



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108285482 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201810035655.0

(22)申请日 2011.08.17

(30)优先权数据

61/374,582 2010.08.17 US

(62)分案原申请数据

201180050176.2 2011.08.17

(71)申请人 阿姆布埃克斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 V.克拉伊诺夫 N.克努森

A.赫维特 K.德蒂奥斯

J.平克斯塔夫 L.苏利文

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 区斌

(51)Int.Cl.

C07K 14/64(2006.01)

C12N 15/16(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

A61K 38/22(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 9/04(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61P 19/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书165页

序列表24页 附图22页

(54)发明名称

经修饰松弛素多肽及其用途

(57)摘要

本发明提供了经修饰松弛素多肽及其用途。

本发明涉及任选地被至少一种非天然编码氨基酸修饰的松弛素多肽。

1. 经修饰松弛素多肽,其含有非天然编码氨基酸,其中:

所述松弛素多肽含有(a)在选自以下的位置被非天然编码氨基酸取代的SEQ ID NO:4的松弛素A链多肽:A链残基1、A链残基5、A链残基13和A链残基18,和(b)SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的松弛素B链多肽;

其中所述非天然编码氨基酸包含对-乙酰-L-苯丙氨酸;和

其中所述经修饰松弛素多肽是有生物活性的。

2. 经修饰松弛素多肽,其含有在残基1被对-乙酰-L-苯丙氨酸取代的SEQ ID NO:4的松弛素A链多肽和SEQ ID NO:6的松弛素B链多肽。

3. 经修饰松弛素多肽,其含有在残基1被对-乙酰-L-苯丙氨酸取代的SEQ ID NO:4的松弛素A链多肽和SEQ ID NO:6的松弛素B链多肽,其中所述对-乙酰-L-苯丙氨酸通过肽键与连接子、聚合物或生物活性分子相连,所述肽键通过羰基部分与氨基基(羟胺)部分反应而生成。

4. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述松弛素A链多肽在A链残基1的位置被所述非天然编码氨基酸取代。

5. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述松弛素B链多肽具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

6. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述对-乙酰-L-苯丙氨酸与连接子、聚合物或生物活性分子相连。

7. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述对-乙酰-L-苯丙氨酸通过肽键与连接子、聚合物或生物活性分子相连。

8. 权利要求7的经修饰松弛素多肽,其中所述肽键通过羰基部分与氨基基(羟胺)部分反应而生成。

9. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述对-乙酰-L-苯丙氨酸与聚合物相连。

10. 权利要求9的经修饰松弛素多肽,其中所述聚合物包含水溶性聚合物。

11. 权利要求10的经修饰松弛素多肽,其中所述聚合物包含聚(乙二醇)。

12. 权利要求11的经修饰松弛素多肽,其中所述聚(乙二醇)具有介于约0.1kDa与约50kDa之间,约1kDa与约40kDa之间,约5kDa与约40kDa之间,或者为约20kDa的平均分子量。

13. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述经修饰松弛素多肽表现出增加的血清半衰期,其中所述血清半衰期任选增加选自至少约2倍、至少约3倍、至少约5倍或至少约10倍的量。

14. 权利要求1的经修饰松弛素多肽,其中所述经修饰松弛素多肽为重组体,在真核宿主细胞中产生,在非真核宿主细胞中产生,或者经体外翻译产生。

15. 权利要求1-14任一项的经修饰松弛素多肽的制药用途。

16. 权利要求1-14任一项的经修饰松弛素多肽的制药用途,所述药物用于治疗

动脉粥样硬化,1型糖尿病,2型糖尿病,冠状动脉疾病,硬皮病,中风,家族性高胆固醇血症,单纯收缩期高血压,原发性高血压,继发性高血压,左心室肥大,与长期吸烟有关的动脉硬化,与肥胖有关的动脉硬化,与年龄有关的动脉硬化,系统性红斑狼疮,先兆子痫,高胆固醇血症;或者用于增加围绝经期、绝经期和绝经后有罹患前述病症风险的妇女的动脉顺应性;或用于调节血管收缩、NO生成、或血小板聚集;或者用于治疗血管紧张素-II(AngII)-

介导的血管收缩或内皮素-1 (ET-1)-介导的血管收缩;或者用于治疗心力衰竭,充血性心力衰竭,心肌组织的损失或损害,心室充盈压力增加,和心室壁应力增加,或动脉和静脉血管舒张功能的集成受损。

17. 分离的核酸,其编码在选自以下的位置被对-乙酰-L-苯丙氨酸取代的SEQ ID NO:4的松弛素A链多肽:A链残基1、A链残基5、A链残基13和A链残基18;

其中所述多核苷酸包含至少一个选择密码子,所述选择密码子任选地选自由琥珀密码子、赭石密码子、蛋白石密码子、独特密码子、稀有密码子和四碱基密码子组成的组,其中所述选择密码子编码所述对-乙酰-L-苯丙氨酸。

18. 一种制备根据权利要求1至14任一项所述的经修饰松弛素多肽的方法,所述方法包括:

在允许所述包含对-乙酰-L-苯丙氨酸的经修饰松弛素多肽表达的条件下,培养细胞,所述细胞包含 (1) 一种或多种编码所述松弛素A链多肽和所述松弛素B链多肽、并含有编码所述对-乙酰-L-苯丙氨酸的选择密码子的多核苷酸, (2) 正交RNA合成酶和 (3) 正交tRNA;以及

纯化所述经修饰松弛素多肽。

经修饰松弛素多肽及其用途

[0001] 本申请为申请日为2011年8月17日、申请号为201180050176.2、发明名称为“经修饰松弛素多肽及其用途”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及任选地被至少一种非天然编码氨基酸修饰的松弛素多肽。

[0003] 发明背景

[0004] 成熟人松弛素是一种大约6000道尔顿的激素肽,已知其负责重塑分娩前的产道,因而促进产程。这种蛋白质似乎调节靶器官中的结缔组织的重建以在怀孕和分娩期间获得所需的器官结构的变化。参见,Hisaw,F.L.,Proc. Soc.Exp.Biol.Med.,23:661-663 (1926);Schwabe,C.等,Biochem.Biophys. Res.Comm.,75:503-570 (1977);James,R.等,Nature,267:544-546 (1977)。Sherwood,D.在The Physiology of Reproduction,Chapter 16,“Relaxin”,Knobil, E.和Neill,J.等(编),(Raven Press Ltd.,New York),第585-673页(1988)中简要地论述了松弛素。松弛素的循环水平在整个9个月的孕期升高并在分娩后迅速下降。

[0005] 虽然松弛素主要是孕期激素,但它已在未怀孕女性和男性中被检测到。Bryant-Greenwood,G.D.,Endocrine Reviews,3:62-90 (1982)和Weiss,G.,Ann. Rev.Physiol.,46:43-52 (1984),并且最近被发现可用于治疗心力衰竭。

[0006] 心力衰竭被定义为心脏泵不能根据需要提供血液来供给身体组织的代谢需求。泵送能力的下降最经常由心肌组织的损失或损害引起。结果,心室排空受到抑制,这导致心室充盈压力和心室壁应力增加,并导致心输出量减少。作为对心输出量减少的生理反应,许多神经内分泌反射被激活,这导致全身血管收缩、心脏交感神经刺激和体液潴留。虽然这些反射反应往往最初提高心输出量,但是从长期来看它们是有害的。由此产生的外周阻力的增大会增加对心脏的后负荷,并且血容量的增大进一步增加心室充盈压力。这些变化与心脏的交感神经刺激的增强一起导致对剩余功能心肌的进一步的经常失代偿性的需求。

[0007] 充血性心力衰竭是许多心血管病症的共同终点,并在心脏无法充分灌注外周组织时产生。根据最新估计,在美国有大约400万人被诊断为患有这种疾病,并且这些病例的50%以上在诊断的5年内是致命的[Taylor,M.D.等,Annual Reports,Med.Chem.22,85-94 (1987)]。

[0008] 当前治疗包括充血性心力衰竭在内的心力衰竭的方法集中于在不对心肌产生不适当的要求的情况下增加心输出量。为了达到这些目的,利尿剂、血管扩张剂和正性肌力药(inotropic agent)的各种组合被用于降低血容量、降低外周阻力,以及增加心脏收缩力。因此,当前的疗法依赖于平衡多种药物的影响来实现各个患者的临床需要,并且受到所使用的药物的不利反应的困扰。

[0009] 例如,利尿剂降低钾和镁的血浆浓度并且增加接受洋地黄的患者的心律失常的发生率。利尿剂可经由容量不足(volume depletion)增强硝酸盐的循环影响,并导致心脏充盈压力、心输出量和全身动脉压力下降。

[0010] α 肾上腺素能拮抗剂可导致全身动脉压力的显著下降,其损害冠脉灌注。

[0011] 血管紧张素转换酶抑制剂对动脉压力可以有类似的影响,并且另外导致血浆中钾的浓度过度增加。

[0012] 导致正性肌力的药物如洋地黄和 β 肾上腺素能拮抗剂有可能引起心律失常。另外,洋地黄具有狭窄的治疗指数,并且儿茶酚胺类似物由于受体下调而都倾向于迅速失去其有效性。

[0013] 因此,需要这样的治疗剂,其导致动脉和静脉血管舒张及心脏收缩力的生理上的综合反应,而没有目前所用的治疗剂的缺点。

[0014] 已从包括猪、鼠类、马、鲨、虎、大鼠、角鲨和在人的各种物种纯化出松弛素,其显示出与胰岛素和胰岛素样生长因子至少在一级结构和二级结构上有同源性,但物种之间的同源性可以是相当低的。在人中,发现松弛素在孕期的黄体(CL)中最丰富。然而,脑中的特定核具有松弛素受体并且其它核含有松弛素的信使RNA。具有携带松弛素受体的细胞的数个核在下丘脑区域中被发现。

[0015] 已鉴定出两种人基因形式,(H1)和(H2)。Hudson,P.等,Nature,301: 628-631 (1983);Hudson,P.等,The EMBO Journal,3:2333-2339 (1984);和美国专利第4,758,516号和第4,871,670号。已发现该基因形式中仅一种(H2)在CL中被转录。是否(H1)形式在另一个组织部位被表达,或者它是否代表假基因,这还不清楚。当测试合成的人松弛素(H2)和某些人松弛素类似物的生物活性时,该测试发现生物活性所必需的松弛素核以及不影响生物活性的针对蛋氨酸的某些氨基酸取代。Johnston等,见Peptides:Structure and Function, Proc.Ninth American Peptide Symposium,Deber,C.M.等(编)(Pierce Chem. Co.1985)。

[0016] 制备松弛素的方法还描述于美国专利第4,835,251号和共同待决的美国专利申请第07/908,766(PCT US90/02085)号和第08/080,354(PCT US94/0699)号中。在心血管治疗和神经退行性疾病治疗中使用松弛素的方法描述于美国专利第5,166,191号和美国专利申请第07/902,637(PCT US92/06927)号中。人松弛素的某些制剂描述于核准的美国专利申请第08/050,745号中。

[0017] 重组人松弛素(H2)当前处于硬皮病患者的I期人临床试验中。硬皮病是涉及组织重新形成(reformation)中的不平衡的疾病,其导致胶原的过量产生,并最终导致皮肤(和受累器官)的肿胀和硬化。目前,递送松弛素的治疗需要重复的长时间输注。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供了任选地被至少一种非天然编码氨基酸修饰的松弛素多肽。本说明书将提供一些实施方案,但是应理解,这些实施方案是为了说明本发明,而不能被解读为限制由权利要求书限定的本发明范围。

[0020] 在本发明的另一方面,具有至少一种非天然编码氨基酸的松弛素多肽与至少一种水溶性聚合物连接。

[0021] 在一方面,本发明涉及通过施用治疗有效量的松弛素来促进需要它的哺乳动物的血管新生的方法。在另一个实施方案中,松弛素以足以维持至少约1ng/ml的血浆浓度的量施用。在进一步实施方案中,松弛素多肽是人松弛素(hR2)。

[0022] 本发明提供了用有效量的包含松弛素受体激动剂的制剂治疗动脉顺应性降低的

个体的方法。在优选的实施方案中,松弛素受体激动剂是重组人松弛素,例如,人H2松弛素。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,本发明提供了增加受试者的动脉顺应性的方法,其中所述方法包括测量所述受试者的总动脉顺应性;相对于健康受试者的总动脉顺应性确定所述受试者的所述总动脉顺应性是否降低;以及向所述受试者施用包含松弛素的药物制剂以增加所述受试者的动脉顺应性。在一个实施方案中,可以使用面积法根据主动脉压力波形的舒张衰减来测量总动脉顺应性。在另一个实施方案中,总动脉顺应性可以计算为每搏输出量与脉冲压力的比率,其中每搏输出量被定义为心输出量与心率的比率。

[0024] 在相关的实施方案中,可以测量受试者的局部动脉顺应性或区域动脉顺应性,所述测量与总动脉顺应性测量一并进行或者作为总动脉顺应性测量的替代,并且如果局部或区域动脉顺应性相对于对处于类似状况的健康个体预期的局部或区域动脉顺应性降低,则可以施用松弛素以增加该个体的动脉顺应性。

[0025] 在进一步的实施方案中,接受松弛素的受试者罹患以下病症中的一种或多种:动脉粥样硬化、1型糖尿病、2型糖尿病、冠状动脉疾病、硬皮病、中风、舒张功能异常、家族性高胆固醇血症、单纯收缩期高血压、原发性高血压、继发性高血压、左心室肥大、与长期吸烟有关的动脉硬化、与肥胖有关的动脉硬化、与年龄有关的动脉硬化、系统性红斑狼疮、先兆子痫,和高胆固醇血症。在相关的实施方案中,本发明提供了增加围绝经期、绝经期和绝经后妇女以及有罹患前述病症之一的风险的个体的动脉顺应性的方法。

[0026] 在本发明的另外的实施方案中,松弛素的施用使动脉顺应性相对于在施用之前测得的动脉顺应性增加了至少10%、15%、20%或更高。在又一个进一步实施方案中,本发明提供了对动脉顺应性降低的个体进行的松弛素的施用,所述施用以预定速率进行以便维持0.5ng/ml至80ng/ml的松弛素血清浓度。在一个实施方案中,松弛素是具有一种非天然编码氨基酸的重组人松弛素。在又一个实施方案中,松弛素是具有一种以上的非天然编码氨基酸的松弛素。在本发明的又一个实施方案中,松弛素具有与水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸。在相关的实施方案中,松弛素可以以可注射制剂形式、作为缓释制剂,或以持续输注形式每日施用。

[0027] 在另一方面,本发明涉及通过施用治疗有效量的松弛素来治疗感染或缺血性伤口。在特别优选的实施方案中,感染或缺血性伤口是这样的感染或缺血性伤口,其中的损伤由循环不良引起的氧气缺乏造成。

[0028] 在本发明的又一个方面,提供了使用本发明松弛素多肽制造用于治疗感染或缺血性伤口的药剂,或制造用于促进血管新生的药剂的用途。在另一个方面,本发明涉及骨退行性关节功能异常的治疗,并且在另一个方面,骨退行性关节功能异常的治疗包括用hR2与一种或多种佐剂一并治疗,所述佐剂包括但不限于葡萄糖胺。在另一个方面,本发明涉及阿尔茨海默氏病(alzheimer's disease)的治疗,并且在另一个方面,阿尔茨海默氏病的治疗包括用hR2与一种或多种佐剂一并治疗,所述佐剂包括但不限于雌激素。在另一个实施方案中,本发明涉及调节哺乳动物的生殖生理的方法,其包括向哺乳动物施用治疗有效量的本文组合物。

[0029] 本发明进一步提供了治疗血管紧张素-II(AngII)-介导的血管收缩的方法。这些方法一般包括施用包含有效逆转、抑制或减轻AngII的血管收缩影响的量的松弛素的制剂。

[0030] 本发明进一步提供了治疗内皮素-1(ET-1)-介导的血管收缩的方法。这些方法一

般包括施用包含有效逆转、抑制或减轻ET-1的血管收缩影响的量的松弛素的制剂。在一些实施方案中,该方法包括通过向个体施用松弛素来增强血管中的细胞中的内皮素B型受体活化。

[0031] 本发明进一步提供了治疗缺血性病状的方法,该方法一般包括施用包含有效刺激或促进血管新生和/或血管舒张,从而治疗缺血性病状的量的松弛素的制剂。该方法可用于治疗多种缺血性病状。在一些实施方案中,提供了治疗由心肌梗塞引起的缺血性病状的方法。在其它实施方案中,提供了治疗与伤口关联的缺血性病状的方法。因而,本发明进一步提供了促进伤口愈合的方法。

[0032] 本发明进一步提供了刺激血管新生和/或血管舒张细胞因子表达的方法,其一般包括施用包含有效舒张血管和/或刺激或促进血管新生细胞因子生成的量的松弛素的制剂。在一些实施方案中,该方法用于刺激碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和/或血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达。此类方法可用于治疗可通过增加患病部位处或附近的血流量来治疗的多种多样的疾病。

[0033] 本发明进一步提供了增加肾血管舒张和超过滤的方法,该方法一般包括施用包含一定量的松弛素的制剂。这些方法可用于治疗多种肾病理。因此,本发明进一步提供了治疗与血管收缩有关的肾病理的方法。

[0034] 本发明进一步提供了降低肺性高血压的方法,该方法一般包括施用包含一定量的松弛素的制剂。

[0035] 在分别转让给Connetics Corporation和BAS Medical, Inc.的专利,美国专利第6,211,147号和第6,780,836号中公开了使用松弛素促进血管新生的方法,这两篇美国专利都以引用的方式并入本文。在转让给Genentech, Inc.的专利,第5,759,807号专利中公开了从松弛素原核生产松弛素的工艺,该专利以引用的方式并入本文。Yue的美国专利6,251,863公开了治疗骨退行性关节功能异常的方法和治疗阿尔茨海默氏病的方法,所述方法通过施用针对所述病状中的每种病状分别进一步包含葡萄糖胺硫酸盐和雌激素的松弛素药剂来实现,并且这篇专利的说明书也以引用的方式完整地并入本文。

[0036] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含一种或多种翻译后修饰。在一些实施方案中,松弛素多肽与连接子、聚合物,或生物活性分子连接。在一些实施方案中,松弛素多肽与双官能聚合物、双官能连接子,或至少一种另外的松弛素多肽连接。

[0037] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。在一些实施方案中,水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸经由连接子与水溶性聚合物连接,或者与水溶性聚合物键合。在一些实施方案中,该聚(乙二醇)分子是双官能聚合物。在一些实施方案中,该双官能聚合物与第二多肽连接。在一些实施方案中,该第二多肽是松弛素多肽。

[0038] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含至少两种与水溶性聚合物连接的氨基酸,所述水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,至少一种氨基酸是非天然编码氨基酸。

[0039] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含至少两种与水溶性聚合物连接的氨基酸,所述水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,至少一种氨基酸是非天然编码氨基酸。

[0040] 在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置的一个或多个位置处掺入到任何松弛素或松弛素原多肽、松弛素类似物、松弛素原、松弛素A链、松弛素B链Ala1Asp松弛素,或松弛素多肽中:A链中的位置1(即,在N-端)之前、位置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(即,在蛋白质的羧基端处),及其任何组合(SEQ ID NO:4)和/或B链中的位置1(即,在N-端)之前、位置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(SEQ ID NO:5或在SEQ ID NO:6中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置的一个或多个位置处掺入到任何松弛素或松弛素原多肽中:A链中的位置1(即,在N-端)之前、位置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(即,在蛋白质的羧基端),以及它们的任何组合(SEQ ID NO:1或在SEQ ID NO:2或3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置的一个或多个位置处掺入到松弛素中:位置1(即在N-端)之前、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89(即,在SEQ ID NO:3的蛋白质的羧基端)。

[0041] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在A链中的氨基酸位置1(SEQ ID NO:4)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在A链中的氨基酸位置5(SEQ ID NO:4)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的氨基酸位置7(SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在A链中的氨基酸位置2(SEQ ID NO:4)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在A链中的氨基酸位置13(SEQ ID NO:4)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的氨基酸位置5(SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在A链中的氨基酸位置18处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的氨基酸位置5处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的氨基酸位置28处掺入。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置1、2、5、13、18(SEQ ID NO:4,或在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或其它已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置1、2、5、13(SEQ ID NO:4或在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或其它已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置1、2、5(SEQ ID NO:4或在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或其它已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置2或5(SEQ ID NO:4或在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或其它已知松弛素序列中的相应氨基酸)。

[0042] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:B链中的氨基酸位置5或7(SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6,或在SEQ ID NO:1、2或3中的相应氨基酸位置)处。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的位置7(SEQ ID

N0:5或SEQ ID N0:6,或在SEQ ID N0:1、2或3中的相应氨基酸位置)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的位置5(SEQ ID N0:5或SEQ ID N0:6,或在SEQ ID N0:1、2或3中的相应氨基酸位置)处掺入。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸在B链中的位置7(SEQ ID N0:5或SEQ ID N0:6,或在SEQ ID N0:1、2或3中的相应氨基酸位置)处掺入。

