002-T6	67496	296	161	88	1300	0.337
1X	1F003-T0	67490	110	85	64	820	0.495
1X	1F003-T6	67495	176	167	104	1440	0.236
1X	1F004-T0	67483	224	74	67	1420	0.882
1X	1F004-T6	67492	94	<40	24	740	0.476

【表 2 1】

表 4. 野性型レラキシシ (フェーズ 1 試験) の尿臨床化学生データ (続き)

用量	群	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl (ml/min/100g)
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0.670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0.729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0.598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0.618
10X	2F003-T0	67491	254	<40	103	1650	0.696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1.129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0.809
10X	2F004-T6	67493	212	125	85	1400	0.756

単位：Na (mEq/L) ; クレアチニン (mg/dL) ; BUN (mg/dL) 、ブドウ糖 (mg/dL) 、K (mmol/L) . CrCl : mL/min/100g BW
クレアチニークリアランス (CrCl) = (Ucreat. * Uvol) / (Pcreat. * U時間)

【表 2 2】

表 5. 野性型レラキシシ (フェーズ 1 試験) の生理学的データの要約

用量	水摂取量 (0~6hr) mL/100 g BW		ベースライン尿量 (-16~0hr) mL/100 g BW		尿量 (0~6hr) mL/100 g BW	
	平均	標準誤差	平均	標準誤差	平均	標準誤差
ビークル	1.8	0.4	4.1	0.4	1.8	0.3
0.3X	3.6	0.2	5.7	1.1	1.5	0.4
1X	3.1	0.6	3.8	0.6	1.2	0.6
10X	2.4	0.7	4.3	0.8	1.2	0.1

10

【表 2 3】

用量	ヘマトクリット (%)					
	0 hr		2 hr		6 hr	
	平均	標準誤差	平均	標準誤差	平均	標準誤差
ビークル	35.1	1.0	35.0	0.9	34.3	0.5
0.3X	29.7	1.1	31.9	1.2	30.4	0.4
1X	31.4	2.7	32.0	2.9	33.7	2.1
10X	29.7	1.1	31.9	1.2	30.4	0.4

20

【0767】

フェーズ 2 PEG-レラキシシ変異体の結果

投与後 6 時間の間のビークル (0X) 処理ラットの平均水摂取量は、1.5 mL/100 g 体重で、0.1X、0.3X および 1X PEG-レラキシシ変異体処理ラットでは、それぞれ、2.9、3.4、および 3.1 mL/100 g 体重に増加した。これらは、0.1X、0.3X および 1X 群について、ビークル群に比べそれぞれ、93%、128% および 105% の増加に相当する。

30

【0768】

投与後 6 時間の間の平均尿量は、ビークルでは 0.9、0.2、0.5 および 0.4 mL/100 g 体重 (それぞれ、0X、0.3X および 1X 群に対し) であった。ベースライン、投与後 2 および 6 時間の平均血漿ナトリウム濃度は、ビークル (0X) 群では、それぞれ、136.3、138.8 および 137.8 mEq/L; 0.1X 群では、それぞれ、138.5、137.0 および 133.7 mEq/L; 0.3X 群では、それぞれ、137.5、133.5 および 134.6 mEq/L; 1X 群では、それぞれ、137.3、135.0 および 133.3 mEq/L であった。ベースラインからの 2 および 6 時間の変化は、ビークル (0X) では 2.5 および 1.5 mEq/L; 0.1X では -1.5 および -4.8 mEq/L; 0.3X では -4.0 および -2.9 mEq/L; 1X では -2.3 および -4.0 mEq/L であった。

40

【0769】

ベースライン、投与後 2 および 6 時間の平均血漿モル浸透圧濃度は、ビークル (0X) 群では、それぞれ、285.4、289.9、および 287.5 mosmol/kg 水; 0.1X 群では、それぞれ、292.7、287.6 および 281.7 mosmol/kg 水; 0.3X 群では、それぞれ、287.6、279.4 および 282.6 mosmol/kg 水; 1X 群では、それぞれ、289.3、283.7 および 279.4 mosmol/kg 水であった。ベースラインからの 2 および 6 時間の変化は、ビークル (0X) では 4.5 および 2.1 mosmol/kg 水; 0.1X では -5.1 および -11.0 mosmol/kg 水; 0.3X では -8.2 および -5.0 mosmol/kg 水; 1