[0043] 在一个实施方案中,非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置1、5、2、13、18(SEQ ID N0:4或在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置),B链中的氨基酸位置7、5(SEQ ID N0:5或6,或在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个位置处掺入到松弛素多肽中:A链中的氨基酸位置1、5、2、13、18(SEQ ID N0:4,或在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)、B链中的氨基酸位置7、5(SEQ ID N0:5或6,或在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)。

[0044] 在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于以下位置:A链中的位置1(即,在N-端)之前、位置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(即,在蛋白质的羧基端),及其任何组合(SEQ ID N0:4或在已知松弛素序列中的相应氨基酸),和/或B链中的位置1(即,在N-端)之前、位置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(SEQ ID N0:5或6或者在已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于:A链中的位置1、2、5、13、18(SEQ ID N0:1或在已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于:A链中的位置1、2、5(SEQ ID N0:1或在已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于:A链中的位置2、5(SEQ ID N0:1或在已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于:A链中的位置2、5、13、18(SEQ ID N0:1或在已知松弛素序列中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,在这些位置中的一个或多个位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于:B链中的位置5、7(SEQ ID N0:5或6或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)。在一些实施方案中,在B链中的位置5(SEQ ID N0:5或6或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。在一些实施方案中,在B链中的位置7(SEQ ID N0:5或6或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。

[0045] 在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个或多个位置处掺入到任何松弛素或松弛素原多肽中:B链位置5、7(SEQ ID N0:5或6或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)和A链位置1、5、2、13、18(SEQ ID N0:4或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸在以下位置中的一个或多个位置处掺入到任何松弛素或松弛素原多肽中:B链位置5、7(SEQ ID N0:5或6或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置)和A链位置1、5、2、13、18(SEQ ID N0:4或者在SEQ ID N0:1、2、3中的相应氨基酸位置),并且非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。

[0046] 本发明方法可用来促进血管新生、促进血管舒张、促进非降压性血管舒张 (non-hypotensive vasodilation)、治疗高血压,包括但不限于肾性高血压、肺性高血压,和心脏高血压(美国专利第6,723,702号;和第6,780,836号,它们都据此以引用的方式完整地并入本文),公开了松弛素类似物的晶体的形成和用途。

[0047] 制剂

[0048] 在本发明的广泛实践中,还考虑到制剂可含有松弛素、松弛素二聚体、松弛素类似物、酰化松弛素,或酰化松弛素类似物中的两种或更多种的混合物,其中所述混合物的至少一种组分含有非天然编码氨基酸。在本发明的另一个实施方案中,含有松弛素、松弛素类似物、酰化松弛素,或酰化松弛素类似物中的两种或更多种的混合物(其中所述混合物的至少一种组分含有非天然编码氨基酸)的制剂还包括至少一种与至少一种非天然编码氨基酸连接的水溶性聚合物。

[0049] 本发明还包括异质混合物,其中通过本发明中所公开的方法制备松弛素多肽和松弛素类似物,并然后将它们混合以便可向有需要的患者施用制剂,所述制剂含有例如25%的在聚乙二醇化的B链的位置28处含有非天然编码氨基酸的松弛素多肽;25%的在B链的位置10处含有非天然编码氨基酸的松弛素多肽,所述非天然编码氨基酸与水溶性聚合物偶联;和50%的松弛素多肽,其中非天然编码氨基酸存在于松弛素B链的位置31 (SEQ ID NO: 2;或者SEQ ID NO:4、6、8、10或12)处。不同百分比量的松弛素多肽变异体的所有不同混合物都包括在序列中的不同位置处,其中所述松弛素多肽包括具有不同尺寸的PEG的变种(1),或(2) PEG。这旨在作为实例,而决不应视为限制可用本发明获得的制剂,并且对于本领域技术人员将是明显的。在另外的实施方案中,引入到制剂混合物中的松弛素多肽变异体将根据其不同解离时间(dissociation time)来进行选择,以便该制剂可为有需要的患者提供缓释松弛素。

[0050] 本发明制剂可以包括胰高血糖素。

[0051] 包括吸入用制剂在内的本发明其它实施方案

[0052] 在本发明的另外的实施方案中,可以使用本文所公开的技术来生产药动学和药效学性质增强的松弛素类似物,所述松弛素类似物供患者经由施用于肺来使用,导致松弛素的血液水平增高,增高的血液水平在施用后持续至少6小时,并且更通常至少8、10、12、14、18、24小时或更长时间。本发明的另一个实施方案虑及适合于设计成作为吸入剂施用给患者的治疗性制剂的松弛素类似物的有利混合物。

[0053] 在本发明的一些实施方案中,天然松弛素分子中的以下位点可以被非天然编码氨基酸取代,并且任选地进一步通过共价连接水溶性聚合物如PEG 来修饰:A与B链的2个C端、Arg22B、His10B、His5A、Glu4A、Glu17A、Glu13B,和Glu21B。

[0054] 除了天然松弛素外,本发明还提供了具有取代或插入到信号序列中的一种或多种非天然编码氨基酸的非天然松弛素多肽和松弛素类似物,所述非天然编码氨基酸还可提供用于掺入一种或多种水溶性聚合物如PEG的位点。本发明的这个实施方案尤其可用于在松弛素分子中引入另外的定制聚乙二醇化位点,例如以便形成对酶促降解的抗性增强的PEG-松弛素。此种方法在具有活性、稳定性、溶解性和药理学性质之间的所需平衡的最佳松弛素缀合物的设计方面提供了较大灵活性。可在松弛素分子中的许多位置处进行突变,即通过位点特异性诱变进行。用于本发明的PEG可具有多种结构:线性、叉状、支化、哑铃状等等。通

常,用适合于偶联松弛素分子上的所需一个或多个位点的合适活化基团使PEG活化。活化PEG将在末端具有用于与松弛素反应的反应性基团。代表性活化PEG衍生物和使这些试剂与诸如松弛素的药物缀合的方法是本领域已知的,并且进一步描述于Zalipsky,S.等,“Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides”, Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992), 及Advanced Drug Reviews, 16:157-182 (1995) 中。

[0055] 在本发明的一个特定实施方案中,缀合物的PEG部分不存在一个或多个有效地显著改变聚合物或聚合物-松弛素缀合物的水溶解性的亲脂性基团。那就是说,该聚合物或本发明缀合物的非松弛素部分可以含有被认为亲脂性高于亲水性的原子的基团(例如具有约2至8-12个碳原子的碳链),然而,如果这样的—个或多个基团的存在不能有效地显著改变聚合物或缀合物的亲水性,那么本发明缀合物中可含有此种部分。也就是说,通过松弛素、松弛素多肽和松弛素类似物的位点特异性突变,本发明的松弛素缀合物自身可展现出亲水性,而不是亲脂性或两亲性。在其中可存在亲脂性部分的本发明某些实施方案中,所述部分优选不被定位在PEG链的末端。

[0056] 用于本发明缀合物的支化PEG包括国际专利公布WO 96/21469中描述的那些PEG,所述专利公布的内容明确地以引用的方式完整地并入本文。一般地,支化PEG可用式R(PEG—OH)_{sub.n}表示,其中R表示中心“核心”分子并且_{sub.n}表示臂的数目。支化PEG具有中心核心,2个或更多个“PEG”臂从所述中心核心伸出。在支化构型中,支化聚合物核心具有用于与松弛素连接的单个反应性位点。用于本发明的支化PEG通常将包含少于4个PEG臂,并且更优选将包含少于3个PEG臂。支化PEG提供的优点是:其具有与其线性PEG对应物相比与更大且更致密的聚合物云状物偶联的单个反应性位点。一种特定类型的支化PEG可表示为(MeO-PEG-)_{sub.p} R—X,其中p等于2或3,R为连接有2或3个PEG臂的中心核心结构如赖氨酸或甘油,并且X表示任何被活化或可被活化用于与松弛素偶联的合适官能团。一种特别优选的支化PEG为具有结构mPEG2-赖氨酸-琥珀酰亚胺的mPEG2-NHS (Shearwater Corporation, Alabama)。

[0057] 在又一种支化结构中,“侧链PEG”具有沿PEG主链被定位而不是被定位在PEG链末端的用于偶联蛋白质的反应性基团。从PEG主链伸出以与松弛素偶联的反应性基团可以相同或不同。侧链PEG结构可能是有用的,但是一般是次优选的,特别是对于吸入用组合物而言。

[0058] 或者,PEG-松弛素缀合物的PEG部分可以具有叉状结构,其具有位于聚合物链的一端支化部分,和两个(或2的任何倍数个)与所述支化部分连接的游离反应性基团以与松弛素连接。示例性叉状PEG描述于国际专利公布第WO 99/45964号中,所述专利公布的内容明确地以引用的方式并入本文。叉状聚乙二醇可任选地包括位于聚合物链的另一端的烷基或“R”基团。更具体来说,根据本发明的叉状PEG-松弛素缀合物具有式:R-PEG-L(Y-松弛素)_n,其中R为烷基,L为水解稳定的支化点,并且Y为提供叉状聚合物与松弛素的化学连接的连接基团,并且n为2的倍数。L可表示单个“核心”基团,如“—CH—”,或者可包含较长的原子链。示例性L基团包括赖氨酸、甘油、季戊四醇,或山梨糖醇。通常,支化部分内的特定支化原子是碳。

[0059] 在本发明的一个特定实施方案中,叉状PEG与松弛素分子的键(Y)是水解稳定的。在优选的实施方案中,n为2。在与松弛素上的反应性位点缀合之前的合适的Y部分包括但不限于活性酯、活性碳酸酯、醛、异氰酸酯、异硫氰酸酯、环氧化物、醇、马来酰亚胺、乙烯砜、酰肼、二硫代吡啶,和碘乙酰胺。合适的活化基团的选择将视松弛素分子上的预期连接位点而定,并且可易于由本领域的技术人员确定。所产生的PEG-松弛素缀合物中的相应Y基团是由活化叉状聚合物与松弛素上的合适反应性位点反应所产生的Y基团。此种最终键(final linkage)的特定特性对于本领域技术人员将是明显的。例如,如果反应性叉状PEG含有活化酯,如琥珀酰亚胺或马来酰亚胺酯,那么经由松弛素上的胺位点缀合将导致形成相应酰胺键。这些特定叉状聚合物特别吸引人,因为它们提供松弛素与PEG的摩尔比为2:1或更大的缀合物。此类缀合物不太可能阻断松弛素受体位点,同时仍提供用于保护松弛素免受例如由松弛素降解酶所致的酶促降解的设计方面的灵活性。

[0060] 在相关的实施方案中,叉状PEG-松弛素缀合物可以用于本发明中,并由式R-[PEG-L(Y-松弛素)₂]_n表示。在这种情况下,R表示连接有至少一种PEG-二-松弛素缀合物的非天然编码氨基酸。具体来说,根据本发明这个方面的优选叉状聚合物是其中n选自1、2、3、4、5和6组成的组的那些聚合物。在替代实施方案中,介于松弛素、松弛素多肽或松弛素类似物中的非天然氨基酸与聚合物分支点之间的化学键是可降解的(即水解不稳定)。或者,一个或多个可降解键可以包含在聚合物骨架中,从而允许在活体内产生PEG链比最初施用的缀合物中的PEG链小的PEG-松弛素缀合物。例如,可以施用大且相对惰性的缀合物(即连接有一个或多个高分子量PEG链,例如一个或多个分子量超过约10,000的PEG链,其中该缀合物基本上不具有生物活性),其随后在肺中或在血流中水解从而产生具有最初存在的PEG链的一部分的生物活性缀合物。在水解可降解键在活体内裂解后,游离松弛素(视可降解键的位置而定)或连接有小聚乙烯标签的松弛素然后被释放并且更容易通过肺被吸收和/或在血液中循环。

[0061] 在本发明这个实施方案的一个特征中,在施用后,完整聚合物-缀合物在水解之前被最低限度地降解,使得可裂解键的水解有效地控制活性松弛素进入血流的缓慢释放速率,这与松弛素在释放到全身循环中之前的酶促降解相反。

[0062] 合适的生理学上可裂解的键包括但不限于酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫酸酯、磷酸酯、酰氧基烷基醚、缩醛,和缩酮。此类缀合物应具有生理学上可裂解的键,其在储存后和施用后是稳定的。例如,PEG-可裂解键-松弛素缀合物在被制造成最终药物组合物后、在溶解于合适的递送媒介物(如果使用)中后,以及在施用(不论什么途径)后应当维持它的完整性。

[0063] 因而,在本发明的另一个实施方案中,将一种或多种非天然编码氨基酸掺入到单链松弛素或单链松弛素类似物中。

[0064] 在一些实施方案中,本发明多肽在信号序列中包含一个或多个非天然编码氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施方案中,本发明多肽在松弛素或本说明书中所公开的任何松弛素类似物或多肽的信号序列中包含一个或多个非天然编码氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施方案中,本发明多肽在信号序列中包含一个或多个天然编码氨基酸取代、添加或缺失,以及在松弛素或本说明书中所公开的任何松弛素类似物或多肽的信号序列中包含一个或多个非天然编码氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施方案中,将一种或多种非天然氨

基酸掺入到松弛素或本说明书中所公开的任何松弛素类似物或多肽的前导序列或信号序列中。

[0065] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含调节松弛素多肽对松弛素多肽受体或结合搭配物的亲和力的取代、添加或缺失,所述松弛素多肽受体或结合搭配物包括但不限于蛋白质、多肽、小分子或核酸。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的稳定性相比,所述取代、添加或缺失增加松弛素多肽的稳定性。稳定性和/或溶解性可以使用本领域普通技术人员已知的许多不同测定法来测量。此类测定法包括但不限于SE-HPLC和RP-HPLC。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的免疫原性相比,所述取代、添加或缺失调节松弛素多肽的免疫原性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的血清半衰期或循环时间相比,所述取代、添加或缺失调节松弛素多肽的血清半衰期或循环时间。

[0066] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的水溶性相比,所述取代、添加或缺失增加松弛素多肽的水溶性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的溶解性相比,所述取代、添加或缺失增大宿主细胞中所产生的松弛素多肽的溶解性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的表达或合成相比,所述取代、添加或缺失增加松弛素多肽在宿主细胞中的表达或增加活体外合成。包含这种经取代松弛素多肽保留了激动剂活性,并且保留或提高了在宿主细胞中的表达水平。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素的蛋白酶抗性相比,所述取代、添加或缺失增大松弛素多肽的蛋白酶抗性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与松弛素受体在与无取代、添加或缺失的相应松弛素多肽相互作用后的信号转导活性相比,所述取代、添加或缺失调节松弛素受体的所述信号转导活性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素多肽与另一种分子如受体的结合相比,所述取代、添加或缺失调节松弛素多肽与所述另一种分子的结合。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素多肽的抗病毒活性相比,所述取代、添加或缺失调节松弛素多肽的抗病毒活性。在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素多肽的葡萄糖代谢活性相比,所述取代、添加或缺失增强松弛素多肽的葡萄糖代谢活性。

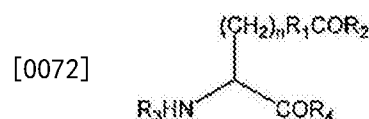
[0067] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含取代、添加或缺失,与无取代、添加或缺失的相应松弛素与药物防腐剂(例如间甲酚、苯酚、苯醇)的相容性相比,所述取代、添加或缺失增大松弛素多肽与所述药物防腐剂的相容性。这种增大的相容性将使得能够制备在储存期间维持蛋白质的生理化学性质和生物活性的防腐药物制剂。

[0068] 在一些实施方案中,用一种或多种非天然氨基酸产生一个或多个工程改造键。分子内键可以用许多方式产生,包括但不限于在合适的条件下蛋白质中的两种氨基酸之间的反应(两种氨基酸之一或二者可为非天然氨基酸);在合适的条件下与两种氨基酸(其中每一种氨基酸均可以为天然编码或非天然编码氨基酸)、与连接子、聚合物或其它分子的反应;等。

[0069] 在一些实施方案中,松弛素多肽中的一个或多个氨基酸取代可以利用一种或多种天然存在的氨基酸或非天然编码氨基酸进行。在一些实施方案中,松弛素多肽中的氨基酸取代可以利用天然存在的氨基酸或非天然编码氨基酸进行,但是至少一个取代是利用非天然编码氨基酸进行。在一些实施方案中,松弛素多肽中的一个或多个氨基酸取代可以利用一种或多种天然存在的氨基酸进行,并且另外,至少一个取代是利用非天然编码氨基酸进行。

[0070] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含羰基、乙酰基、氨氧基、胍基、酰胍基、氨基脒基(semicarbazide)、叠氮基,或炔基。

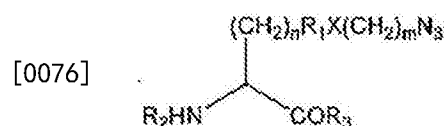
[0071] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含羰基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸具有以下结构:



[0073] 其中n为0-10;R1为烷基、芳基、经取代烷基,或经取代芳基;R2为H、烷基、芳基、经取代烷基,和经取代芳基;并且R3为H、氨基酸、多肽,或氨基端修饰基团,并且R4为H、氨基酸、多肽,或羧基端修饰基团。

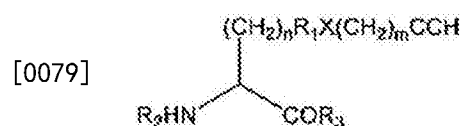
[0074] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含氨氧基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含酰胍基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含胍基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸残基包含氨基脒基。

[0075] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸残基包含叠氮基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸具有以下结构:



[0077] 其中n为0-10;R1为烷基、芳基、经取代烷基、经取代芳基或不存在;X为O、N、S或不存在;m为0-10;R2为H、氨基酸、多肽,或氨基端修饰基团,并且R3为H、氨基酸、多肽,或羧基端修饰基团。

[0078] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含炔基。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸具有以下结构:



[0080] 其中n为0-10;R1为烷基、芳基、经取代烷基,或经取代芳基;X为O、N、S或不存在;m为0-10,R2为H、氨基酸、多肽,或氨基端修饰基团,并且R3为H、氨基酸、多肽,或羧基端修饰基团。

[0081] 在一些实施方案中,所述多肽为松弛素多肽激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂,或逆激动剂。在一些实施方案中,所述松弛素多肽激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂,或逆激动剂包含与水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,松弛素多肽激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂,或逆激动剂包含非天然编码氨基酸和一种或多种翻译后修饰、连

接子、聚合物,或生物活性分子。

[0082] 本发明还提供了分离的核酸,其包含在严格条件下与编码SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12的松弛素多肽的核酸杂合的多核苷酸。本发明还提供了分离的核酸,其包含在严格条件下与编码SEQ ID NO: 1和2的松弛素多肽的核酸杂合的多核苷酸。本发明还提供了分离的核酸,其包含在严格条件下与编码如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12所示的多肽的多核苷酸杂合的一种或多种多核苷酸,其中所述多核苷酸包含至少一个选择密码子。本发明还提供了分离的核酸,其包含在严格条件下与编码如SEQ ID NO:1和2所示的多肽的多核苷酸杂合的一种或多种多核苷酸,其中所述多核苷酸包含至少一个选择密码子。本发明提供了分离的核酸,其包含编码如SEQ ID NO:1和2所示的多肽的多核苷酸。本发明还提供了分离的核酸,其包含编码如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12所示的多肽的多核苷酸。本发明提供了分离的核酸,其包含编码如SEQ ID NO:1和2所示并且具有一种或多种非天然编码氨基酸的多肽的多核苷酸。本发明还提供了分离的核酸,其包含编码如SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12所示并且具有一种或多种非天然编码氨基酸的多肽的多核苷酸。对于本领域普通技术人员显而易见,许多不同的多核苷酸可以编码本发明的任何多肽。

[0083] 在一些实施方案中,所述选择密码子选自由以下组成的组:琥珀密码子、赭石密码子、蛋白石密码子、独特密码子、稀有密码子、五碱基密码子,和四碱基密码子。

[0084] 本发明还提供了制备与水溶性聚合物连接的松弛素多肽的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使包含非天然编码氨基酸的分离的松弛素多肽与包含与所述非天然编码氨基酸反应的部分的水溶性聚合物接触。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸对不能另外与20种常见氨基酸中的任一种反应的水溶性聚合物具有反应性。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸对不能另外与20种常见氨基酸中的任一种反应的连接子、聚合物,或生物活性分子具有反应性。

[0085] 在一些实施方案中,通过使包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽与包含氨氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基的聚(乙二醇)分子反应来制备与水溶性聚合物连接的松弛素多肽。在一些实施方案中,氨氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基通过酰胺键与聚(乙二醇)分子连接。在一些实施方案中,氨氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基通过氨基甲酸酯键与聚(乙二醇)分子连接。

[0086] 在一些实施方案中,通过使包含含羰基的聚(乙二醇)分子与包含含有氨氧基、肼基、酰肼基或氨基脒基的非天然编码氨基酸的多肽反应来制备与水溶性聚合物连接的松弛素多肽。

[0087] 在一些实施方案中,通过使包含含炔烃的氨基酸的松弛素多肽与包含叠氮部分的聚(乙二醇)分子反应来制备与水溶性聚合物连接的松弛素多肽。在一些实施方案中,叠氮基或炔基通过酰胺键与聚(乙二醇)分子连接。

[0088] 在一些实施方案中,通过使包含含叠氮基的氨基酸的松弛素多肽与包含炔部分的聚(乙二醇)分子反应来制备与水溶性聚合物连接的松弛素多肽。在一些实施方案中,叠氮基或炔基通过酰胺键与聚(乙二醇)分子连接。

[0089] 在一些实施方案中,聚(乙二醇)分子的分子量介于约0.1kDa与约100 kDa之间。在一些实施方案中,聚(乙二醇)分子的分子量介于约0.1kDa与 50kDa之间。

[0090] 在一些实施方案中,聚(乙二醇)分子为支化聚合物。在一些实施方案中,聚(乙二醇)支化聚合物的每一分支的分子量介于1kDa与100kDa之间或介于1kDa与50kDa之间。

[0091] 在一些实施方案中,与松弛素多肽连接的水溶性聚合物包含聚亚烷基二醇部分。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸残基包含羰基、氨基、酰肼基、肼、氨基脒基、叠氮基,或炔基。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸残基包含羰基部分,并且水溶性聚合物包含氨基、酰肼、肼,或氨基脒部分。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸残基包含炔部分,并且水溶性聚合物包含叠氮部分。在一些实施方案中,掺入到松弛素多肽中的非天然编码氨基酸残基包含叠氮部分,并且水溶性聚合物包含炔部分。

[0092] 本发明还提供了包含含有非天然编码氨基酸的松弛素多肽和药学上可接受的载体的组合物。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。

[0093] 本发明还提供了包含编码松弛素多肽且含有选择密码子的多核苷酸的细胞。在一些实施方案中,所述细胞包含用于将非天然编码氨基酸取代到松弛素多肽中的正交RNA合成酶和/或正交tRNA。

[0094] 本发明还提供了制备包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在允许松弛素多肽表达的条件下培养包含一种或多种编码松弛素多肽的多核苷酸、正交RNA合成酶和/或正交tRNA的细胞;以及从所述细胞和/或培养基中纯化出松弛素多肽。

[0095] 本发明还提供了增加松弛素多肽的治疗半衰期、血清半衰期或循环时间的方法。本发明还提供了调节松弛素多肽的免疫原性的方法。在一些实施方案中,所述方法包括用非天然编码氨基酸取代天然存在的松弛素多肽中的任一种或多种氨基酸,和/或使所述松弛素多肽与连接子、聚合物、水溶性聚合物或生物活性分子连接。

[0096] 本发明还提供了用有效量的本发明松弛素分子治疗需要所述治疗的患者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含含有非天然编码氨基酸的松弛素多肽和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。在一些实施方案中,松弛素多肽被糖基化。在一些实施方案中,松弛素多肽未被糖基化。

[0097] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:1和2所示的序列或任何其它松弛素多肽序列(这些序列的非限制性实例为SEQ ID NO:3至12)的松弛素多肽,但至少一种氨基酸被非天然编码氨基酸取代。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含羰基、氨基、酰肼基、肼基、氨基脒基、叠氮基,或炔基。

[0098] 本发明还提供了包含药学上可接受的载体和松弛素多肽的药物组合物,所述松弛素多肽包含SEQ ID NO:1至12所示的序列或任何其它松弛素多肽序列,其中至少一种氨基酸被非天然编码氨基酸取代。本发明还提供了包含药学上可接受的载体和松弛素多肽的药物组合物,所述松弛素多肽包含A链和B链(例如SEQ ID NO:1、2和3;SEQ ID NO:4和5或者4和6将产生松弛素等),或任何其它松弛素多肽序列,其中至少一种氨基酸被非天然编码氨基酸取代。本发明还提供了包含药学上可接受的载体和松弛素多肽的药物组合物,所述松弛素多肽包含SEQ ID NO:1、2和/或3所示的序列。本发明还提供了包含药学上可接受的载

体和松弛素多肽的药物组合物,所述松弛素多肽包含SEQ ID NO:1-3所示的序列。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含糖部分。在一些实施方案中,水溶性聚合物经由糖部分与多肽连接。在一些实施方案中,连接子、聚合物或生物活性分子经由糖部分与松弛素多肽连接。

[0099] 本发明还提供了一种松弛素多肽,其包含通过共价键在单个氨基酸处与所述松弛素多肽连接的水溶性聚合物。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些实施方案中,与水溶性聚合物共价连接的氨基酸为多肽中存在的非天然编码氨基酸。

[0100] 本发明提供了一种松弛素多肽,其包含至少一种连接子、聚合物或生物活性分子,其中所述连接子、聚合物或生物活性分子通过经核糖体掺入到多肽中的非天然编码氨基酸的官能团与多肽连接。在一些实施方案中,多肽被单聚乙二醇化。本发明还提供了一种松弛素多肽,其包含与一种或多种非天然编码氨基酸连接的连接子、聚合物,或生物活性分子,其中所述非天然编码氨基酸经核糖体掺入到多肽中的预选位点处。

[0101] 松弛素前导序列或信号序列包括在本发明的范围内,其实例可视为胰岛素原(proinsulin)。所选的异源前导序列或信号序列应为经识别和加工,例如由宿主细胞分泌系统分泌并且可能通过宿主细胞被信号肽酶裂解的序列。一种用本发明的松弛素或松弛素多肽或类似物治疗病状或病症的方法意在暗示用含有或不含有信号肽或前导肽的松弛素治疗。

[0102] 本发明还提供了诱导葡萄糖代谢增加的方法,所述方法包括向所述细胞施用有效诱导葡萄糖代谢活性增加的量的松弛素。

[0103] 在另一个实施方案中,由于用于与非天然氨基酸缀合的独特化学反应,包含一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素多肽与另一种分子(包括但不限于PEG)的缀合提供实质上纯化的松弛素。包含一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素与另一种分子如PEG的缀合可以与在缀合步骤之前或之后进行的其它纯化技术一起进行,以提供实质上纯的松弛素。

[0104] 附图简述

[0105] 图1是松弛素晶体结构模型以及一起示出的选择用于进行取代的一些氨基酸残基位置。

[0106] 图2是松弛素晶体结构模型以及一起示出的选择用于进行取代的一些氨基酸残基位置。

[0107] 图3是松弛素晶体结构模型以及一起示出的选择用于进行取代的一些氨基酸残基位置。

[0108] 图4是人松弛素的A链和B链的结构示意图。

[0109] 图5示出通过这些方法产生的松弛素原的SDS-PAGE凝胶,在所述松弛素原中,链B1氨基酸为Ala,并且A链的第13个氨基酸位置中具有取代缬氨酸的对乙酰基苯丙氨酸。

[0110] 图6(A)示出未聚乙二醇化的松弛素V13pAF的SDS-PAGE凝胶,以及在其旁边的在泳道1中的分子量标记和在泳道3和7中的重组和非重组WT 松弛素(未还原(NR)和还原(R))。图6(B)示出在泳道3和4中的聚乙二醇化松弛素V13pAF(未还原(NR)和还原(R))的SDS-PAGE凝胶以及在其旁边的在泳道1中的分子量标记。

[0111] 图7示出对于不同聚乙二醇化AV13和野生型松弛素多肽的随时间变化的以ng/mL

为单位的SD大鼠血清松弛素浓度的图表。

[0112] 图8 (A) 示出对于实施例40中皮下给药的所有PEG-RLX组的随时间变化的组平均血清浓度的比较的图表。向每只动物施用单一剂量注射液。每组 N=5只动物。符号表示随时间变化的分组血清浓度平均值 $\pm$ SD。

[0113] 图8 (B) 示出皮下给予0.5mg/kg 20KPEG-AQ1-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一皮下剂量。每组N=5只动物。

[0114] 图9 (A) 示出皮下给予0.5mg/kg PEG20-AA5-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一皮下剂量。每组N=5只动物。

[0115] 图9 (B) 示出皮下给予0.5mg/kg PEG20-AR18-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一皮下剂量。每组N=5只动物。

[0116] 图10 (A) 示出静脉内给予0.5mg/kg PEG20-BV7-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=5 只动物。

[0117] 图10 (B) 示出静脉内给予0.5mg/kg PEG20-BW28-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=5 只动物。

[0118] 图11示出静脉内给予0.5mg/kg PEG20-AV13-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=5只动物。

[0119] 图12 (A) 示出对于皮下给予的wt rh松弛素的随时间变化的组平均血清浓度的比较的图表。向每只动物施用单一剂量注射液。每组N=5只动物。

[0120] 图12 (B) 示出静脉内给予0.5mg/kg wt rh松弛素的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=5只动物。

[0121] 图13 (A) 示出皮下或静脉内给药的所有PEG-RLX组的随时间变化的组平均血清浓度的比较。向每只动物施用单一剂量注射液。每组N=3-5只动物。

[0122] 图13 (B) 示出静脉内给予0.25mg/kg 20KPEG-AQ1-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=4 只动物。

[0123] 图14 (A) 示出皮下给予0.5mg/kg PEG20-AQ1-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一皮下剂量。每组N=5只动物。

[0124] 图14 (B) 示出皮下给予0.25mg/kg PEG20-AQ1-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一皮下剂量。每组N=3只动物。

[0125] 图15示出静脉内给予0.125mg/kg PEG20-AQ1-RLX的SD大鼠的个别动物血清浓度时间曲线的图表。向每只动物施用单一静脉剂量。每组N=5 只动物。

[0126] 图16 (A) 示出随剂量变化的平均PEG-松弛素终末半衰期的图表；误差棒=SD。图16 (B) 示出随剂量变化的平均PEG-松弛素AUC_{inf}的图表；误差棒=SD。

[0127] 图17 (A) 示出随剂量变化的平均PEG-松弛素C_{max}的图表；误差棒=SD。

[0128] 图17 (B) 示出随剂量变化的平均PEG-松弛素清除率的图表；误差棒=SD。

[0129] 图18 (A) 示出随剂量变化的平均PEG-松弛素分布体积的图表；误差棒=SD。图18 (B) 示出在单次静脉内或皮下注射0.25mg/kg 20KPEG-AQ1松弛素之后血清-时间浓度的比较的图表。

[0130] 图19, 部分 (A) - (F) 示出来自实施例43的I期的数据。图19 (A) 示出野生型松弛素的IV输注对水摄入量和尿液输出量的影响。图19 (B) 示出从I期的-16小时至0小时每组Long-

Evans大鼠的尿液输出量的基线。图19 (C) 示出野生型松弛素的IV输注对血细胞比容的影响。图19 (D) 示出野生型松弛素的IV输注对雌性Long-Evans大鼠的血浆BUN的影响。图19 (E) 示出从I期的0至6小时每组Long-Evans大鼠的水摄入量。图19 (F) 示出从I期的0至 6小时每组Long-Evans大鼠的尿液输出量。

[0131] 图20, 部分 (A) 至 (I) 示出来自实施例43的II期在施用媒介物(对照组) 和给测试组施用0.1X、0.3X和1X 20K PEG-松弛素变异体之后的数据, 所述PEG-松弛素变异体的A链在位置1中具有pAF取代, 并结合至PEG。图 20 (A) 示出对水摄入量和尿液输出量的影响。图 20 (B) 示出在注射后对每组 Long-Evans大鼠的血浆钠水平的影响。图20 (C) 示出在注射后对每组 Long-Evans大鼠的血浆钠变化水平的影响。图20 (D) 示出PEG-松弛素对血浆渗透压的影响。图20 (E) 示出PEG-松弛素的IV输注对血浆渗透压变化的影响。图20 (F) 示出PEG-松弛素施用对BUN水平的影响。图20 (G) 示出从II 期的0至6小时PEG-松弛素施用对每组Long-Evans大鼠的水摄入量的影响。图20 (H) 示出从II期的-16至0小时每组Long-Evans大鼠的基线尿液输出量。图20 (I) 示出从II期的0至6小时PEG-松弛素施用对每组Long-Evans大鼠的尿液输出量的影响。

[0132] 定义

[0133] 应理解, 本发明不局限于本文描述的特定方法、方案、细胞系、构建体和试剂, 并因此可变化。也应理解, 本文所使用的术语只是为了描述具体实施方案, 而并不是要限制本发明的范围, 本发明的范围将仅由随附权利要求加以限制。

[0134] 除非上下文另外明确指出, 否则如本文和随附权利要求书中所使用的单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数指代。因此, 例如, 对“松弛素”或“松弛素多肽”和各种带连字符和不带连字符的形式的提及是对一种或多种此类蛋白质的提及, 并且包括本领域技术人员已知的其等效物等。

[0135] 除非另外定义, 否则本文所使用的所有科技术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。虽然可将与本文描述的方法、装置和材料类似或等效的任何方法、装置和材料用于本发明的实践或测试中, 但现仅对优选方法、装置和材料加以描述。

[0136] 本文所提及的所有出版物和专利都以引用的方式并入本文, 以达到描述和公开例如所述出版物中描述的可能与当前描述的发明结合使用的构建体和方法的目的。本文所讨论的出版物仅提供本申请的申请日期之前的公开内容。本文的内容决不能被解读为承认发明人无权由于先前发明或任何其它原因而使此公开内容的日期提前。

[0137] 术语“实质上纯化的”是指可实质上或基本上不含通常伴随天然存在环境 (即天然细胞, 或者在重组产生松弛素多肽的情况下为宿主细胞) 中存在的蛋白质或与天然存在环境中存在的蛋白质相互作用的组分的松弛素多肽。可实质上不含细胞物质的松弛素多肽包括具有小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%, 或小于约1% (以干重计) 的污染蛋白的蛋白制备品 (preparation)。当松弛素多肽或其变异体是由宿主细胞重组产生时, 所述蛋白质可以以细胞干重的约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%, 或约1%或更低的量存在。当松弛素多肽或其变异体是由宿主细胞重组产生时, 所述蛋白质可以以细胞干重的约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约

100mg/L、约50mg/L、约10mg/L,或约1mg/L或更低的量存在于培养基中。因此,由本发明方法生产的“实质上纯化的”的松弛素多肽可具有如通过合适的方法如SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、SEC和毛细管电泳所测定的至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%的纯度水平,具体地至少约75%、80%、85%的纯度水平,更具体地至少约90%的纯度水平、至少约95%的纯度水平、至少约99%或更高的纯度水平。

[0138] “重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指不管使用何种方法插入(例如直接摄取、转导、f配对(f-mating)或本领域中已知用于产生重组宿主细胞的其它方法)均包括外源多核苷酸的细胞。外源多核苷酸可保持非整合载体,例如质粒的形式,或者可整合到宿主基因组中。

[0139] 如本文所使用的术语“培养基”包括可支撑或容纳任何宿主细胞的任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性支撑物,所述任何宿主细胞包括细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳动物宿主细胞、CHO细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌(E.coli)或假单胞菌(Pseudomonas)宿主细胞,和细胞内含物。因此,该术语可涵盖宿主细胞已在其中生长的培养基,例如已分泌松弛素多肽的培养基,包括在增殖步骤之前或之后的培养基。诸如在松弛素多肽在细胞内产生并且宿主细胞被裂解或破裂从而释放出松弛素多肽的情况下,该术语也可涵盖含有宿主细胞裂解物的缓冲液或试剂。

[0140] 如本文针对蛋白质再折叠使用的“还原剂”被定义为使巯基保持还原状态并且还还原分子内或分子间二硫键的任何化合物或物质。合适的还原剂包括但不限于二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇、二硫赤藓醇、半胱氨酸、半胱胺(2-氨基乙硫醇)以及还原型谷胱甘肽。对于本领域普通技术人员显而易见,多种还原剂适合用在本发明的方法和组合物中。

[0141] 如本文针对蛋白质再折叠使用的“氧化剂”被定义为能够从被氧化的化合物移除电子的任何化合物或物质。合适的氧化剂包括但不限于氧化型谷胱甘肽、胱氨酸、胱胺、氧化型二硫苏糖醇、氧化型赤藓糖醇和氧气。对于本领域普通技术人员显而易见,多种氧化剂适合用在本发明方法中。

[0142] 如本文所使用的“变性试剂”、“变性剂”被定义为会造成蛋白质可逆展开的任何化合物或物质。变性试剂或变性剂的强度将由具体变性试剂或变性剂的性质和浓度二者决定。合适的变性试剂或变性剂可以为离液剂 chaotrope)、清洁剂、有机溶剂、水混溶溶剂、磷脂,或两种或更多种此类试剂的组合。合适的离液剂包括但不限于尿素、胍和硫氰酸钠。可用的清洁剂可以包括但不限于强清洁剂如十二烷基硫酸钠或聚氧乙烯醚(例如吐温或曲拉通(Triton) 清洁剂)、月桂酰基肌氨酸钠(Sarkosyl);温和非离子型清洁剂(例如毛地黄皂苷(digitonin));温和阳离子型清洁剂,如N-2,3-(二油烯基氧基)-丙基-N,N,N-三甲基铵;温和离子型清洁剂(例如胆酸钠或脱氧胆酸钠);或两性离子型清洁剂,包括但不限于磺基甜菜碱(两性洗涤剂)、3-(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基-1-丙烷硫酸盐(CHAPS),以及3-(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPSO)。可以使用有机水混溶溶剂如乙腈、低级烷醇(尤其C2-C4烷醇,如乙醇或异丙醇),或低级烷二醇(尤其C2-C4 烷二醇,如乙二醇)等作为变性剂。可用于本发明中的磷脂可以为天然存在的磷脂如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇;或合成的磷脂衍生物或变异体如二己酰基磷脂酰胆碱或二庚酰基磷脂酰胆碱。

[0143] 如本文所使用的“再折叠”描述将含有二硫键的多肽从不折叠的状态或展开状态转化为关于二硫键的天然构象或适当折叠的构象的任何过程、反应或方法。

[0144] 如本文所使用的“共折叠”具体地指使用至少两种彼此相互作用的多肽并使得展开或不折叠的多肽转化为天然、适当折叠的多肽的再折叠过程、反应或方法。

[0145] 如本文所使用的术语“胰岛素原”是式:B-C-A的适当交联的蛋白质 (cross-line protein)

[0146] 其中:

[0147] A为松弛素的A链或其官能衍生物;

[0148] B为松弛素的B链或其官能衍生物,其具有 ϵ -氨基;并且

[0149] C为胰岛素原的连接肽。优选地,胰岛素原为人松弛素的A链、人松弛素的B链,并且C为天然连接肽。当胰岛素原是天然序列时,胰岛素原具有三个游离氨基:苯丙氨酸(1) (α -氨基)、赖氨酸(29) (ϵ -氨基)和赖氨酸(64) (ϵ -氨基)。

[0150] 如本文所使用的术语“松弛素类似物”是展现松弛素活性的下式的适当交联的蛋白质:

[0151] A-B

[0152] 其中:

[0153] A为松弛素的A链或松弛素A链的官能衍生物;并且

[0154] B为松弛素的B链或松弛素B链的官能衍生物,其具有 ϵ -氨基,并且A或B中的至少一者含有来自天然序列的氨基酸修饰。

[0155] 在本说明书中,无论术语松弛素是以复数意义还是一般意义使用,都旨在涵盖天然存在的胰岛素和松弛素类似物及其衍生物。如本文所使用的“松弛素多肽”意指具有与人松弛素的分子结构类似的分子结构并且具有松弛素活性的化合物,所述人松弛素的分子结构包括介于Cys.sup.A7与Cys.sup.B7之间和介于Cys.sup.A20与Cys.sup.B19之间的二硫桥键以及介于Cys.sup.A6与Cys.sup.A11之间的内部二硫桥键。

[0156] 如本文所使用的术语“松弛素”是指人松弛素,其氨基酸序列和空间结构是众所周知的。人松弛素由经由二硫键交联的21个氨基酸的A链和30个氨基酸的B链构成。适当交联的松弛素含有三个二硫桥键:一个位于A链的位置7与B链的位置7之间,第二个位于A链的位置20与B链的位置19之间,并且第三个位于A链的位置6与11之间[Nicol,D.S.H.W.and Smith, L.F.,Nature,187,483-485 (1960)]。

[0157] 松弛素肽包括但不限于人松弛素、猪松弛素、人IGF-I、松弛素样生长因子II (69-84)、人松弛素原样生长因子II (68-102)、人松弛素原样生长因子 II (105-128)、人[AspB28]-松弛素、人[LysB28]-松弛素、人[LeuB28]-松弛素、人[ValB28]-松弛素、人[AlaB28]-松弛素、人[AspB28,ProB29]-松弛素、人[LysB28,ProB29]-松弛素、人[LeuB28,ProB29]-松弛素、人[ValB28,ProB29]-松弛素、人[AlaB28,ProB29]-松弛素、人[GlyA21]-松弛素、人[GlyA21 GlnB3]-松弛素、人[AlaA21]-松弛素、人[AlaA21 Gln.sup.B3]松弛素、人[GlnB3]-松弛素、人[GlnB30]-松弛素、人[GlyA21 GluB30]-松弛素、人[GlyA21 GlnB3 GluB30]-松弛素、人[GlnB3 GluB30]-松弛素、人B22-B30松弛素、人B23-B30 松弛素、人B25-B30松弛素、人B26-B30松弛素、人B27-B30松弛素、人 B29-B30松弛素、人松弛素的A链和人松弛素的B链。