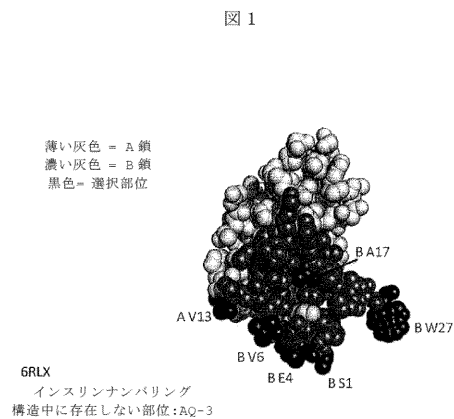
50

Xでは－5、6および－9.9 m o s m o l / k g 水であった。

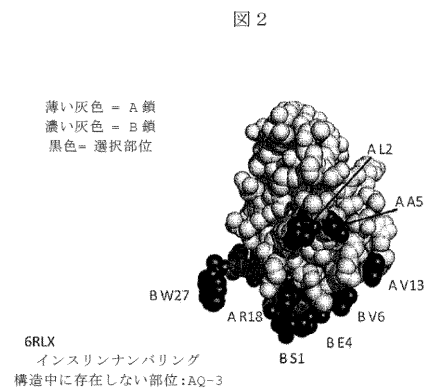
【0770】

本明細書記載の実施例と実施形態は、例示の目的のみのためのものであるが、これらを考慮すると、当業者なら、種々の修正または変更を思いつくことができ、これらは、本出願の趣旨と範囲および添付請求項の範囲に入るであろうことは理解されよう。全ての出版物、特許、特許出願、および／または本出願に引用されている他の文書は、それぞれ個別の出版物、特許、特許出願、および／または他の文書が、それぞれに、あらゆる目的のために参照によって組み込まれることが指示されている場合と同程度に、あらゆる目的のために参照によってその全体が組み込まれる。