[0158] 术语“松弛素类似物”意指这样的蛋白质,其A链和B链的氨基酸序列分别实质上与人松弛素的A链和/或B链的氨基酸序列相同,但与人松弛素的 A链和B链不同的是具有不破坏松弛素类似物的松弛素活性的一个或多个氨基酸缺失、一个或多个氨基酸置换和/或一个或多个氨基酸添加。等电点“高于”松弛素的等电点的松弛素类似物是一种类型的松弛素类似物。另一种类型松弛素类似物是“单体松弛素类似物”。

[0159] “单体松弛素类似物”是快速作用的人松弛素类似物,其包括例如位置 B28处的Pro被Asp、Lys、Leu、Val或Ala取代并且位置B29处的Lys为 Lys或被Pro取代的人松弛素。另一种也称为des (B27) 人松弛素的单体松弛素类似物是B链的位置27处的Thr缺失的人松弛素。单体松弛素类似物公开于以下文献中:Chance, R.E.等,1996年5月7日公布的美国专利第 5,514,646号;Brems, D.N.等Protein Engineering, 5, 527-533 (1992); Brange, J. J.V.等, EP0公布第214,826号(公布于1987年3月18日);以及Brange, J. J.V.等, Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940 (1991)。用于本发明制剂中的单体松弛素类似物在与入松弛素中的位置相同的位置处适当地交联。

[0160] 松弛素肽包括但不限于人松弛素、猪松弛素、人IGF-I、松弛素样生长因子II (69-84)、人松弛素原样生长因子II (68-102)、人松弛素原样生长因子 II (105-128)、人[AspB28]-松弛素、人[LysB28]-松弛素、人[LeuB28]-松弛素、人[ValB28]-松弛素、人[AlaB28]-松弛素、人[AspB28, ProB29]-松弛素、人[LysB28, ProB29]-松弛素、人[LeuB28, ProB29]-松弛素、人[ValB28, ProB29]-松弛素、人[AlaB28, ProB29]-松弛素、人[GlyA21]-松弛素、人[GlyA21 GlnB3]-松弛素、人[AlaA21]-松弛素、人[AlaA21 Gln. sup. B3]松弛素、人[GlnB3]-松弛素、人[GlnB30]-松弛素、人[GlyA21 GluB30]-松弛素、人[GlyA21 GlnB3 GluB30]-松弛素、人[GlnB3 GluB30]-松弛素、人B22-B30松弛素、人 B23-B30松弛素、人B25-B30松弛素、人B26-B30松弛素、人B27-B30松弛素、人B29-B30松弛素、人松弛素的A链和人松弛素的B链。

[0161] 在进一步的方面,本发明提供了编码变异蛋白的重组核酸、含有变异核酸的表达载体、包含变异核酸和/或表达载体的宿主细胞,以及生产变异蛋白的方法。在另外的方面,本发明通过向患者施用治疗有效量的通常与药物载体在一起的变异蛋白来治疗松弛素反应性病症。在进一步的方面,本发明提供了通过改变MHC II类表位来调节松弛素多肽的免疫原性(尤其降低免疫原性)的方法。

[0162] 术语“松弛素多肽”还包括天然存在的松弛素的药学上可接受的盐和前药,以及盐的前药、多晶型物、水合物、溶剂化物、生物活性片段、生物活性变异体和立体异构体,以及天然存在的松弛素和其多肽融合体的激动剂、模拟物和拮抗剂变异体。术语“松弛素多肽”涵盖在氨基端、羧基端或这两个末端包含另外的氨基酸的融合体。示例性融合体包括但不限于例如,蛋氨酸基松弛素,其中蛋氨酸与由缺乏前导肽或信号肽的松弛素的成熟形式或其部分重组表达所产生的松弛素的N端连接(蛋氨酸与由所述重组表达产生的松弛素的N端连接);出于纯化目的而形成的融合体(包括但不限于与聚组氨酸或亲和性表位融合);与血清白蛋白结合肽形成的融合体;以及与血清蛋白如血清白蛋白形成的融合体。美国专利第 5,750,373号描述了一种选择新颖蛋白质如生长激素和对各自受体分子的结合性质已改变的抗体片段变异体的方法,该美国专利以引用的方式并入本文。所述方法包括使编码感兴趣蛋白的基因与丝状噬菌体M13的基因III外壳蛋白的羧基端结构域融合。嵌合分子包含松

弛素和一种或多种其它分子。嵌合分子可含有松弛素与一种（多种）其它分子中的一者或二者的特定区或片段。可通过标准生物化学方法从蛋白质制备任何此类片段，或通过表达编码所述片段的多核苷酸来制备所述片段。松弛素或其片段可以以包含人血清白蛋白（HSA）、Fc或其部分的融合蛋白形式产生。此类融合构建体适合于增强松弛素或其片段在真核宿主细胞中的表达。如美国专利第5,766,883号和公布W0 97/24445中所公开的，示例性HSA部分包括N端多肽（氨基酸1-369、1-419，以及由氨基酸1开始的中间长度），所述美国专利第5,766,883号和公布W0 97/24445以引用的方式并入本文。其它嵌合多肽可包括具有与HSA的C端和N端中的每一个连接的松弛素或其片段的HSA蛋白。此类HSA构建体公开于美国专利第5,876,969号中，该美国专利以引用的方式并入本文。其它融合体可通过使松弛素与a) 免疫球蛋白的Fc部分、b) 免疫球蛋白的Fc部分的类似物和c) 免疫球蛋白的Fc部分的片段融合来产生。

[0163] 多篇参考文献公开了通过聚合物缀合或糖基化进行的多肽修饰。术语“松弛素多肽”包括与诸如PEG的聚合物缀合的多肽，并且可包括一种或多种另外的半胱氨酸、赖氨酸或其它残基衍生化。另外，松弛素多肽可包含连接子或聚合物，其中与连接子或聚合物缀合的氨基酸可以是根据本发明的非天然氨基酸，或者可利用本领域中已知的技术如与赖氨酸或半胱氨酸偶联来使所述氨基酸与天然编码氨基酸缀合。

[0164] 术语“松弛素多肽”也包括糖基化松弛素，例如但不限于，在任何氨基酸位置处糖基化的多肽、多肽的N-连接或O-连接糖基化形式。含有单一核苷酸变化的变异体也被视为松弛素多肽的生物活性变异体。另外，也包括剪接变异体。术语“松弛素多肽”也包括由化学方式连接或以融合蛋白形式被表达的任何一种或多种松弛素多肽或任何其它多肽、蛋白质、碳水化合物、聚合物、小分子、连接子、配体或任何类型的其它生物活性分子的松弛素多肽异源二聚物、同源二聚物、异源多聚物，或同源多聚物，以及含有例如特定缺失或其它修饰但仍保持生物活性的多肽类似物。

[0165] 术语“松弛素多肽”或“松弛素”涵盖包含一个或多个氨基酸取代、添加或缺失的松弛素多肽。本发明松弛素多肽可包含利用一种或多种天然氨基酸的修饰连同—个或多个非天然氨基酸修饰。已描述在天然存在的松弛素多肽中的多个氨基酸位置中的示例性取代，其包括但不限于调节药物稳定性的取代、调节松弛素多肽的一种或多种生物活性（例如但不限于增加激动剂活性、增加多肽溶解性、降低蛋白酶敏感性、将多肽转化成拮抗剂等）的取代，并且术语“松弛素多肽”涵盖所述取代。在一些实施方案中，松弛素拮抗剂包含与松弛素分子的受体结合区中存在的水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸。

[0166] 在一些实施方案中，松弛素多肽进一步包含调节松弛素多肽的生物活性的添加、取代或缺失。在一些实施方案中，松弛素多肽进一步包含调节松弛素多肽的抗病毒活性的添加、取代或缺失。在一些实施方案中，松弛素多肽进一步包含增强松弛素多肽的抗病毒活性的添加、取代或缺失。例如，所述添加、取代或缺失可调节松弛素的一种或多种性质或活性。例如，所述添加、取代或缺失可调节对松弛素受体的亲和性，调节循环半衰期，调节治疗半衰期，调节多肽的稳定性，调节由蛋白酶进行的裂解，调节剂量，调节释放或生物可利用性，促进纯化，或改善或改变具体施用途径。类似地，松弛素多肽可包含蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体结合结构域（包括但不限于 FLAG或poly-His）或其它基于亲和性的序列（包括但不限于FLAG、poly-His、GST等），或改善多肽的检测（包括但不限于GFP）、纯化或其它

性状的连接分子(包括但不限于生物素)。

[0167] 术语“松弛素多肽”也涵盖所连接的同源二聚物、异源二聚物、同源多聚物和异源多聚物,其包括但不限于经由非天然编码氨基酸侧链与相同或不同的非天然编码氨基酸侧链、与天然编码氨基酸侧链直接连接或经由连接子间接连接的那些。示例性连接子包括但不限于小的有机化合物、各种长度的水溶性聚合物如聚(乙二醇)或葡聚糖,或各种长度的多肽。

[0168] “非天然编码氨基酸”是指并非20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸。可与术语“非天然编码氨基酸”同义使用的其它术语为“非天然的氨基酸”“非天然氨基酸”、“非天然存在的氨基酸”,及其各种带连字符和不带连字符的形式。术语“非天然编码氨基酸”还包括但不限于通过修饰(例如翻译后修饰)天然编码氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)而存在,但本身无法被翻译复合物天然地掺入到正在生长的多肽链中的氨基酸。此类非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基葡萄糖胺基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。

[0169] “氨基端修饰基”是指可与多肽的氨基端连接的任何分子。类似地,“羧基端修饰基”是指可与多肽的羧基端连接的任何分子。末端修饰基包括但不限于各种水溶性聚合物、肽或蛋白质如血清白蛋白,或增加肽的血清半衰期的其它部分。

[0170] 术语“官能团”、“活性部分”、“活化基团”、“离去基团”、“反应性位点”、“化学反应性基团”和“化学反应性部分”在本领域和本文中用于指代分子的独特的可限定部分或单元。该术语在化学领域中在一定程度上同义,并且在本文中用于指示执行某些功能或活性并可与其它分子反应的分子部分。

[0171] 术语“键”或“连接子”在本文中用于指通常由于化学反应而形成并且通常为共价键的基团或键。水解稳定的键意指所述键在水中实质上稳定并且在可用的PH值下(包括但不限于在生理条件下)长时间,或许甚至无限期地不与水反应。水解不稳定或可降解的键意指所述键可在水中或在包括例如血液的水溶液中降解。酶促不稳定或可降解的键意指所述键可被一种或多种酶降解。如本领域中应理解的,PEG和相关聚合物在聚合物主链中或在介于聚合物主链与聚合物分子的一个或多个末端官能团之间的连接基团中可包括可降解键。例如,由PEG羧酸或活化PEG羧酸与生物活性剂上的醇基反应所形成的酯键一般在生理条件下水解从而释放所述生物活性剂。其它水解可降解的键包括但不限于碳酸酯键;由胺与醛反应所产生的亚胺键;由醇与磷酸酯基反应所形成的磷酸酯键;作为酰肼与醛的反应产物的腙键;作为醛与醇的反应产物的缩醛键;作为甲酸酯与醇的反应产物的原酸酯键;由包括但不限于在诸如PEG的聚合物的末端的胺基的胺基与肽的羧基形成的肽键;以及由包括但不限于在聚合物末端的亚磷酰胺(phosphoramidite)基的亚磷酰胺基与寡核苷酸的5'羟基形成的寡核苷酸键。

[0172] 术语“生物活性分子”、“生物活性部分”或“生物活性剂”在用于本文中时意指可影响与生物体有关的生物系统、路径、分子或相互作用的任何物理或生物化学性质的任何物质,所述生物体包括但不限于病毒、细菌、噬菌体、转位子、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物和人。具体来说,如本文所使用的生物活性分子包括但不限于旨在用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人或其它动物的疾病或用于以其它方式增强人或动物的身体或精神健康状况的任何物质。生物活性分子的实例包括但不限于:肽,蛋白质,酶,小分子药物,疫苗,免疫原,硬

药(hard drug), 软药(soft drug), 碳水化合物, 无机原子或分子, 染料, 脂质, 核苷, 放射性核素, 寡核苷酸, 类毒素, 毒素, 原核和真核细胞, 病毒, 多糖, 从病毒、细菌、昆虫、动物或任何其它细胞或细胞类型、脂质体、微粒和微胞获得或得到的核酸和其部分。可将松弛素多肽加入到微胞制剂中; 参见美国专利第5,833,948号, 其以引用的方式完整地并入本文。适用于本发明的生物活性剂的种类包括但不限于药物、前药、放射性核素、显像剂、聚合物、抗生素、杀真菌剂、抗病毒剂、消炎剂、抗肿瘤剂、心血管药剂、抗焦虑剂、激素、生长因子、类固醇药剂、微生物衍生的毒素等。

[0173] “双官能聚合物”是指包含两个能够与其它部分(包括但不限于氨基酸侧基) 特异性反应从而形成共价或非共价键的不连续官能团的聚合物。具有一个可与特定生物活性组分上的基团反应的官能团和另一个可与第二生物组分上的基团反应的基团的双官能连接子可用于形成包括第一生物活性组分、双官能连接子和第二生物活性组分的缀合物。已知使各种化合物与肽连接的许多程序和连接分子。例如参见欧洲专利申请第188,256号、美国专利第4,671,958号、第4,659,839号、第4,414,148号、第4,699,784号、第4,680,338 号和第4,569,789号, 这些专利和专利申请以引用的方式并入本文。“多官能聚合物”是指包含两个或更多个能够与其它部分(包括但不限于氨基酸侧基) 特异性反应从而形成共价或非共价键的不连续官能团的聚合物。双官能聚合物或多官能聚合物可具有任何所需长度或分子量, 并且可对双官能聚合物或多官能聚合物加以选择以在与松弛素连接的一种或多种分子和其受体或松弛素之间提供特定的所需间隔或构象。

[0174] 当用从左向右书写的常规化学式表示取代基时, 所述取代基同样涵盖由从右向左书写所述结构得到的化学上相同的取代基, 例如结构CH₂O等同于结构OCH₂。

[0175] 术语“取代基”包括但不限于“无干扰取代基”。“无干扰取代基”为产生稳定化合物的那些基团。合适的无干扰取代基或基团包括但不限于卤代、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₁-C₁₀烷氧基、C₁-C₁₂芳烷基、C₁-C₁₂ 烷芳基、C₃-C₁₂环烷基、C₃-C₁₂环烯基、苯基、经取代苯基、甲苯酰基、二甲苯基、联苯基、C₂-C₁₂烷氧基烷基、C₂-C₁₂烷氧基芳基、C₇-C₁₂芳氧基烷基、C₇-C₁₂氧基芳基、C₁-C₆烷基亚磺酰基、C₁-C₁₀烷基磺酰基、其中m为1至8的--(CH₂)_m--O--(C₁-C₁₀烷基)、芳基、经取代芳基、经取代烷氧基、氟烷基、杂环基、经取代杂环基、硝基烷基、--NO₂、--CN、--NRC(O)--(C₁-C₁₀烷基)、--C(O)--(C₁-C₁₀烷基)、C₂-C₁₀烷基硫代烷基、--C(O)O--(C₁-C₁₀烷基)、--OH、--SO₂、=S、--COOH、--NR₂、羰基、--C(O)(C₁-C₁₀烷基)-CF₃、--C(O)--CF₃、--C(O)NR₂、--(C₁-C₁₀芳基)-S--(C₆-C₁₀芳基)、--C(O)--(C₁-C₁₀芳基)、其中每个m均为1至8的--(CH₂)_m--O--(--(CH₂)_m--O--(C₁-C₁₀烷基)、--C(O)NR₂、--C(S)NR₂、--SO₂NR₂、--NRC(O)NR₂、--NRC(S)NR₂、其盐等。如本文所使用的每个R 均为H、烷基或经取代烷基、芳基或经取代芳基、芳烷基或烷芳基。

[0176] 术语“卤素”包括氟、氯、碘和溴。

[0177] 除非另外说明, 否则术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分时意指直链或支链或环状烃基或它们的组合, 其可为完全饱和、单不饱和或多不饱和的并且可包括具有指定碳原子数目(即C₁-C₁₀意指1至10个碳)的二价基团和多价基团。饱和烃基的实例包括但不限于诸如以下的基团: 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基; 例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等的同系物和异构体。不饱和烷基是具有一个或多个双键或三键的烷基。不饱和烷基的实例包括但不限于乙烯

基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基和3-丙炔基、3-丁炔基以及高级同系物和异构体。除非另外说明,否则术语“烷基”还意在包括下文更详细定义的烷基的衍生物,例如“杂烷基”。只限于烃基的烷基被称作“同系烷基(homoalkyl)”。

[0178] 术语“亚烷基”本身或作为另一取代基的一部分时意指由烷烃衍生的二价基团,例如但不限于结构 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$,并且进一步包括下文描述为“亚杂烷基”的基团。通常,烷基(或亚烷基)将具有1至24个碳原子,其中具有10个或更少碳原子的基团为是本文描述的方法和组合物的特定实施方案。“低级烷基”或“低级亚烷基”是一般具有8个或更少碳原子的较短链烷基或亚烷基。

[0179] 术语“烷氧基”、“烷基氨基”和“烷基硫代”(或硫代烷氧基)是以其常规意义使用,并且是指分别经由氧原子、氨基或硫原子与分子的其余部分连接的那些烷基。

[0180] 除非另外说明,否则术语“杂烷基”本身或与另一术语组合时意指由规定数目的碳原子和至少一个选自由O、N、Si和S组成的组的杂原子组成的稳定直链或支链或环状烷基或其组合,并且其中氮和硫原子可任选地被氧化并且氮杂原子可任选地被季铵化。一个(多个)杂原子O、N和S及Si可位于杂烷基的任何内部位置或位于烷基与分子的其余部分连接的位置。实例包括但不限于 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$,和 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。至多两个杂原子可相邻,例如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。类似地,术语“亚杂烷基”本身或作为另一取代基的一部分时意指由杂烷基衍生的二价基团,例如但不限于 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 。对于亚杂烷基来说,相同或不同的杂原子也可占据链的一端或两端(包括但不限于亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基、氮氧基亚烷基等)。更进一步,对于亚烷基和亚杂烷基连接基团来说,连接基团的化学式书写的方向并不暗示连接基团的取向。例如,式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 表示 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 和 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ 。

[0181] 除非另外说明,否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或其它术语组合时分别表示“烷基”和“杂烷基”的环状形式。因此,环烷基或杂环烷基包括饱和、部分不饱和及完全不饱和的环键。另外,对于杂环烷基来说,杂原子可占据杂环与分子的其余部分连接的位置。环烷基的实例包括但不限于环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基等。杂环烷基的实例包括但不限于1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。另外,该术语涵盖双环和三环结构。类似地,术语“亚杂环烷基”本身或作为另一取代基的一部分时意指由杂环烷基衍生的二价基团,并且术语“亚环烷基”本身或作为另一取代基的一部分时意指由环烷基衍生的二价基团。

[0182] 如本文所使用的术语“水溶性聚合物”是指可溶于水性溶剂中的任何聚合物。水溶性聚合物与松弛素多肽的连接可产生以下改变,包括但不限于相对于未经修饰形式增加或受调节的血清半衰期或者增加或受调节的治疗半衰期、受调节的免疫原性、受调节的物理缔合特性如聚集和多聚物形成、改变的受体结合、改变的与一种或多种结合搭配物的结合,以及改变的受体二聚化或多聚化。水溶性聚合物可能具有或可能不具有其本身的生物活性,并且可用作将松弛素与其它物质连接的连接子,所述其它物质包括但不限于一种或多

种松弛素多肽或一种或多种生物活性分子。合适的聚合物包括但不限于聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其单C1-C10烷氧基或芳氧基衍生物(描述于美国专利第5,252,714号中,所述专利以引用的方式并入本文)、单甲氧基-聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙酰醚马来酸酐、N-(2-羟基丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、包括硫酸葡聚糖在内的葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纤维素和包括但不限于甲基纤维素和羧甲基纤维素的纤维素衍生物、淀粉和淀粉衍生物、多肽、聚亚烷基二醇和其衍生物、聚亚烷基二醇和其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙醚,以及 α - β -聚[(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺等,或它们的混合物。此类水溶性聚合物的实例包括但不限于聚乙二醇和血清白蛋白。

[0183] 如本文所使用的术语“聚亚烷基二醇”或“聚(烷二醇)”是指聚乙二醇(聚(乙二醇))、聚丙二醇、聚丁二醇和其衍生物。术语“聚亚烷基二醇”涵盖线性和支化聚合物并且平均分子量介于0.1kDa与100kDa之间。其它示例性实施方案列于例如商业供应商目录中,例如Shearwater Corporation的目录“Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications”(2001)。

[0184] 除非另外说明,否则术语“芳基”意指可为单环或稠合在一起或共价连接的多环(包括但不限于1至3个环)的多不饱和芳香族烃取代基。术语“杂芳基”是指含有1至4个选自N、O和S的杂原子的芳基(或环),其中氮和硫原子任选地被氧化,并且一个(多个)氮原子任选地被季铵化。杂芳基可通过杂原子与分子的其余部分连接。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡唑基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。上述芳基和杂芳基环系统中的每一个的取代基都选自下文描述的可接受取代基的组。

[0185] 为了简便起见,当与其它术语组合使用时(包括但不限于芳氧基、芳基硫氧基、芳基烷基),术语“芳基”包括如上文所定义的芳基与杂芳基环。因此,术语“芳基烷基”意在包括芳基与烷基连接的那些基团(包括但不限于苄基、苄乙基、吡啶基甲基等),所述烷基包括碳原子(包括但不限于亚甲基)已被例如氧原子置换的那些烷基(包括但不限于苯氧基甲基、2-吡啶基氧基甲基、3-(1-萘基氧基)丙基等)。

[0186] 以上术语(包括但不限于“烷基”、“杂烷基”、“芳基”和“杂芳基”)意在包括所指示基团的经取代和未经取代的形式。下面提供了每个类型基团的示例性取代基。

[0187] 烷基和杂烷基(包括通常被称作亚烷基、烯基、亚杂烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的基团)的取代基可以为选自但不限于以下的多种基团中的一种或多种: $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、-卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $NR'C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR''$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)2R'$ 、 $-S(O)2NR'R''$ 、 $NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 和 $-NO_2$,其数目在0至 $(2m'+1)$ 的范围内,其中 m' 为此类基团中碳原子的总数。 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自独立地指代氢、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的芳基(其包括但

不限于被1-3个卤素取代的芳基)、经取代或未经取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基,或芳基烷基。例如,当本发明化合物包括一个以上R基团时,每个R基团均独立地加以选择,而当存在R'、R''、R'''和R''''基团中的一个以上基团时,这些基团同样是各自独立地加以选择。当R'和R''与同一氮原子连接时,它们可与氮原子组合从而形成5元、6元或7元环。例如,-NR'R''意在包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据对取代基的上述论述,本领域技术人员应理解术语“烷基”意在包括包含与除氢基以外的基团结合的碳原子的基团,如卤代烷基(包括但不限于-CF₃和-CH₂CF₃)和酰基(包括但不限于-C(=O)CH₃、-C(=O)CF₃、-C(=O)CH₂OCH₃等)。

[0188] 与针对烷基描述的取代基类似,芳基和杂芳基的取代基存在改变并且选自但不限于:卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、-C(O)R'、-CO2R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、NR'C(O)NR'R'''、-NR'C(O)2R'、NR-C(NR'R''R''')=NR'''、NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)2R'、-S(O)2NR'R''、NRSO2R'、-CN 和-NO2、-R'、-N3、-CH(Ph)2、氟(C1-C4)烷氧基和氟(C1-C4)烷基,其数目在0至芳环系统上开放价态的总数的范围内;并且其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、烷基、杂烷基、芳基和杂芳基。例如,当本发明化合物包括一个以上R基团时,每个R基团均独立地加以选择,而当存在R'、R''、R'''和R''''基团中的一个以上基团时,这些基团同样各自独立地加以选择。

[0189] 如本文所使用的术语“受调节的血清半衰期”意指经修饰松弛素的循环半衰期相对于其未经修饰形式的正变化或负变化。通过在施用松弛素后的各个时间点取血样并测定每一样品中所述分子的浓度来测量血清半衰期。血清浓度与时间的相关性允许计算血清半衰期。血清半衰期的增加期望地为至少约两倍,但是例如当较小的增加能够促成令人满意的给药方案或避免毒性作用时,较小的增加也可能是有用的。在一些实施方案中,所述增加为至少约3 倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0190] 如本文所使用的术语“受调节的治疗半衰期”意指治疗有效量的松弛素的半衰期相对于其未经修饰的形式的正变化或负变化。通过在施用后的各个时间点测量分子的药动力学和/或药效性质来测量治疗半衰期。增加的治疗半衰期期望能够促成特定有益的给药方案、特定有益的总剂量,或者避免不需要的作用。在一些实施方案中,增加的治疗半衰期是由以下引起:效力增加、经修饰分子与其标靶的结合增加或减少、诸如蛋白酶的酶对所述分子的分解增加或减少,或未经修饰分子的另一参数或作用机制的增加或减少或所述分子的受体介导的清除增加或减少。

[0191] 当应用于核酸或蛋白质时,术语“分离的”表示所述核酸或蛋白质不含其在天然状态下缔合的细胞组分中的至少一些组分,或所述核酸或蛋白质已浓缩到高于其活体内或活体外产生浓度的水平。它可为均质状态。分离的物质可为干燥或半干燥状态,或为包括但不限于水溶液的溶液形式。它可为包含另外的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物的组分。通常使用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱的分析化学技术来测定纯度和均质性。作为制备品中存在的主要物质的蛋白质是实质上纯化的。具体来说,分离的基因是从侧接所述基因并编码除感兴趣基因以外的蛋白质的开放阅读框分离。术语“纯化的”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中实质上产生一个条带。具体来说,其意思可能是核酸或蛋白质为至少85%纯、至少90%纯、至少95%纯、至少99%纯或更高的纯度。

[0192] 术语“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核苷、核糖核苷,或核糖核苷酸以及其聚合物。除非具体限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似

物的核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合性质并且是以类似于天然存在核苷酸的方式代谢。除非另外具体限制,否则所述术语也是指寡核苷酸类似物,其包括PNA(肽核酸)、反义技术中使用的DNA类似物(硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)。除非另外指出,否则特定核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变异体(包括但不限于简并密码子取代)和互补序列以及明确指示的序列。具体来说,可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现简并密码子取代(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0193] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来指代氨基酸残基的聚合物。也就是说,针对多肽的描述同样适用于对肽的描述和对蛋白质的描述,并且反之亦然。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基为非天然编码氨基酸的氨基酸聚合物。如本文所使用,所述术语涵盖包括全长蛋白质在内的任何长度的氨基酸链,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0194] 术语“氨基酸”是指天然存在和非天然存在的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码氨基酸为20种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)以及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α 碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。此类类似物具有经修饰R基团(如正亮氨酸)或经修饰肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。对氨基酸的提及包括例如天然存在的蛋白源性L-氨基酸;D-氨基酸、经化学修饰的氨基酸,如氨基酸变异体和衍生物;天然存在的非蛋白源性氨基酸,如 β -丙氨酸、鸟氨酸等;以及具有本领域中已知为氨基酸特征的性质的化学合成化合物。非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于 α -甲基氨基酸(例如 α -甲基丙氨酸)、D-氨基酸、组氨酸样氨基酸(例如2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸和 α -甲基-组氨酸)、侧链中另外具有亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸),以及侧链中的羧酸官能团被磺酸基置换的氨基酸(例如半胱氨酸)。在本发明蛋白质中掺入包括合成非天然氨基酸、经取代氨基酸或一种或多种D-氨基酸在内的非天然氨基酸宜以许多不同的方式进行。含D-氨基酸的肽等与含L-氨基酸的对应物相比展现增加的活体外或活体内稳定性。因此,当期望或需要较高细胞内稳定性时,构建掺入D-氨基酸的肽等可能尤其有用。更具体来说,D-肽等对内源肽酶和蛋白酶有抗性,从而在期望改进的分子生物可利用性和延长的活体内寿命时,提供此类性质。另外,不能有效处理D-肽等用于T辅助细胞的主要组织相容性复合体II类限制呈递,且因此不太可能在整个生物体中引发体液免疫反应。

[0195] 在本文中,氨基酸可由其普遍为人们所知的三字母符号或由IUPAC-IUB 生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来指代。同样,核苷酸可由其普遍为人们所接受的单字母代码来指代。

[0196] “保守性修饰的变异体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定核酸序列来说,“保守性修饰的变异体”是指编码同一或基本上同一的氨基酸序列的核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时是指基本上同一的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上同一的核酸编码任

何给定蛋白质。举例来说,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸由密码子指定的每一位置处,可以在不改变所编码多肽的情况下将密码子更改为所描述的相应密码子中的任一个。此类核酸变异为“沉默变异(silent variation)”,其为保守性修饰的变异中的一种。本文中编码多肽的每一核酸序列也描述核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员应认识到,核酸中的每个密码子(除AUG和TGG之外,AUG通常为蛋氨酸唯一的密码子,而TGG通常为色氨酸唯一的密码子)都可加以修饰以产生功能上同一的分子。因此,编码多肽的核酸的每种沉默变异都隐含在每个所描述的序列中。

[0197] 关于氨基酸序列,本领域普通技术人员应认识到,改变、添加或缺失所编码序列中的单一氨基酸或少量氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别取代、缺失或添加为“保守性修饰的变异体”,其中所述改变将导致氨基酸缺失、氨基酸添加或氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。本领域普通技术人员已知提供功能上类似的氨基酸的保守性取代表。此类保守性修饰的变异体除了为多态变异体之外(并且不排除多态变异体),还为种间同源物和本发明的等位基因。

[0198] 本领域普通技术人员已知提供功能上类似的氨基酸的保守性取代表。以下八组各自含有互为保守性取代的氨基酸:

[0199] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0200] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0201] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0202] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0203] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0204] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0205] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及

[0206] 8) 半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)

[0207] (参见例如Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W H Freeman&Co.;第2版(1993年12月))。

[0208] 在两种或更多种核酸或多肽序列的上下文中的术语“同一”或“同一性”百分比是指相同的两个或更多个序列或子序列。当通过比较窗比较和比对最大对应性时,或如使用下列序列比较算法(或本领域普通技术人员可用的其它算法)中的一种或通过手工比对和目测检查来测量指定区时,如果序列具有相同(即,在指定区上具有约60%的同一性,约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%,或约95%的同一性)的氨基酸残基或核苷酸百分比,那么所述序列为“实质上同一”的。这个定义也指测试序列的互补序列。同一性可存在于长度为至少约50个氨基酸或核苷酸的区上,或长度为75-100个氨基酸或核苷酸的区上,或者在未具体指定时可存在于多核苷酸或多肽的整个序列上。可通过包括以下步骤的工艺获得包括来自非人类物种的同源物在内的编码本发明多肽的多核苷酸:在严格杂合条件下用具有本发明多核苷酸序列或其片段的经标记探针筛选文库,以及分离全长cDNA和含有所述多核苷酸序列的基因组克隆。技术人员熟知此类杂合技术。

[0209] 对于序列比较来说,通常一个序列充当与测试序列相比较的参考序列。在使用序列比较算法时,将测试序列与参考序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列比较程序参数。可使用默认程序参数,或可指定替代参数。然后,序列比较算法根据程序

参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0210] 如本文所使用的“比较窗”包括参考选自20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150组成的组的连续位置数中的任一个的区段,其中可在将序列与具有相同数目的连续位置的参考序列最佳比对后对这两个序列进行比较。本领域普通技术人员已知用于比较的序列比对方法。可通过包括但不限于以下的方法进行用于比较的最佳序列比对:Smith和Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源算法;Needleman和Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源比对算法;对Pearson和Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444的相似方法的搜索;这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或手工比对和目测检查(参见例如Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 年增刊))。

[0211] 适用于测定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的一个实例为BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等, (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402和Altschul等, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中。用于执行BLAST分析的软件可通过经由万维网在ncbi.nlm.nih.gov上访问的美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。BLAST算法参数W、T和X将决定比对的灵敏性和速度。BLASTN 程序(对于核苷酸序列来说)使用字长(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4 以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列来说, BLASTP程序使用字长3和期望值(E) 10以及BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) 比对数(B) 50、期望值(E) 10、M =5、N=-4以及两条链的比较作为默认值。BLAST算法通常在“低复杂性”过滤器关闭的情况下进行。

[0212] BLAST算法也执行两个序列之间相似性的统计学分析(参见例如Karlin 和Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787)。由BLAST算法提供的相似性的一个量度为最小和概率(smallest sum probability, P(N)),其提供关于两个核苷酸或氨基酸序列之间偶尔会发生匹配的概率的指标。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小和概率小于约0.2、或小于约0.01,或小于约0.001,那么认为所述核酸与参考序列相似。

[0213] 短语“与……选择性(或特异性)杂合”是指当复杂混合物(包括但不限于总细胞或文库DNA或RNA)中存在特定核苷酸序列时,在严格杂合条件下分子仅与所述序列结合、双联或杂合。

[0214] 短语“严格杂合条件”是指在本领域中已知的低离子强度和高温条件下 DNA、RNA、PNA或其它核酸模拟物或其组合的序列的杂合。通常,在严格条件下,探针会与其在核酸的复杂混合物(包括但不限于总细胞或文库 DNA或RNA)中的标靶子序列杂合,但不与复杂混合物中的其它序列杂合。严格条件具有序列依赖性并且在不同环境下会不同。较长序列在较高温度下特异性杂合。对核酸杂合的广泛指导可见于Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993) 中。一般而言,选择在规定离子强度pH值下比特异性序列的热力学熔点(T_m) 低约5-10℃的严格条件。T_m为在平衡时50%的与标靶互补的探针和标靶序列杂合(因

为靶序列过量存在,在 T_m 下,50%的探针在平衡时被占据)的温度(在规定离子强度、PH值以及核酸浓度下)。严格条件可为这样的条件,其中在pH 7.0至8.3下盐浓度小于约1.0M钠离子、通常约 0.01M至1.0M钠离子浓度(或其它盐),并且温度对于短探针(包括但不限于10至50个核苷酸)来说为至少约30℃且对于长探针(包括但不限于大于50个核苷酸)来说为至少约60℃。也可通过添加诸如甲酰胺的去稳定剂来实现严格条件。对于选择性或特异性杂合来说,阳性信号可为至少两倍背景、任选地10倍背景杂合。示例性严格杂合条件可如下:50%甲酰胺、5X SSC 和1%SDS,在42℃下温育;或5XSSC、1%SDS,在65℃下温育,其中在 65℃下用0.2X SSC和0.1%SDS洗涤。此类洗涤可进行5、15、30、60、120分钟或更长时间。

[0215] 如本文所使用的术语“真核生物”是指属于系统发育域(phylogenetic domain)真核生物域(Eucarya)的生物体,例如动物(包括但不限于哺乳动物、昆虫、爬行动物、鸟类等)、纤毛虫、植物(包括但不限于单子叶植物、双子叶植物、藻类等)、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物等。

[0216] 如本文所使用的术语“非真核生物”是指非真核生物体。例如,非真核生物体可属于真细菌(Eubacteria)(包括但不限于大肠杆菌、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等)系统发育域,或古生菌(Archaea)(包括但不限于詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)、嗜热自养甲烷杆菌(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)、嗜盐菌(*Halobacterium*)如沃氏嗜盐富饶菌(*Haloferax volcanii*)和嗜盐菌NRC-1、超嗜热古菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)、极端嗜热古菌(*Pyrococcus horikoshii*)、嗜热泉生古细菌(*Aeuryopyrum pernix*)等系统发育域。

[0217] 如本文所使用的术语“受试者”是指动物,在一些实施方案中为哺乳动物,并且在其它实施方案中为人,其用于治疗、观察或实验对象。动物可为伴侣动物(例如狗、猫等)、家畜(例如牛、羊、猪、马等)或实验动物(例如大鼠、小鼠、天竺鼠等)。

[0218] 如本文所使用的术语“有效量”是指所施用的经修饰非天然氨基酸多肽的量,所述量会在一定程度上缓解所治疗的疾病、病状或病症的一种或多种症状。可施用含有本文描述的经修饰非天然氨基酸多肽的组合物来进行预防性、增强性和/或治疗性治疗。

[0219] 术语“增强”意指增加或延长所需作用的效力或持续时间。因此,对于增强治疗剂的作用来说,术语“增强”是指增加或延长其它治疗剂对系统的作用的效力或持续时间的能力。如本文所使用的“增强有效量”是指足以增强另一种治疗剂在所需系统中的作用的量。当用于患者中时,对于此用途的有效量将视以下因素而定:疾病、病症或病状的严重性和病程、先前疗法、患者的健康状况和对药物的反应以及主治医师的判断。

[0220] 如本文所使用的术语“经修饰”是指对给定多肽作出的任何改变,例如多肽长度、多肽的氨基酸序列、化学结构、共翻译修饰,或翻译后修饰的改变。形式“(经修饰)”术语意指所讨论的多肽任选地经修饰,也就是说,所讨论的多肽可经修饰或未经修饰。

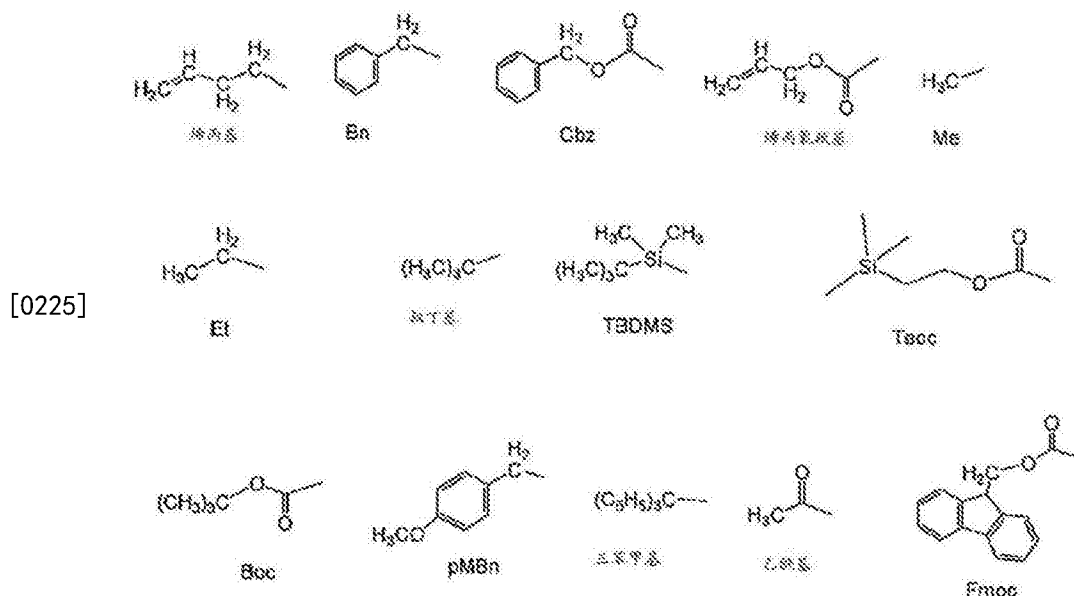
[0221] 术语“翻译后修饰”是指在天然或非天然氨基酸已被掺入到多肽链中之后相对此种氨基酸发生的任何修饰。仅举例来说,所述术语涵盖共翻译活体内修饰、共翻译活体外修饰(例如在不含细胞的翻译系统中)、翻译后活体内修饰以及翻译后活体外修饰。

[0222] 在预防应用中,将含有松弛素多肽的组合物施用给易患特定疾病、病症或病状或

者处于患特定疾病、病症或病状的风险中的患者。此种量被定义为“预防有效量”。在这一用途中,精确量也视患者的健康状况、体重等而定。据认为,通过常规实验(例如剂量递增临床试验)确定此类预防有效量完全在本领域的技能范围内。

[0223] 术语“经保护”是指存在防止化学反应性官能团在特定反应条件下发生反应的“保护基”或部分。保护基将视所保护的化学反应性基团的类型而改变。例如,如果化学反应性基团为胺或酰胺,那么保护基可选自叔丁氧羰基(t-Boc)和9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)的组。如果化学反应性基团为硫醇,那么保护基可为邻吡啶基二硫化物。如果化学反应性基团为羧酸如丁酸或丙酸,或羟基,那么保护基可为苄基或者烷基如甲基、乙基或叔丁基。本领域中已知的其它保护基也可用于本文描述的方法和组合物中或与所述方法和组合物一起使用,所述其它保护基包括诸如Nvoc和MeNvoc的光不稳定基团。本领域中已知的其它保护基也可用于本文描述的方法和组合物中或与所述方法和组合物一起使用。

[0224] 仅举例来说,封端基/保护基可选自:



[0226] 其它保护基描述于Greene和Wuts,Protective Groups,Organic Synthesis, 第3版,John Wiley&Sons,New York,NY,1999中,其是以引用的方式完整地并入本文。

[0227] 在治疗应用中,将足以治愈或至少部分抑制疾病、病症或病状的症状的量的含有经修饰非天然氨基酸多肽的组合物施用给已罹患所述疾病、病状或病症的患者。此种量被定义为“治疗有效量”,并且将视以下因素而定:疾病、病症或病状的严重性和病程、先前疗法、患者的健康状况和对药物的反应以及主治医师的判断。据认为,通过常规实验(例如剂量递增临床试验)确定此类治疗有效量完全在本领域的技能范围内。

[0228] 本发明松弛素多肽可用来调节血管收缩、NO生成、ET-1、Ang II,和血小板聚集。在本发明的一个实施方案中,有需要的患者接受治疗量的本发明松弛素多肽,其将使所述患者的血管收缩在他们寻求治疗时的基线上降低 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、超过100%、150%、超过150%、200%、超过200%。在本发明的另一个实施方案中,提供了治疗有需要的患者以增加所述患者的NO生成的方法,所述方法通过施用治疗有效量的松弛素多肽以使NO生成增加10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%、95%、100%、超过100%、150%、超过150%、200%、超过200%来实现。