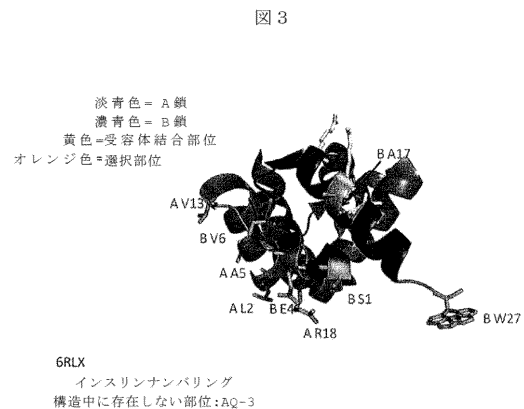
【図 1】



【図 2】

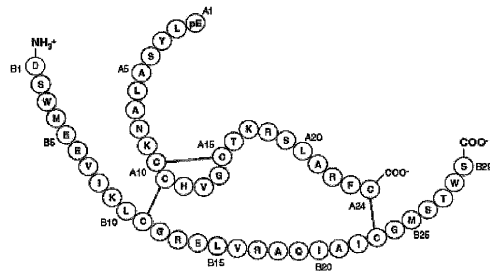


【図 3】



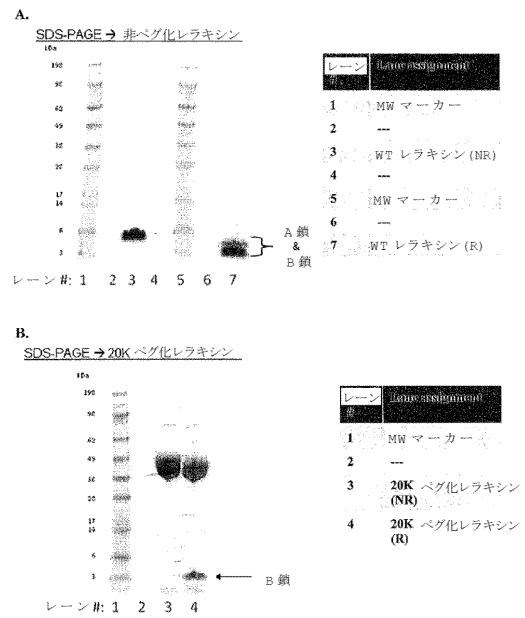
【図 4】

Figure 4



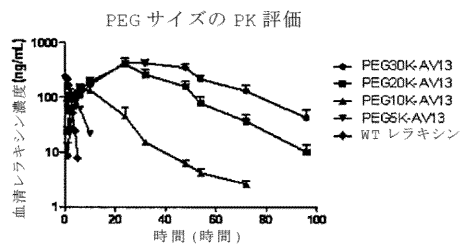
【図 6】

図 6



【図 7】

図 7



【図 8】

図 8 A

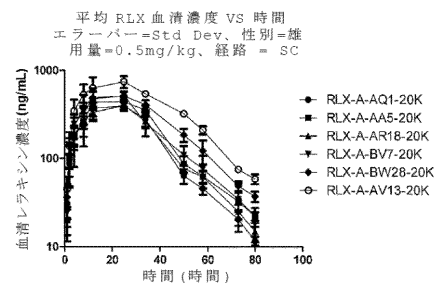
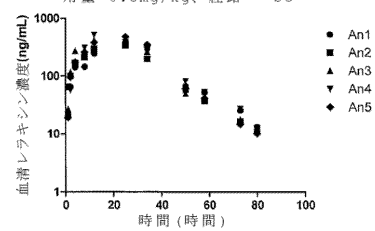
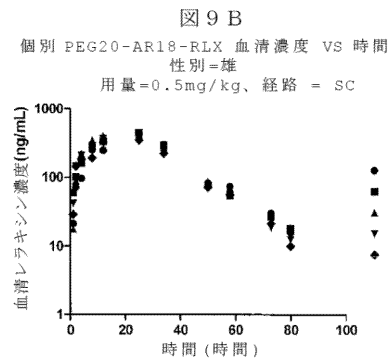
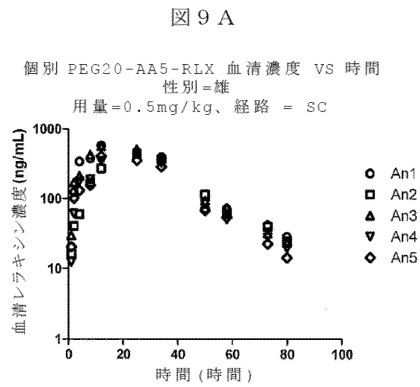


図 8 B

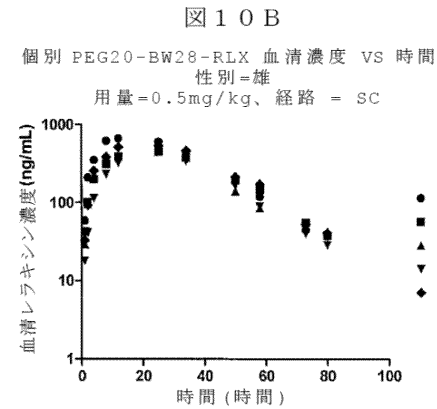
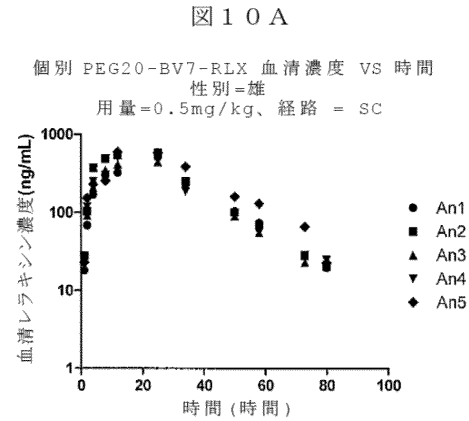
個別 PEG20-AQ1-RLX 血清濃度 VS 時間
性別=雄
用量=0.5mg/kg、経路 = SC