[0229] 在本发明的一个实施方案中,提供了用治疗量的本发明松弛素多肽治疗有需要的患者的方法,所述治疗量的本发明松弛素多肽使所述患者的血小板聚集降低10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、超过100%、150%、超过150%、200%、超过200%。在本发明的另一个实施方案中,提供了用治疗量的松弛素多肽治疗有需要的患者以降低肥大的方法。在本发明的另一个实施方案中,提供了用治疗量的本发明松弛素多肽治疗有需要的患者的方法,所述治疗量的本发明松弛素多肽使患者的CF-刺激的蛋白合成降低10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、超过100%、150%、超过150%、200%、超过200%。在本发明的另一个实施方案中,提供了治疗有需要的患者以增加所述患者的ANP表达的方法,所述方法通过施用治疗有效量的松弛素多肽以使NO生成增加10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、超过100%、150%、超过150%、200%、超过200%来实现。

[0230] 凭借本发明方法,本发明peg-松弛素的AUC与野生型松弛素相比增加 10-倍、增加15-倍、增加超过15-倍、增加20-倍、增加超过20-倍、增加25 倍、增加超过25-倍、增加30-倍、增加超过30-倍、增加35-倍、增加超过 35-倍、增加40-倍、增加超过40-倍、增加45-倍、增加超过45-倍、增加50- 倍、增加超过50-倍、增加55-倍、增加超过55-倍、增加60-倍、增加超过60-倍、增加65-倍、增加超过65-倍、增加70-倍、增加超过70-倍、增加75- 倍、增加超过75-倍、增加80-倍、增加超过80-倍、增加85-倍、增加超过 85-倍、增加90-倍、增加超过90-倍、增加95-倍、增加超过95-倍、增加100- 倍、增加超过100-倍。

[0231] 术语“治疗”用于指预防性和/或治疗性治疗。

[0232] 本文中提出的非天然编码氨基酸多肽可包括一个或多个原子被原子质量或质量数与通常存在于自然界中的原子质量或质量数不同的原子置换的经同位素标记的化合物。可掺入到本发明化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素,分别为例如²H、³H、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸O、¹⁷O、³⁵S、¹⁸F、³⁶Cl。本文描述的某些经同位素标记的化合物,例如掺有诸如³H和¹⁴C的放射性同位素的化合物可用于药物和/或底物组织分布测定中。进一步地,用诸如氘,即²H的同位素取代可提供由较高代谢稳定性产生的某些治疗优点,例如增加的活体内半衰期或降低的剂量需求。

[0233] 包括但不限于非对映异构体、对映异构体和其混合物的所有异构体都被视为本文描述的组合物的一部分。在另外或进一步的实施方案中,非天然编码氨基酸多肽在被施用给需要产生代谢物的生物体后代谢,所述代谢物随后用于产生包括所需治疗作用在内的所需作用。在进一步或另外的实施方案中,其为非天然编码氨基酸多肽的活性代谢物。

[0234] 在一些情况下,非天然编码氨基酸多肽可以以互变异构体形式存在。另外,本文描述的非天然编码氨基酸多肽可以以未溶剂化形式以及药学上可接受的溶剂如水、乙醇等形成的溶剂化形式存在。所述溶剂化形式也被视为公开在本文中。本领域普通技术人员应认识到,本文中的一些化合物可以以数种互变异构形式存在。所有此类互变异构形式都被视为本文描述的组合物的一部分。

[0235] 除非另外说明,否则使用本领域的技能范围内的质谱、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术以及药理学的常规方法。

[0236] 详细描述

[0237] I. 引言

[0238] 本发明提供了包含至少一种非天然氨基酸的松弛素多肽。在本发明的某些实施方案中,具有至少一种非天然氨基酸的松弛素多肽包括至少一个翻译后修饰。在一个实施方案中,所述至少一个翻译后修饰包含利用本领域技术人员已知适用于特定反应性基团的化学方法使包含第二反应性基团的分子与至少一种包含第一反应性基团的非天然氨基酸连接,所述包含第二反应性基团的分子包括但不限于:标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和性标记、光亲和性标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖官能团、与其它分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化部分、光化辐射可激发的部分、可光致异构化的部分、生物素、生物素衍生物、生物素类似物、掺有重原子的部分、可化学裂解的基团、可光裂解的基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性部分、经同位素标记的部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测标记、小分子、量子点、纳米传递素、放射性核苷酸、放射性传递素、中子俘获剂或上述物质的任何组合,或任何其它所需化合物或物质。例如,第一反应性基团为炔基部分(包括但不限于在非天然氨基酸对炔丙基氧基苯丙氨酸中,其中炔丙基有时也被称作乙炔部分),并且第二反应性基团为叠氮部分,并利用[3+2] 环加成化学方法。在另一实例中,第一反应性基团为叠氮部分(包括但不限于在非天然氨基酸对叠氮基-L-苯丙氨酸中),并且第二反应性基团为炔基部分。在本发明的经修饰松弛素多肽的某些实施方案中,使用至少一种包含至少一个翻译后修饰的非天然氨基酸(包括但不限于含有酮基官能团的非天然氨基酸),其中所述至少一个翻译后修饰包含糖部分。在某些实施方案中,翻译后修饰是在真核细胞或非真核细胞中活体内进行。连接子、聚合物、水溶性聚合物或其它分子可将所述分子与多肽连接。所述分子可与多肽直接连接。

[0239] 在某些实施方案中,所述蛋白质包括至少一个由一种宿主细胞在活体内进行的翻译后修饰,其中所述翻译后修饰通常无法由另一种宿主细胞类型进行。在某些实施方案中,蛋白质包括至少一个由真核细胞在活体内进行的翻译后修饰,其中所述翻译后修饰通常无法由非真核细胞进行。翻译后修饰的实例包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸盐加成(palmitate addition)、磷酸化、糖脂键修饰等。

[0240] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含一种或多种用于多肽的糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸盐加成、磷酸化或糖脂键修饰的非天然编码氨基酸。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一种或多种用于多肽糖基化的非天然编码氨基酸。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一种或多种用于多肽的糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸盐加成、磷酸化或糖脂键修饰的天然编码氨基酸。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一种或多种用于多肽糖基化的天然编码氨基酸。

[0241] 在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个多个增强多肽的糖基化的缺失。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中不同氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中不同氨基酸处的糖基化的缺失。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中非天然编码氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中天然编码氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中天然编码氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中天然编码氨基酸处的糖基化的天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中天然编码氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。在一些实施方案中,松弛素多肽包含一个或多个增强多肽中非天然编码氨基酸处的糖基化的非天然编码氨基酸添加和/或取代。

[0242] 在一个实施方案中,翻译后修饰包含通过GlcNAc-天冬酰胺键使寡糖与天冬酰胺连接(包括但不限于其中寡糖包含 (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc等)。在另一个实施方案中,翻译后修饰包含通过GalNAc-丝氨酸、GalNAc-苏氨酸、GlcNAc-丝氨酸或GlcNAc-苏氨酸键使寡糖(包括但不限于Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc等)与丝氨酸或苏氨酸连接。在某些实施方案中,本发明的蛋白质或多肽可包含分泌或定位序列、表位标签、FLAG标签、聚组氨酸标签、GST融合体等。分泌信号序列的实例包括但不限于原核生物分泌信号序列、真核生物分泌信号序列、为进行细菌表达而优化5'的真核生物分泌信号序列、新颖分泌信号序列、果胶裂解酶分泌信号序列、Omp A分泌信号序列和噬菌体分泌信号序列。分泌信号序列的实例包括但不限于STII(原核生物)、Fd GIII和M13(噬菌体)、Bg12(酵母)和源自转位子的信号序列b1a。任何此种序列都可加以修饰以使多肽具有所需结果,包括但不限于用不同信号序列取代一个信号序列,用不同前导序列取代一个前导序列等。

[0243] 感兴趣蛋白质或多肽可含有至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或十种或更多种非天然氨基酸。所述非天然氨基酸可相同或不同,例如在蛋白质中可存在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同位点,其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,蛋白质的天然存在形式中所存在的至少一种,但少于全部的特定氨基酸被非天然氨基酸取代。

[0244] 本发明提供了基于包含至少一种非天然编码氨基酸的松弛素的方法和组合物。将至少一种非天然编码氨基酸引入到松弛素中可允许应用涉及特定化学反应的缀合化学,所述特定化学反应包括但不限于与一种或多种非天然编码氨基酸反应而不与通常存在的20种氨基酸反应。在一些实施方案中,包含非天然编码氨基酸的松弛素是通过非天然编码氨基酸的侧链与水溶性聚合物如聚乙二醇(PEG)连接。本发明提供了一种用PEG衍生物选择性修饰蛋白质的高效方法,其涉及响应于选择密码子而将非遗传编码氨基酸选择性地掺入到蛋白质中,并且随后用合适的反应性PEG衍生物修饰这些氨基酸,其中所述非遗传编码氨基酸包括但不限于含有在20种天然掺入氨基酸中未发现的官能团或取代基的氨基酸,所述官能团或取代基包括但不限于酮、叠氮或乙炔部分。一旦掺入氨基酸侧链,就可通过利用本领域普通技术人员已知适用于非天然编码氨基酸中存在的特定官能团或取代基的化学方法来修饰氨基酸侧链。多种已知的化学方法适用于在本发明中将水溶性聚合物掺入到蛋白质

中。此类方法包括但不限于分别与(包括但不限于)乙炔或叠氮化物衍生物进行休斯根[3+2]环加成反应(Huisgen[3+2]Cycloaddition reaction)(例如参见Padwa, A. Comprehensive Organic Synthesis, 第4卷, (1991) Trost, B.M. 编, Pergamon, Oxford, 第1069-1109页; 以及Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Padwa, A. 编, Wiley, New York, 第1-176页)。

[0245] 因为休斯根[3+2]环加成方法涉及环加成而非亲核取代反应, 所以蛋白质可以极高的选择性进行修饰。通过向反应混合物中添加催化量的Cu(I)盐, 可在室温下在水性条件下以优异的区域选择性(1,4>1,5)进行该反应。参见例如Tornøe等, (2002) J. Org. Chem. 67: 3057-3064; 和Rostovtsev等, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599; 以及WO 03/101972。可通过[3+2]环加成而加成到本发明蛋白质上的分子包括具有合适的官能团或取代基(包括但不限于叠氮基或乙炔衍生物)的几乎任何分子。这些分子可分别加成到具有乙炔基的非天然氨基酸(包括但不限于对炔丙基氧基苯丙氨酸)或具有叠氮基的非天然氨基酸(包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸)上。

[0246] 由休斯根[3+2]环加成得到的5元环在还原性环境中通常为不可逆的, 并且在水性环境中长时间对水解稳定。因此, 可在苛刻水性条件下用本发明的活性PEG衍生物修饰多种物质的物理和化学特性。甚至更重要的是, 因为叠氮部分和乙炔部分彼此具有特异性(并且例如不与20种常见的遗传编码氨基酸中的任一种反应), 所以可在一个或多个特异性位点中以极高的选择性修饰蛋白质。

[0247] 本发明还提供了PEG衍生物的水溶性和水解稳定性衍生物以及具有一个或多个乙炔或叠氮部分的相关亲水性聚合物。含有乙炔部分的PEG聚合物衍生物以高选择性与已响应于选择密码子而被选择性地引入到蛋白质中的叠氮部分偶联。类似地, 含有叠氮部分的PEG聚合物衍生物以高选择性与已响应选择密码子而被选择性地引入到蛋白质中的乙炔部分偶联。

[0248] 更具体来说, 叠氮部分包含但不限于烷基叠氮化物、芳基叠氮化物和这些叠氮化物的衍生物。烷基和芳基叠氮化物的衍生物可包括其它取代基, 只要保持乙炔特异性反应性即可。乙炔部分包含烷基和芳基乙炔以及各自的衍生物。烷基和芳基乙炔的衍生物可包括其它取代基, 只要保持叠氮化物特异性反应性即可。

[0249] 本发明提供了具有多种官能团、取代基或部分的物质与其它物质的缀合物, 所述其它物质包括但不限于标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和性标记、光亲和性标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖官能团、与其它分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化部分、光化辐射可激发的部分、可光致异构化的部分、生物素、生物素衍生物、生物素类似物、掺有重原子的部分、可化学裂解的基团、可光裂解的基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性部分、经同位素标记的部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测标记、小分子、量子点、纳米传递素、放射性核苷酸、放射性传递素、中子俘获剂, 或上述物质的任何组合, 或任何其它所需化合物或物质。本发

明还包括具有叠氮或乙炔部分的物质与具有相应乙炔或叠氮部分的PEG聚合物衍生物的缀合物。例如,含有叠氮部分的PEG聚合物可在蛋白质中的含有带有乙炔官能团的非遗传编码氨基酸的位置处与生物活性分子偶联。使PEG与生物活性分子偶联的键包括但不限于休斯根[3+2]环加成产物。

[0250] 本领域中已明确证实,PEG可用于修饰生物材料的表面(参见例如美国专利6,610,281;Mehvar,R.,J.Pharm Pharm Sci.,3(1):125-136(2000),其以引用的方式并入本文)。本发明还包括包含具有一个或多个反应性叠氮基或乙炔位点的表面的生物材料,以及通过休斯根[3+2]环加成键与所述表面偶联的一种或多种本发明的含叠氮基或乙炔的聚合物。生物材料和其它物质也可通过除叠氮基或乙炔键以外的其它键,例如通过包含羧酸、胺、醇或硫醇部分的键与叠氮化物或乙炔活化的聚合物衍生物偶联以留下叠氮或乙炔部分用于后续反应。

[0251] 本发明包括一种合成本发明的含叠氮基聚合物和含乙炔聚合物的方法。在含叠氮基的PEG衍生物的情况下,可使叠氮化物与聚合物的碳原子直接键合。或者,可通过将一端具有叠氮部分的连接剂与常规活化聚合物连接来制备含叠氮基的PEG衍生物,使得所得聚合物在其末端具有叠氮部分。在含乙炔的PEG衍生物的情况下,可使乙炔与聚合物的碳原子直接键合。或者,可通过将一端具有乙炔部分的连接剂与常规活化聚合物连接来制备含乙炔的PEG衍生物,使得所得聚合物在其末端具有乙炔部分。

[0252] 更具体来说,在含叠氮基的PEG衍生物的情况下,具有至少一个活性羟基部分的水溶性聚合物发生反应从而产生具有反应性更强的部分,如甲磺酸根、三氟乙烷磺酸根、甲苯磺酸根或卤素离去基团的经取代聚合物。本领域普通技术人员已知含有磺酰基、卤素原子和其它离去基团的PEG衍生物的制备和使用。所得经取代聚合物随后发生反应从而在聚合物的末端用叠氮部分取代反应性更强的部分。或者,具有至少一个活性亲核或亲电子部分的水溶性聚合物与一端具有叠氮基的连接剂发生反应,使得在PEG聚合物与连接剂之间形成共价键,并且叠氮部分位于聚合物的末端。本领域普通技术人员已知亲核和亲电子部分,其包括胺、硫醇、酰肼、肼、醇、羧酸酯、醛、酮、硫酯等。

[0253] 更具体来说,在含乙炔的PEG衍生物的情况下,具有至少一个活性羟基部分的水溶性聚合物发生反应从而从含有乙炔部分的前体置换卤素或其它活化的离去基团。或者,具有至少一个活性亲核或亲电子部分的水溶性聚合物与一端具有乙炔的连接剂发生反应,使得在PEG聚合物与连接剂之间形成共价键,并且乙炔部分位于聚合物的末端。本领域技术人员充分确定卤素部分、活化的离去基团、亲核和亲电子部分在有机合成情形中的使用以及PEG衍生物的制备和使用。

[0254] 本发明还提供了一种选择性修饰蛋白质以将其它物质添加到经修饰蛋白质上的方法,所述其它物质包括但不限于水溶性聚合物,例如PEG和含有叠氮或乙炔部分的PEG衍生物。含叠氮基和含乙炔的PEG衍生物可用于改变表面和分子的性质,其中生物相容性、稳定性、溶解性和缺乏免疫原性较为重要,并同时提供一种比本领域中先前已知的选择性更强的使PEG衍生物与蛋白质连接的方法。

[0255] 用于与本发明一起使用的一般重组核酸方法

[0256] 在本发明的众多实施方案中,将使用重组方法分离、克隆并通常改变编码感兴趣松弛素多肽的核酸。此类实施方案被用于,包括但不限于用于蛋白质表达或源自松弛素多

肽的变异体、衍生物、表达盒或其它序列的产生期间。在一些实施方案中,编码本发明多肽的序列与异源启动子可操作性地连接。

[0257] 可以以包括但不限于具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的母体多肽的氨基酸序列为基础来合成编码包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽的核苷酸序列,并且然后改变所述核苷酸序列以引入(即掺入或取代)或移除(即缺失或取代)一个(多个)相关氨基酸残基。可方便地根据常规方法通过定点诱变来修饰核苷酸序列。或者,可由化学合成来制备核苷酸序列,包括但不限于通过使用寡核苷酸合成器并且优先选择将产生重组多肽的宿主细胞中所偏好的密码子来制备核苷酸序列,其中寡核苷酸是根据所需多肽的氨基酸序列进行设计。

[0258] 本发明利用重组遗传学领域中的常规技术。揭示本发明中使用的一般方法的基础文章包括Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual(第3版,2001);Kriegler,Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual(1990);以及Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等编,1994)。

[0259] 描述分子生物技术的一般文章包括Berger和Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology,第152卷,Academic Press,Inc., San Diego,CA(Berger);Sambrook等,Molecular Cloning A Laboratory Manual(第2版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York,1989(“Sambrook”)以及Current Protocols in Molecular Biology,F.M. Ausubel等编,Current Protocols,Green Publishing Associates,Inc.与John Wiley&Sons,Inc.的合资企业,(1999年全年增补)(“Ausubel”)。这些文章描述诱变、载体和启动子的使用以及许多其它相关主题,所述相关主题涉及,包括但不限于包含用于制备含有非天然氨基酸、正交tRNA、正交合成酶以及其对的蛋白质的选择密码子的基因或多核苷酸的产生。

[0260] 本发明出于多种目的使用各种类型的诱变,所述多种目的包括但不限于产生新颖合成酶或tRNA、使tRNA分子突变、使编码合成酶的多核苷酸突变、产生tRNA文库、产生合成酶文库、产生选择密码子、在感兴趣蛋白质或多肽中插入编码非天然氨基酸的选择密码子。所述诱变包括但不限于定点诱变、随机点诱变、同源重组、DNA改组或其它递归诱变方法、嵌合构建、使用含有尿嘧啶的模板的诱变、寡核苷酸定向诱变、硫代磷酸酯修饰的DNA诱变、使用带缺口的双螺旋DNA的诱变等、PCT介导的诱变,或它们的任何组合。另外的合适的方法包括点错配修复、使用修复缺陷型宿主菌株的诱变、限制选择和限制纯化、缺失诱变、通过总基因合成进行的诱变、双链断裂修复等。包括但不限于涉及嵌合构建体的诱变也包括在本发明中。在一个实施方案中,可由天然存在分子或已改变或突变的天然存在分子的已知信息来指导诱变,所述已知信息包括但不限于序列、序列比较、物理性质、二级结构、三级结构或四级结构、晶体结构等。

[0261] 本文中可见的文章和实例描述这些程序。另外的信息可见于以下出版物和其中引用的参考文献中:Ling等,Approaches to DNA mutagenesis:an overview,Anal Biochem.254(2):157-178(1997);Dale等, Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method,Methods Mol.Biol.57:369-374(1996);Smith,In vitro mutagenesis, Ann,Rev,Genet.19:423-462(1985);Botstein&Shortle,Strategies and applications of in vitro mutagenesis,Science 229:1193-

1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F, and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel等, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass等, Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor等, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor等, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13:8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14:9679-9698 (1986); Sayers等, 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers等, Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer等, The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12:9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer等, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16:7207 (1988); Fritz等, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer等, Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter等, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13:4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154:382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to

generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14:5115 (1986); Wells等, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans, R. Soc. Lond. A317:415-423 (1986); Nambiar等, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223:1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14:6361-6372 (1988); Wells等, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Grundström等, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13:3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Sieber等, Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); 以及 I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995)。关于许多上述方法的另外的细节可见于 Methods in Enzymology 第154卷, 所述文献也描述对各种诱变方法带来的故障查找问题的有效控制。

[0262] 通常根据由 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letts. 22 (20):1859-1862, (1981) 所描述的固相亚磷酰胺三酯法, 例如使用如 Needham-VanDevanter 等, Nucleic acids Res., 12:6159-6168 (1984) 中描述的自动化合成器以化学方式合成例如用于本发明诱变, 例如用于使合成酶文库突变或改变 tRNA 的寡核苷酸。

[0263] 本发明也涉及用于通过正交 tRNA/RS 对在活体内掺入非天然氨基酸的真核宿主细胞、非真核宿主细胞和生物体。用本发明多核苷酸或包括本发明多核苷酸的构建体以遗传学方式工程改造 (包括但不限于转化、转导或转染) 宿主细胞, 所述构建体包括但不限于本发明载体, 其可为例如克隆载体或表达载体。例如, 正交 tRNA、正交 tRNA 合成酶和待衍生蛋白质的编码区与在所需宿主细胞中起作用的基因表达控制元件可操作性地连接。载体可为例如质粒、粘粒 (cosmid)、噬菌体、细菌、病毒、裸多核苷酸, 或缀合的多核苷酸的形式。通过标准方法将载体引入到细胞和/或微生物中, 所述标准方法包括电穿孔 (Fromm 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985))、通过病毒载体感染、在小珠粒或粒子基质内或在表面上由具有核酸的小粒子高速弹道渗透 (Klein 等, Nature 327, 70-73 (1987)) 等。适合于活体外将核酸转移到细胞中的技术包括使用脂质体、显微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。活体内基因转移技术包括但不限于用病毒 (通常逆转录病毒) 载体转染和病毒外壳蛋白-脂质体介导的转染 [Dzau 等, Trends in Biotechnology 11:205-210 (1993)]。在一些情形下, 可能期望为核酸源提供靶向靶细胞的试剂, 如对细胞表面膜蛋白或靶细胞具有特异性的抗体、靶细胞上的受体的配体等。当使用脂质体时, 可使用结合与胞吞作用关联的细胞表面膜蛋白的蛋白质来靶向和/或促进摄取, 例如衣壳蛋白或其对特定细胞类型具有向性的片段、在循环中经历内化的蛋白质的抗体、靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。

[0264] 可在经改良适于这样的活动,例如筛选步骤、活化启动子或选择转化株的常规培养基中培养工程改造宿主细胞。这些细胞可任选地被培养进入转基因生物体中。包括但不限于关于细胞分离和培养(例如关于后续核酸分离)的参考文献的其它有用的参考文献包括Freshney(1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第3版, Wiley-Liss, New York 以及其中引用的参考文献; Payne等, (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley&Sons, Inc. New York, NY; Gomborg和Phillips (编) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) 以及Atlas 和Parks (编) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL。

[0265] 可使用将靶核酸引入到细胞中的数种熟知方法, 其中任一种方法都可用于本发明中。这些方法包括: 受体细胞与含有DNA的细菌原生质体融合、电穿孔、粒子轰击法(projectile bombardment)以及经病毒载体(在下文中进一步论述)感染等。细菌细胞可用于扩增含有本发明DNA构建体的质粒的数目。使细菌生长到对数生长期并且可通过本领域中已知的多种方法分离细菌内的质粒(参见例如Sambrook)。另外, 可商购获得试剂盒以从细菌中纯化质粒(参见例如来自Pharmacia Biotech的EasyPrep™、FlexiPrep™; 来自Stratagene的StrataClean™; 以及来自Qiagen的QIAprep™)。然后, 进一步操纵分离并纯化的质粒以产生其它质粒, 使用所述质粒来转染细胞或将其掺入到相关载体中用于感染生物体。典型载体含有转录和翻译终止子、转录和翻译起始序列以及可用于调节特定靶核酸的表达的启动子。载体任选地包含通用表达盒, 其含有至少一个独立的终止子序列、允许所述表达盒在真核细胞或原核细胞或两者中复制的序列(包括但不限于穿梭载体)以及用于原核系统与真核系统的选择标记。载体适于在原核细胞、真核细胞或两者中复制和整合。参见Gillam&Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts等, *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E.等, *Protein Expr. Purif.* 6 (1) 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (都同上文)。适用于克隆的细菌和噬菌体的目录由例如 ATCC提供, 例如由ATCC出版的The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992), Gherna等(编)。用于测序、克隆和分子生物学的其它方面的另外的基本程序以及基础理论考虑因素也可见于Watson等, (1992) *Recombinant DNA* 第2版Scientific American Books, NY中。另外, 基本上任何核酸(以及实际上任何经标记核酸, 无论是标准的或非标准的)都可从多种商业来源中的任一种定制或标准订购, 这些商业来源例如Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, 可通过万维网在mcrc.com上获得)、The Great American Gene Company (Ramona, CA, 可通过万维网在genco.com上获得)、ExpressGen Inc. (Chicago, IL, 可通过万维网在expressgen.com上获得)、Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) 以及许多其它来源。

[0266] 选择密码子

[0267] 本发明的选择密码子扩展蛋白质生物合成机制的遗传密码子框架。例如, 选择密码子包括但不限于独特三碱基密码子、无义密码子、非天然密码子、四个或更多个碱基的密码子、稀有密码子等, 其中所述无义密码子例如终止密码子, 包括但不限于琥珀密码子(UAG)、赭石密码子, 或蛋白石密码子(UGA)。对于本领域普通技术人员显而易见, 可引入到所需基因或多核苷酸中的选择密码子的数目范围很广, 其包括但不限于在编码松弛素多肽的至少一部分的单一多核苷酸中存在一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、4个、5

个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个选择密码子。对于本领域普通技术人员还显而易见，可引入到所需基因或多核苷酸中的选择密码子的数目范围很广，其包括但不限于在编码松弛素多肽的至少一部分的A链和 B链多核苷酸序列中存在总计一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个选择密码子。

[0268] 在一个实施方案中，所述方法涉及使用作为终止密码子的选择密码子以在活体内掺入一种或多种非天然氨基酸。例如，产生识别包括但不限于UAG 的终止密码子的O-tRNA，并且通过O-RS利用所需非天然氨基酸使所述 O-tRNA氨酰基化。这种O-tRNA无法被天然存在的宿主的氨酰基-tRNA合成酶识别。可使用常规定点诱变在感兴趣多肽中的感兴趣位点处引入包括但不限于TAG的终止密码子。参见例如Sayers, J.R. 等, (1988), 5'-3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 16:791-802。当O-RS、O-tRNA和编码感兴趣多肽的核酸在活体内组合时，响应于UAG密码子而掺入非天然氨基酸从而得到在具体指定的位置处含有非天然氨基酸的多肽。

[0269] 活体内非天然氨基酸的掺入可在不显著干扰真核宿主细胞的情况下进行。例如，因为对于UAG密码子的抑制效率取决于包括但不限于琥珀抑制因子tRNA的O-tRNA与真核释放因子(包括但不限于eRF) (其与终止密码子结合并启动正在生长的肽从核糖体的释放) 之间的竞争，所以可通过包括但不限于增加O-tRNA和/或抑制因子tRNA的表达水平来调节抑制效率。

[0270] 也可利用稀有密码子来编码非天然氨基酸。例如，当活体外蛋白质合成反应中的精氨酸浓度降低时，稀有精氨酸密码子AGG已被证明能有效地用于通过经丙氨酸酰化的合成tRNA插入Ala。参见例如Ma等, *Biochemistry*, 32:7939 (1993)。在这种情况下，合成tRNA与在大肠杆菌中作为次要物质存在的天然存在的tRNAArg竞争。一些生物体不使用所有三联体密码子。已利用藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 中的未指定密码子AGA在活体外转录/翻译提取物中插入氨基酸。参见例如Kowal和Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997)。可产生本发明的组分以在活体内使用这些稀有密码子。

[0271] 选择密码子还包含延长密码子，其包括但不限于四个或更多个碱基的密码子，例如四个、五个、六个或更多个碱基的密码子。四碱基密码子的实例包括但不限于AGGA、CUAG、UAGA、CCCU等。五碱基密码子的实例包括但不限于AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC等。本发明的特征包括使用基于移码抑制 (frameshift suppression) 的延长密码子。四个或更多个碱基的密码子可将包括但不限于一种或多种非天然氨基酸插入到同一蛋白质中。例如，在存在具有反密码子环，例如具有至少8-10nt 反密码子环的包括但不限于特定移码抑制因子tRNA的突变O-tRNA的情况下，将四个或更多个碱基的密码子读作单一氨基酸。在其它实施方案中，反密码子环可解码，包括但不限于至少一个四碱基密码子、至少一个五碱基密码子，或至少一个六碱基密码子或更多碱基的密码子。因为存在256种可能的四碱基密码子，所以可使用四个或更多个碱基的密码子在同一细胞中编码多种非天然氨基酸。参见Anderson等, (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, *Chemistry and Biology*, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 307:

755-769。

[0272] 例如,使用活体外生物合成方法,已经用四碱基密码子将非天然氨基酸掺入到蛋白质中。参见例如Ma等,(1993) *Biochemistry*, 32:7939;以及 Hohsaka等,(1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121:34。使用CGGG和AGGU,在活体外利用两个化学酰化的移码抑制因子 tRNA将2-萘基丙氨酸和赖氨酸的 NBD衍生物同时掺入到抗生蛋白链菌素中。参见例如Hohsaka等,(1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:12194。在活体内研究中,Moore等检查了具有NCUA 反密码子的tRNA^{Leu}衍生物抑制UAGN密码子(N可为U、A、G或C) 的能力,并且发现四联体UAGA可由具有UCUA反密码子的tRNA^{Leu}以 13%至26%的效率解码,其中在0或-1框架中极少解码。参见Moore等,(2000) *J. Mol. Biol.*, 298:195。在一实施方案中,可在本发明中使用基于稀有密码子或无义密码子的延长密码子,其可减少在其它不希望的位点处的错义通读和移码抑制。

[0273] 对于给定系统来说,选择密码子也可包括一个天然三碱基密码子,其中内源系统不使用(或很少使用)天然碱基密码子。例如,这包括缺乏识别天然三碱基密码子的tRNA的系统和/或三碱基密码子为稀有密码子的系统。

[0274] 选择密码子任选地包括非天然碱基对。这些非天然碱基对进一步扩展现有遗传密码符号。一个额外的碱基对使三联体密码子的数目从64增加至 125。第三碱基对的性质包括稳定且具有选择性的碱基配对、被聚合酶以高保真性有效地酶促掺入到DNA中,以及在合成新的非天然碱基对之后有效的持续引物延伸。可适于方法和组合物的非天然碱基对的描述包括例如 Hirao等,(2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, *Nature Biotechnology*, 20:177-182。还参见Wu, Y. 等,(2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630。其它相关出版物列于下文中。

[0275] 对于活体内使用来说,非天然核苷是膜可渗透的并且经磷酸化而形成相应的三磷酸盐。另外,增加的遗传信息是稳定的并且不受细胞酶破坏。Benner 等先前的工作利用与规范沃森-克里克(Watson-Crick) 配对不同的氢键合模式,其中最值得注意的实例为iso-C:iso-G配对。参见例如Switzer等,(1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322;以及Piccirilli等,(1990) *Nature*, 343:33;Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602。这些碱基一般在一定程度上与天然碱基错配并且不能被酶促复制。Kool和同事证实碱基之间的疏水性堆积相互作用可代替氢键来驱动碱基对的形成。参见Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602;以及Guckian和Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36,2825。在致力于开发满足所有上述要求的非天然碱基对的过程中,Schultz、Romesberg和同事已系统地合成并研究了一系列非天然疏水性碱基。发现 PICS:PICS自身配对比天然碱基对稳定,并且可被大肠杆菌DNA聚合酶I 的克列诺片段(Klenow fragment, KF) 有效地掺入到DNA中。参见例如McMinn等,(1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6;以及Ogawa等,(2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:3274。可由KF以足以用于生物功能的效率和选择性合成3MN:3MN自身配对。参见例如Ogawa等,(2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803。然而,这两种碱基都充当用于进一步复制的链终止子。突变DNA 聚合酶近来已得到发展,其可用于复制PICS自身配对。另外,也可复制7AI 自身配对。参见例如Tae等,(2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439。也已开发新颖金属碱基对Dipic:Py,其在结合Cu(II) 后形成稳定配对。参见Meggers 等,(2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714。因为延长密码子和非天然密码子固有地与天然密码子正交,所以本发明方法可

利用这一性质来产生正交tRNA 以供它们使用。

[0276] 也可使用翻译旁路系统(translational bypassing system)将非天然氨基酸掺入到所需多肽中。在翻译旁路系统中,将大序列掺入到基因中,但并未将其翻译成蛋白质。所述序列含有充当诱导核糖体跳过所述序列并在插入下游重新开始翻译的提示的结构。

[0277] 在某些实施方案中,在本发明方法和/或组合物中的感兴趣蛋白质或多肽(或其部分)是由核酸编码。通常,核酸包含至少一个选择密码子、至少两个选择密码子、至少三个选择密码子、至少四个选择密码子、至少五个选择密码子、至少六个选择密码子、至少七个选择密码子、至少八个选择密码子、至少九个选择密码子、十个或更多个选择密码子。

[0278] 可使用本领域普通技术人员已知并且在本文中描述的方法来诱变感兴趣蛋白质或多肽的编码基因,从而使其包括例如一个或多个供非天然氨基酸的掺入用的选择密码子。例如,诱变感兴趣蛋白质的核酸以使其包括一个或多个选择密码子,从而为一种或多种非天然氨基酸的掺入作准备。本发明包括任何此种变异体,包括但不限于例如包括至少一种非天然氨基酸的任何蛋白质的突变体形式。类似地,本发明还包括相应核酸,即具有一个或多个编码一种或多种非天然氨基酸的选择密码子的任何核酸。

[0279] 可容易地使编码感兴趣蛋白质如松弛素多肽的核酸分子突变以在多肽的任何所需位置处引入半胱氨酸。半胱氨酸广泛用于将反应性分子、水溶性聚合物、蛋白质或多种其它分子引入到感兴趣蛋白质上。本领域普通技术人员已知适于将半胱氨酸掺入到多肽的所需位置中的方法,例如美国专利第 6,608,183 号中描述的方法,以及标准诱变技术,所述美国专利以引用的方式并入本文。

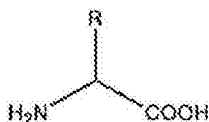
[0280] 非天然编码氨基酸

[0281] 很多种非天然编码氨基酸适用于本发明中。可将任何数目的非天然编码氨基酸引入到松弛素多肽中。一般而言,引入的非天然编码氨基酸实质上对 20 种常见的遗传编码氨基酸(即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)呈化学惰性。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包括与 20 种常见氨基酸中不存在的官能团(包括但不限于叠氮基、酮基、醛基以及氨基)有效并选择性地反应形成稳定缀合物的侧链官能团。例如,包括含有叠氮官能团的非天然编码氨基酸的松弛素多肽可与聚合物(包括但不限于聚(乙二醇))或者含有炔部分的第二多肽反应,从而形成由于叠氮基与炔官能团选择性反应形成休斯根[3+2]环加成产物而得到的稳定缀合物。

[0282] α -氨基酸的一般结构说明如下(式 I):

[0283] I

[0284]



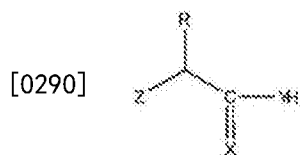
[0285] 非天然编码氨基酸通常为具有上面所列结构式的任何结构,并且可适用于本发明中,在上面所列结构式中R基团为除用于 20 种天然氨基酸中的取代基以外的任何取代基。因为本发明的非天然编码氨基酸通常仅在侧链结构上与天然氨基酸不同,所以非天然编码氨基酸以与天然存在的多肽中形成酰胺键的方式相同的方式,与包括但不限于天然或非天然编码氨基酸的其它氨基酸形成酰胺键。

[0286] 然而,非天然编码氨基酸具有使其区别于天然氨基酸的侧链基团。例如, R任选地包含烷基-、芳基-、酰基-、酮基-、叠氮基-、羟基-、肼、氰基-、卤代-、酰肼、烯基、炔基、醚、硫醇、硒基-、磺酰基-、硼酸酯基(borate)、硼酸酯基(boronate)、磷酸基、膦酰基、膦、杂环基、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺、氨基等或其任何组合。感兴趣的可适用于本发明中的其它非天然存在的氨基酸包括但不限于包含可光活化交联剂的氨基酸、自旋标记的氨基酸、荧光氨基酸、金属结合的氨基酸、含金属的氨基酸、放射性氨基酸、具有新颖官能团的氨基酸、与其它分子共价或非共价相互作用的氨基酸、光笼化和/或可光致异构化的氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸如糖取代的丝氨酸、其它碳水化合物修饰的氨基酸、含酮基的氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、经重原子取代的氨基酸、可化学裂解和/或可光裂解的氨基酸、与天然氨基酸相比具有延长侧链(其包括但不限于聚醚或长链烃,包括但不限于约5个以上或约10个以上碳)的氨基酸、含碳连接的糖的氨基酸、氧化还原活性氨基酸、含氨基硫代酸的氨基酸,以及包含一个或多个毒性部分的氨基酸。

[0287] 可适用于本发明中并且可用于与水溶性聚合物反应的示例性非天然编码氨基酸包括但不限于具有羰基、氨基基、肼、酰肼、氨基脒、叠氮基和炔反应性基团的非天然编码氨基酸。在一些实施方案中,非天然编码氨基酸包含糖部分。此类氨基酸的实例包括N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-半乳糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-苏氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-天冬酰胺和O-甘露糖胺基-L-丝氨酸。此类氨基酸的实例还包括介于氨基酸与糖之间的天然存在的N-或O-键被自然界中通常不存在的共价键—包括但不限于烯炔、肟、硫醚、酰胺等的共价键置换的实例。此类氨基酸的实例还包括天然存在的蛋白质中通常不存在的糖,例如2-脱氧-葡萄糖、2-脱氧半乳糖等。

[0288] 本文中提供的许多非天然编码氨基酸可从例如Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)、Novabiochem (EMD Biosciences的分公司, Darmstadt, Germany) 或Peptech (Burlington, MA, USA) 商购获得。无法可商购获得的非天然编码氨基酸是任选地如本文中所提供的那样合成,或者使用本领域普通技术人员已知的标准方法合成。对于有机合成技术,参见例如Fessenden和Fessenden, Organic Chemistry, (1982,第2版,Willard Grant Press, Boston Mass.); March, Advanced Organic Chemistry (第3版,1985,Wiley and Sons, New York); 以及Carey和Sundberg, Advanced Organic Chemistry (第3版, A 和B部分,1990,Plenum Press, New York)。还参见美国专利第7,045,337 号和第7,083,970号,其以引用的方式并入本文。除了含有新颖侧链的非天然氨基酸之外,可适用于本发明的非天然氨基酸还任选地包含经修饰主链结构,包括但不限于如由式II和III的结构示出的结构:

[0289] II



[0291] III



[0293] 其中Z通常包含OH、NH₂、SH、NH-R'或S-R'; X和Y可相同或不同,通常包含S或O;并且

R和R'任选地相同或不同,通常选自上文针对具有式 I的非天然氨基酸描述的R基团的组成部分的相同清单以及氢。例如,本发明非天然氨基酸任选地包含如由式II和III示出的氨基或羧基中的取代。这种类型的非天然氨基酸包括但不限于 α -羟基酸、 α -硫代酸、 α -氨基硫代羧酸盐,包括但不限于具有对应于20种常见天然氨基酸的侧链或非天然侧链的非天然氨基酸。另外,在 α -碳上的取代任选地包括但不限于L、D或 α - α -二取代氨基酸,如D-谷氨酸、D-丙氨酸、D-甲基-0-酪氨酸、氨基丁酸等。其它结构替代物包括环状氨基酸,如脯氨酸类似物以及3、4、6、7、8和9元环脯氨酸类似物; β 和 γ 氨基酸,如经取代丙氨酸和 γ -氨基丁酸。

[0294] 许多非天然氨基酸是基于诸如酪氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸等天然氨基酸并且适用于本发明。酪氨酸类似物包括但不限于对位取代的酪氨酸、邻位取代的酪氨酸以及间位取代的酪氨酸,其中经取代酪氨酸包含(包括但不限于)酮基(包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、氨基、肼、羟胺、硫醇基、羧基、异丙基、甲基、C6-C20直链或支化烃、饱和或不饱和烃、0-甲基、聚醚基团、硝基、炔基等。另外,也涵盖多取代芳环。可适用于本发明的谷氨酰胺类似物包括但不限于 α -羟基衍生物、 γ -取代衍生物、环状衍生物以及酰胺取代的谷氨酰胺衍生物。可适用于本发明的示例性苯丙氨酸类似物包括但不限于对位取代的苯丙氨酸、邻位取代的苯丙氨酸和间位取代的苯丙氨酸,其中取代基包含(包括但不限于)羟基、甲氧基、甲基、烯丙基、醛、叠氮基、碘基、溴基、酮基(包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、炔基等。可适用于本发明的非天然氨基酸的具体实例包括但不限于对乙酰基-L-苯丙氨酸、0-甲基-L-酪氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、0-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-0-乙酰基-GlcNAc β -丝氨酸、L-多巴(L-Dopa)、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酰基丝氨酸、磷酰基酪氨酸、对碘苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸,以及对炔丙基氧基-苯丙氨酸等。可适用于本发明的多种非天然氨基酸的结构实例提供在例如标题为“*In vivo incorporation of unnatural amino acids.*”的WO 2002/085923中。对于另外的蛋氨酸类似物,还参见Kiick等,(2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS 99:19-24,其以引用的方式并入本文。标题为“*Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides,*”的国际申请第PCT/US06/47822号描述包括但不限于对氨基苯丙氨酸的芳香族胺部分的还原性烷基化,和还原性胺化,所述国际申请以引用的方式并入本文。