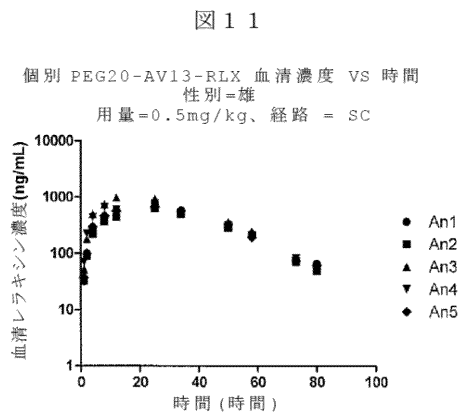
【図 9】



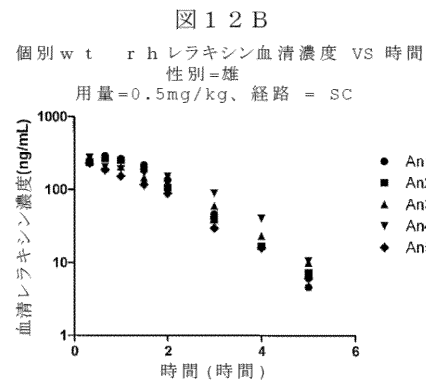
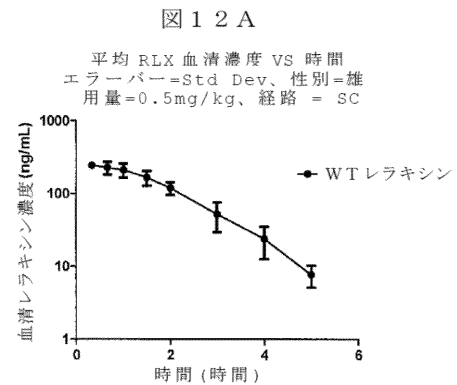
【図 10】



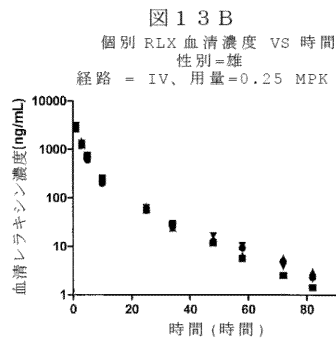
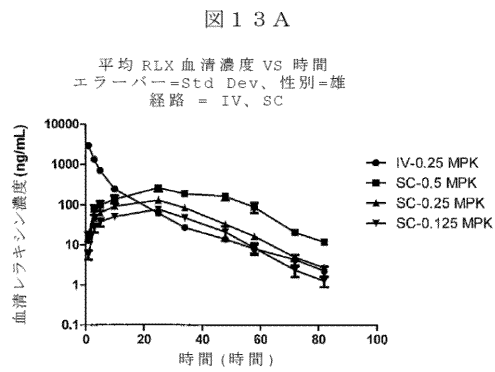
【図 11】



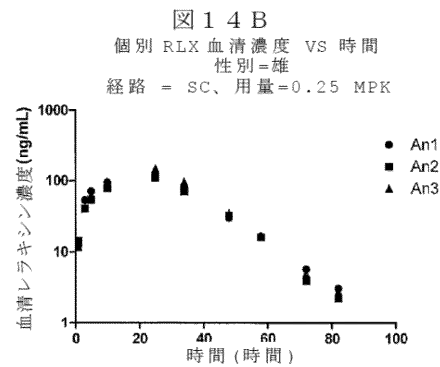
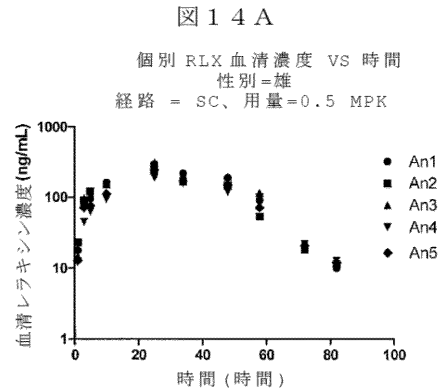
【図 12】



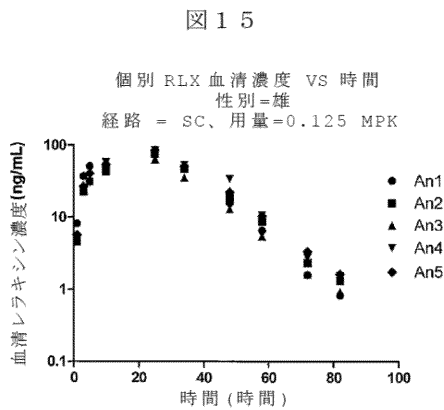
【図 1 3】



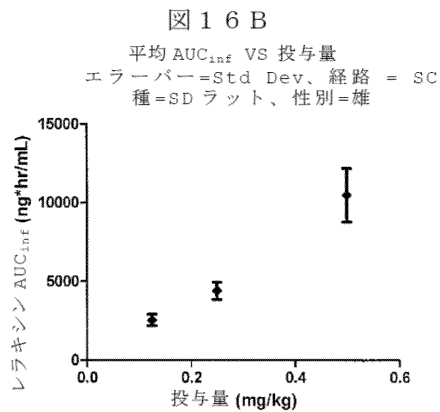
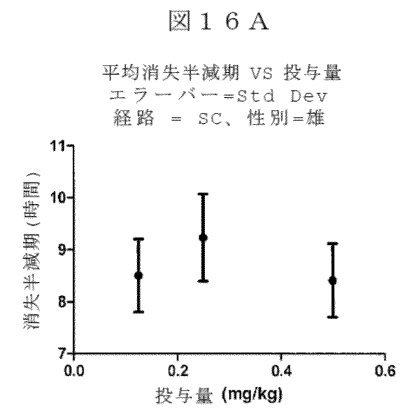
【図 1 4】



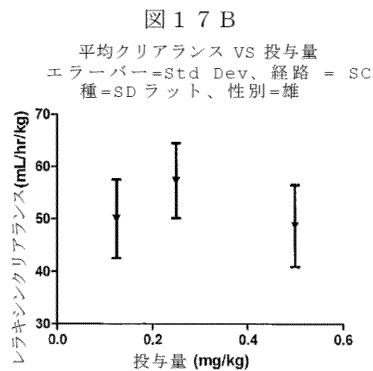
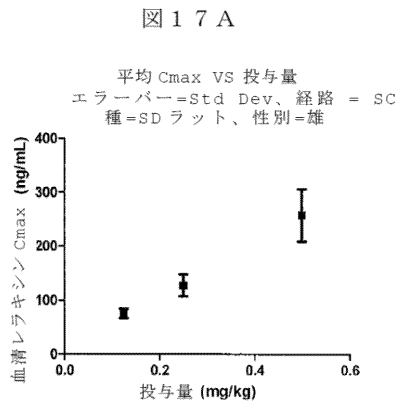
【図 1 5】



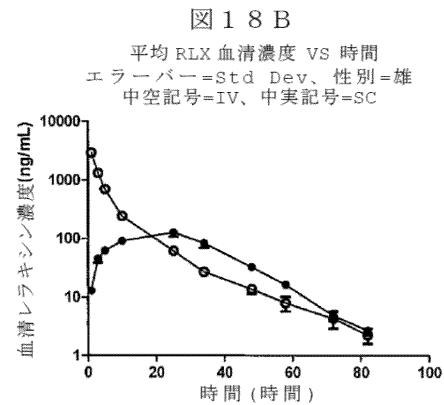
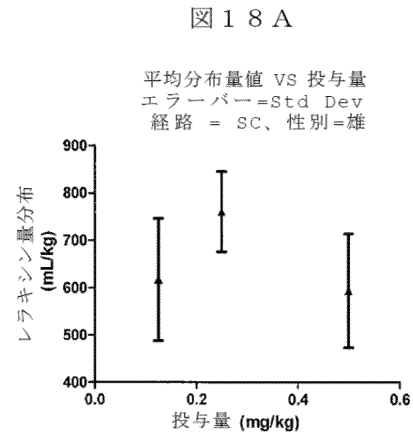
【図 1 6】



【図 17】



【図 18】



【図 19-1】

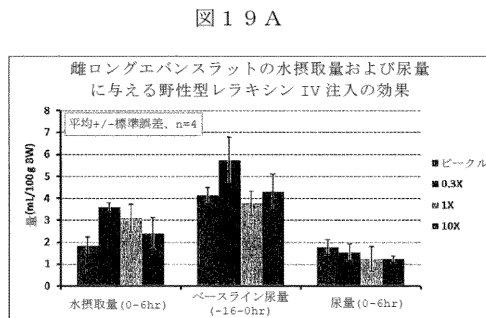
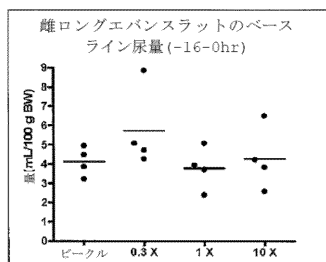


図 19 B



【図 19-2】

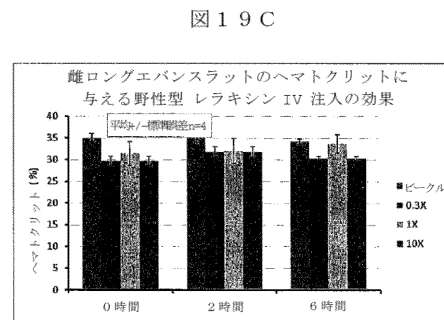
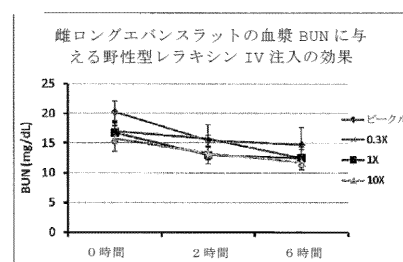


図 19 D



【図 19-3】

図 19 E

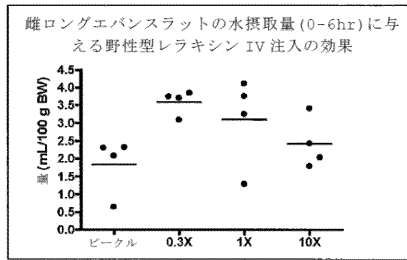
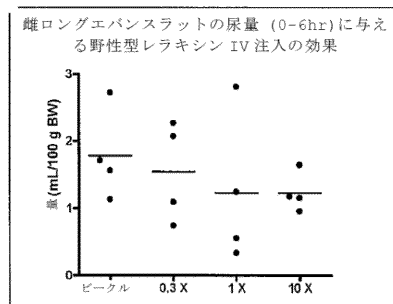


図 19 F



【図 20-1】

図 20 A

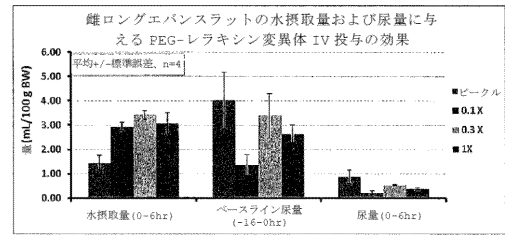
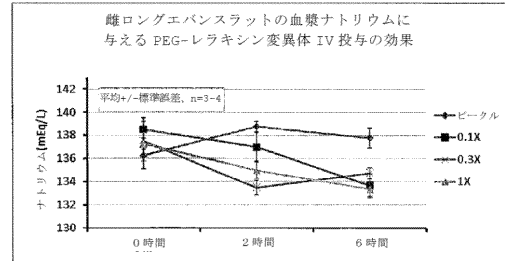


図 20 B



【図 20-2】

図 20 C

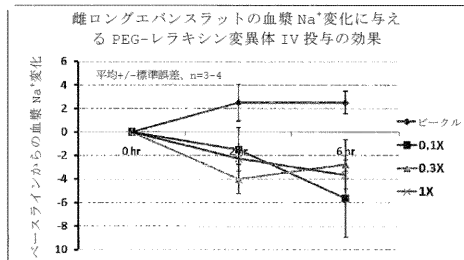
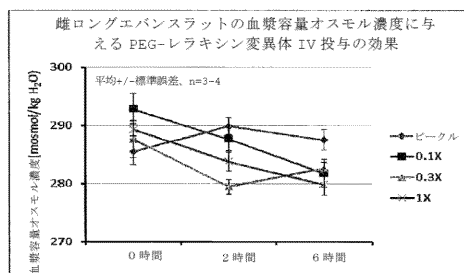


図 20 D



【図 20-3】

図 20 E

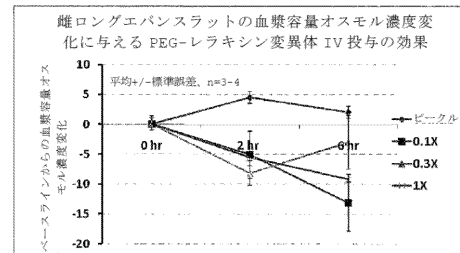
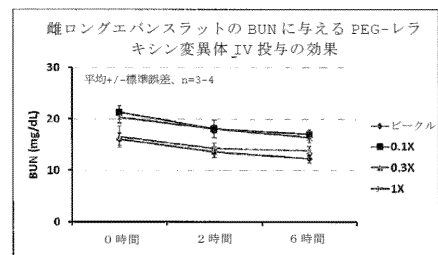


図 20 F



【図 20-4】

図 20 G

雌ロングエバンスラットの вод摂取量 (0-6hr) に与える PEG-
レラキシシン変異体 IV 投与の効果

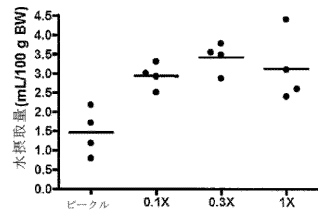


図 20 H

雌ロングエバンスラットのベースライン
尿量 (0-6hr)

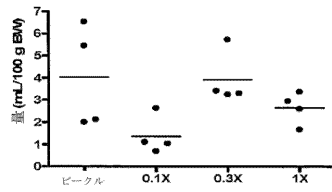
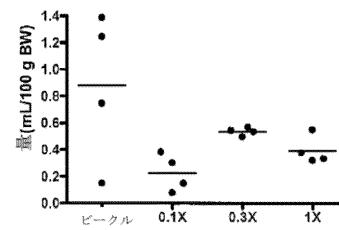


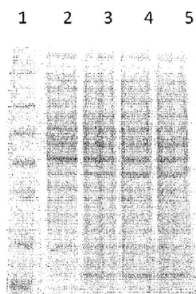
図 20 I

雌ロングエバンスラットの尿量 (0-6hr) に与える
PEG-レラキシシン変異体 IV 投与の効果



【図 5】

図 5



レーン	試料
1	SeeBlue2 MW マーカー
2	RLX-EX-002-129: 0h
3	RLX-EX-002-129: 2h
4	RLX-EX-002-129: 4h
5	RLX-EX-002-129: 6h

← プロ - レラキシシン -BA1-AV13pAF

【配列表】

0006054294000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	15/12	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	15/12	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
			A 6 1 P	43/00	1 2 3

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 バディム・クレイノフ

アメリカ合衆国9 2 1 3 0カリフォルニア州サンディエゴ、ホワイ・オーク・レイン5 4 5 7番

(72)発明者 ニック・ヌードセン

アメリカ合衆国9 2 1 2 7カリフォルニア州サンディエゴ、マティナル・サークル1 0 7 0 9番

(72)発明者 アーマ・ヒュウェット

アメリカ合衆国9 1 9 1 5カリフォルニア州チュラ・ビスタ、ラ・ビダ・コート1 1 7 0番

(72)発明者 クリスティン・デ・ディオス

アメリカ合衆国9 2 1 2 6カリフォルニア州サンディエゴ、バグウェル・コーブ7 6 9 0番

(72)発明者 ジェイソン・ピンクスタッフ

アメリカ合衆国9 2 0 2 4カリフォルニア州エンシニタス、ワンダリング・ロード2 0 9 5番

(72)発明者 ロレイン・サリバン

アメリカ合衆国9 2 1 1 7カリフォルニア州サンディエゴ、モノンガヒラ・ストリート4 6 1 2番

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 9 / 0 6 7 6 3 6 (WO, A 1)

国際公開第2 0 0 9 / 1 4 0 6 5 9 (WO, A 1)

特表2 0 1 0 - 5 1 2 8 0 0 (JP, A)

STRAUSBERG RL et al., Database GenBank[online], Accession No.AAI26416, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/116497221?sat=15&satkey=6070787>>, 10-MAR-2010 uploaded, 24-JUL-2015 retrieved, Definition: Relaxin 2 [Homo sapiens]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)