[0295] 在一个实施方案中,提供了包括非天然氨基酸(如对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸)的松弛素多肽的组合物。还提供了包含对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸和(包括但不限于)蛋白质和/或细胞的各种组合物。在一方面,包括对(炔丙基氧基)-苯丙氨酸非天然氨基酸的组合物进一步包括正交tRNA。非天然氨基酸可与正交tRNA键合(包括但不限于共价键合),包括但不限于通过氨酰基键与正交tRNA共价键合、与正交tRNA的末端核糖的3' OH或2' OH共价键合等。

[0296] 可借助于非天然氨基酸掺入到蛋白质中的化学部分提供蛋白质的多种优点和操纵性。例如,酮基官能团的独特反应性允许利用许多含肼或含羟胺试剂中的任一种在活体外以及活体内选择性修饰蛋白质。重原子非天然氨基酸例如可用于定相X射线结构数据。使用非天然氨基酸进行重原子的位点特异性引入还为选择重原子的位置提供了选择性和灵

活性。光反应性非天然氨基酸(包括但不限于具有二苯甲酮和芳基叠氮化物(包括但不限于叠氮基苯)侧链的氨基酸)例如允许蛋白质的活体内和活体外有效光交联。光反应性非天然氨基酸的实例包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸以及对苯甲酰基-苯丙氨酸。然后,可通过激发提供时间控制的光反应性基团使具有光反应性非天然氨基酸的蛋白质随意交联。在一个实例中,(包括但不限于)在使用核磁共振和振动光谱的情况下,可由作为局部结构和动力学的探针的经同位素标记的(包括但不限于)甲基取代非天然氨基酸的甲基。炔基或叠氮官能团例如允许利用分子通过[3+2]环加成反应选择性修饰蛋白质。

[0297] 在氨基端掺入到多肽中的非天然氨基酸可由R基团(其为除用于20种天然氨基酸中的取代基以外的任何取代基)和不同于 α -氨基酸(参见式I)中通常存在的NH₂基团的第二反应性基团构成。类似的非天然氨基酸可在羧基端掺入不同于 α -氨基酸(参见式I)中通常存在的COOH基团的第二反应性基团。

[0298] 可选择或设计本发明非天然氨基酸以提供在20种天然氨基酸中不可获得的另外的特性。例如,可任选地设计或选择非天然氨基酸以改良例如掺有所述非天然氨基酸的蛋白质的生物性质。例如,可任选地通过将非天然氨基酸引入到蛋白质中来改良以下性质:毒性、生物分布(biodistribution)、溶解性、稳定性(例如热稳定性、水解稳定性、氧化稳定性、酶促降解抗性等)、纯化和加工便利性、结构性质、光谱性质、化学和/或光化学性质、催化活性、氧化还原电位、半衰期、与其它分子例如共价或非共价反应的能力等。

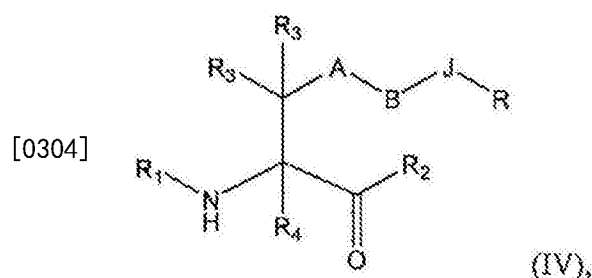
[0299] 非天然氨基酸的结构与合成:羰基、羰基样基团、经掩蔽羰基、经保护羰基和羟胺基

[0300] 在一些实施方案中,本发明提供了通过脲键与水溶性聚合物例如PEG连接的松弛素。

[0301] 许多类型的非天然编码氨基酸适于形成脲键。这些氨基酸包括但不限于含有羰基、二羰基或羟胺基的非天然编码氨基酸。此类氨基酸描述于美国专利公布第2006/0194256号、第2006/0217532号和第2006/0217289号以及标题为“Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides”的WO 2006/069246中,所述文献以引用的方式完整地并入本文。非天然编码氨基酸也描述于美国专利第7,083,970号和美国专利第7,045,337号中,所述文献以引用的方式完整地并入本文。

[0302] 本发明的一些实施方案利用在一个或多个位置处被对乙酰基苯丙氨酸氨基酸取代的松弛素多肽。对乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸和间乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸的合成描述于Zhang, Z.等, Biochemistry 42:6735-6746 (2003)中,所述文献以引用的方式并入本文。本领域普通技术人员可类似地制备其它含羰基或含二羰基的氨基酸。进一步地,本文中所包括的非天然氨基酸的非限制性示例性合成阐述在美国专利第7,083,970号的图4、24-34和36-39中,所述专利以引用的方式完整地并入本文。

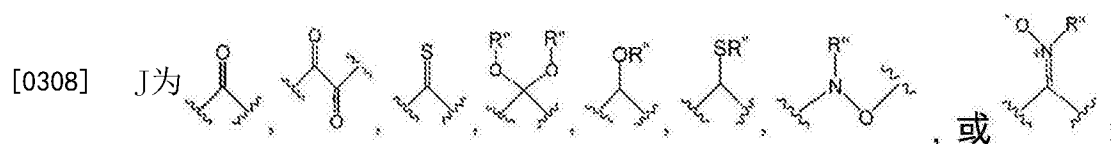
[0303] 具有亲电子反应性基团的氨基酸尤其允许多种经由亲核加成反应连接分子的反应。此类亲电子反应性基团包括羰基(包括酮基和二羰基)、羰基样基团(其具有类似于羰基(包括酮基和二羰基)的反应性并且在结构上与羰基类似)、经掩蔽羰基(其可容易地转化为羰基(包括酮基和二羰基)),或经保护羰基(其在脱除保护基后具有与羰基(包括酮基和二羰基)类似的反应性)。此类氨基酸包括具有式(IV)结构的氨基酸:



[0305] 其中：

[0306] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳基或经取代亚芳基;

[0307] B是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和-C(R')₂-N(R')-N(R')-,其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;



[0309] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0310] 每个R¹均独立地为H、烷基、经取代烷基或保护基,或当存在一个以上R¹基团时,两个R¹任选地形成杂环烷基;

[0311] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0312] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0313] R₃和R₄中的每一个均独立地为H、卤素、低级烷基或经取代低级烷基,或者R₃和R₄或两个R₃基团任选地形成环烷基或杂环烷基;

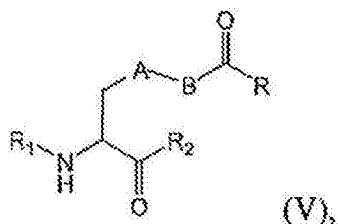
[0314] 或者-A-B-J-R基团一起形成包含至少一个羰基(包括二羰基)、经保护羰基(包括经保护二羰基)或经掩蔽羰基(包括经掩蔽二羰基)的双环或三环环烷基或杂环烷基;

[0315] 或者-J-R基团一起形成包含至少一个羰基(包括二羰基)、经保护羰基(包括经保护二羰基)或经掩蔽羰基(包括经掩蔽二羰基)的单环或双环环烷基或杂环烷基;

[0316] 条件是当A为亚苯基并且每个R₃均为H时,B存在;并且当A为-(CH₂)₄- 并且每个R₃均为H时,B不为-NHC(O)(CH₂CH₂)-;并且当A与B都不存在并且每个R₃均为H时,R不为甲基。

[0317] 另外,包括具有式(V)结构的氨基酸:

[0318]



[0319] 其中:

[0320] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

[0321] B是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和 -C(R')₂-N(R')-N(R')-, 其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;

[0322] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

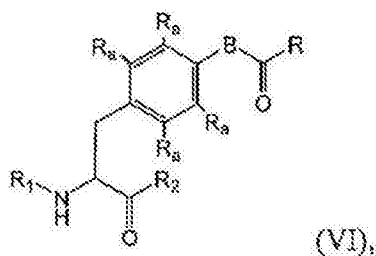
[0323] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0324] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0325] 条件是当A为亚苯基时,B存在;并且当A为-(CH₂)₄-时,B不为-NHC(O)(CH₂CH₂)-;并且当A与B都不存在时,R不为甲基。

[0326] 另外,包括具有式(VI)结构的氨基酸:

[0327]



[0328] 其中:

[0329] B是选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-

(亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 和 $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ ，其中每个 R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基；

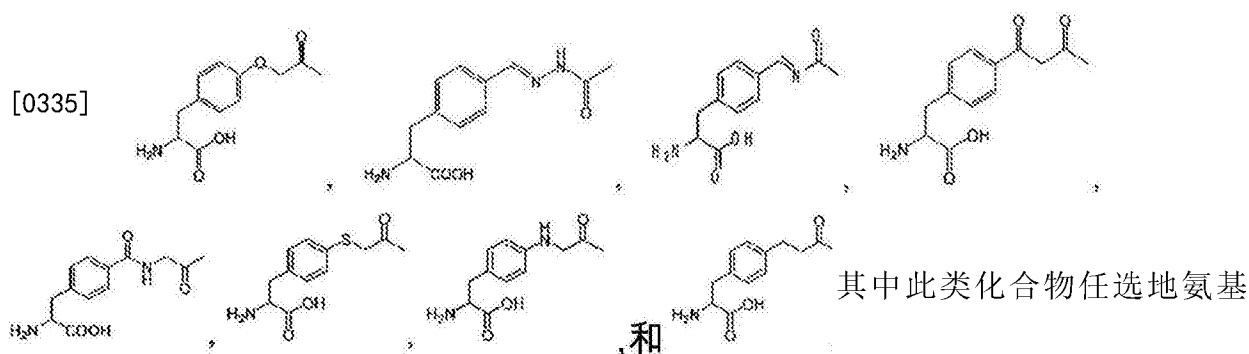
[0330] R 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0331] R_1 是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0332] R_2 是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

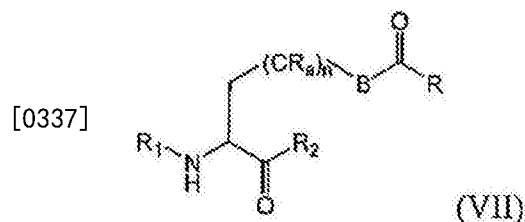
[0333] 每个 R_a 均独立地选自由H、卤素、烷基、经取代烷基、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_kR'$ （其中 k 为1、2或3）、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 和 $-S(O)_kR'$ 组成的组，其中每个 R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基。

[0334] 另外，包括以下氨基酸：



经保护、羧基经保护，或为其盐。另外，以下非天然氨基酸中的任一种都可以掺入到非天然氨基酸多肽中。

[0336] 另外，包括以下具有式 (VII) 结构的氨基酸：



[0338] 其中

[0339] B 是任选的，并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子：低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、 $-O-$ 、 $-O-$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-S-$ 、 $-S-$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-S(O)_k-$ （其中 k 为1、2或3）、 $-S(O)_k$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-N(R')CO-$ （亚烷基或经取代亚烷基）、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 和 $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ ，其中每个 R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基；

[0340] R 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

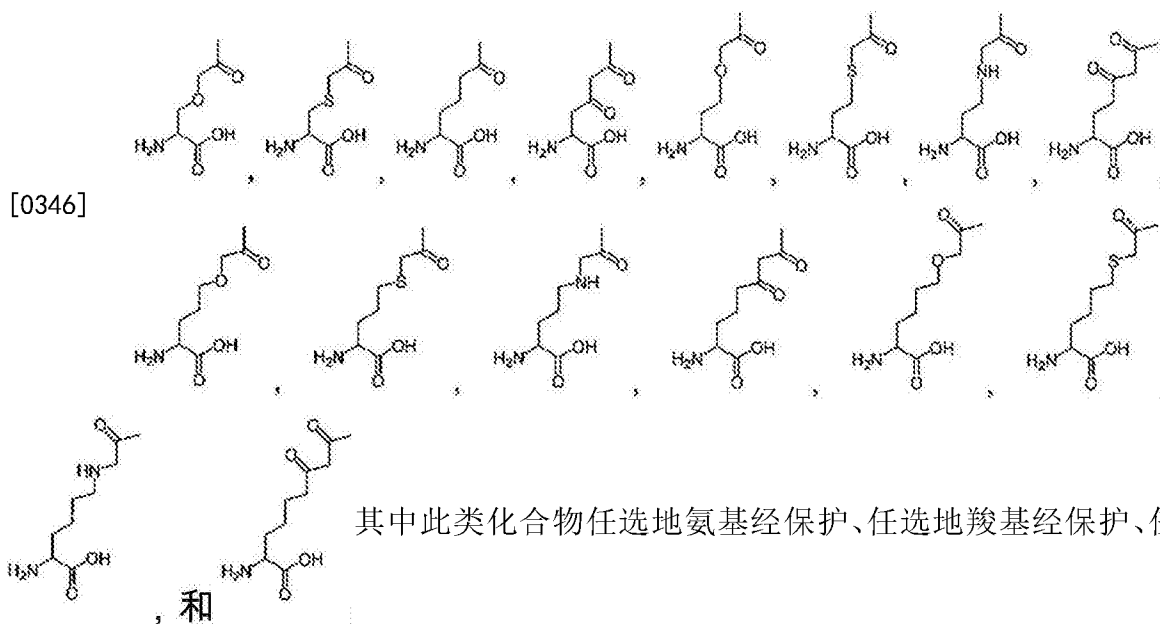
[0341] R_1 是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0342] R_2 是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

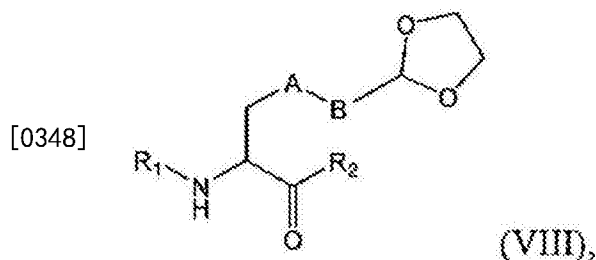
[0343] 每个 R_a 均独立地选自由H、卤素、烷基、经取代烷基、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_kR'$ (其中 k 为1、2或3)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 和 $-S(O)_kR'$ 组成的组,其中每个 R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基;并且 n 为0至8;

[0344] 条件是当 A 为 $-(CH_2)_4-$ 时, B 不为 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 。

[0345] 另外,包括以下氨基酸:



[0347] 另外,包括以下具有式(VIII)结构的氨基酸:



[0349] 其中 A 是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

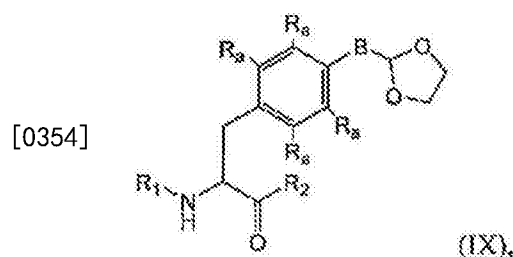
[0350] B 是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、 $-O-$ 、 $-O-$ (亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-S-$ 、 $-S-$ (亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-S(O)_k-$ (其中 k 为1、2或3)、 $-S(O)_k$ (亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ (亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ (亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ -(亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ -(亚烷基或经取代亚烷基)-、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ -(亚烷基

或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和-C(R')₂-N(R')-N(R')-，其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基；

[0351] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0352] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

[0353] 另外，包括以下具有式(IX)结构的氨基酸：



[0355] B是任选的，并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子：低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k-（其中k为1、2或3）、-S(O)_k(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和-C(R')₂-N(R')-N(R')-，其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基；

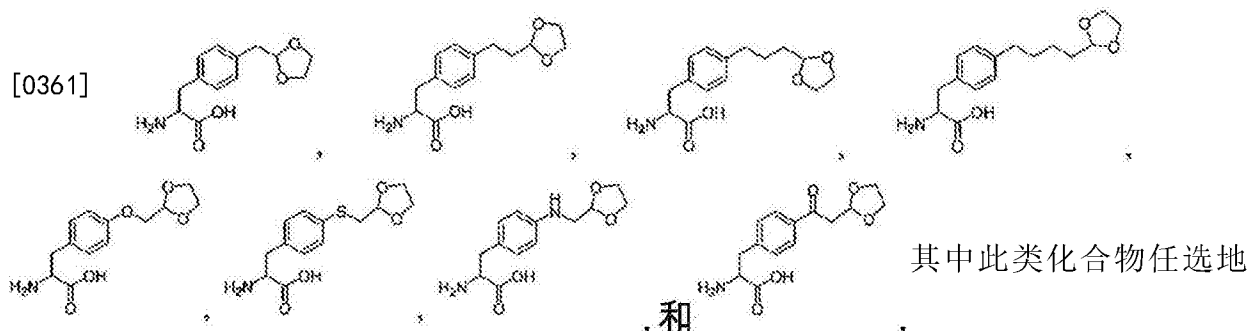
[0356] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0357] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0358] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

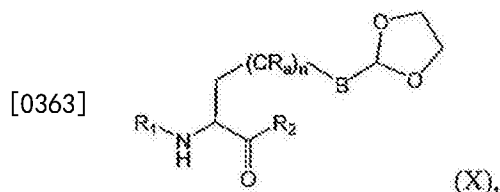
[0359] 其中每个R_a均独立地选自由H、卤素、烷基、经取代烷基、-N(R')₂、-C(O)_kR'（其中k为1、2或3）、-C(O)N(R')₂、-OR'和-S(O)_kR'组成的组，其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基。

[0360] 另外，包括以下氨基酸：



氨基经保护、任选地羧基经保护、任选地氨基经保护并且羧基也经保护，或为其盐。另外，这些非天然氨基酸以及以下非天然氨基酸中的任一种都可掺入到非天然氨基酸多肽中。

[0362] 另外,包括以下具有式(X)结构的氨基酸:



[0364] 其中B是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和 -C(R')₂-N(R')-N(R')-, 其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;

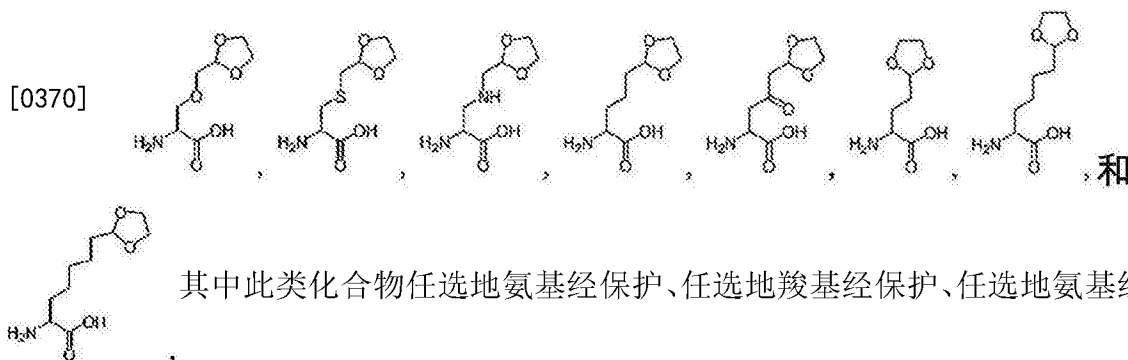
[0365] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0366] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0367] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0368] 每个R_a均独立地选自由H、卤素、烷基、经取代烷基、-N(R')₂、-C(O)_kR' (其中k为1、2或3)、-C(O)N(R')₂、-OR' 和 -S(O)_kR' 组成的组,其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;并且n为0至8。

[0369] 另外,包括以下氨基酸:



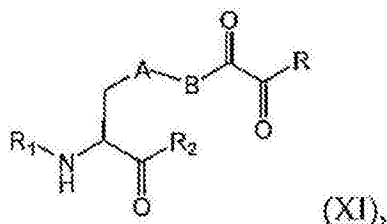
其中此类化合物任选地氨基经保护、任选地羧基经保护、任选地氨基经保护并

且羧基也经保护,或为其盐。另外,这些非天然氨基酸以及以下非天然氨基酸中的任一种都可掺入到非天然氨基酸多肽中。

[0371] 除了单羰基结构之外,本文描述的非天然氨基酸还可包括诸如二羰基、二羰基样基团、经掩蔽二羰基和经保护二羰基的基团。

[0372] 例如,包括以下具有式(XI)结构的氨基酸:

[0373]



[0374] 其中A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基或经取代亚烷基;

[0375] B是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、O-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、S-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、C(O)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、C(S)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、NR'-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、CON(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、CSN(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和-C(R')₂N(R')N(R')-,其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;

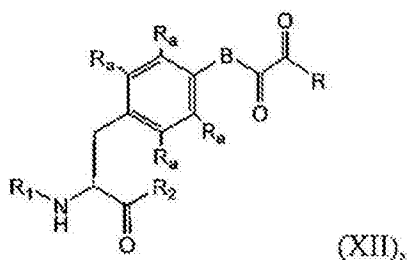
[0376] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0377] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0378] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

[0379] 另外,包括以下具有式(XII)结构的氨基酸:

[0380]



[0381] B是任选的,并且当存在时为选自由以下各基团组成的组的连接子:低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、O-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、S-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)_k- (其中k为1、2或3)、-S(O)_k(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、C(O)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、C(S)-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、NR'-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、CON(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、CSN(R')-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和-C(R')₂N(R')N(R')-,其中每个R'均独立地为H、烷基或经取代烷基;

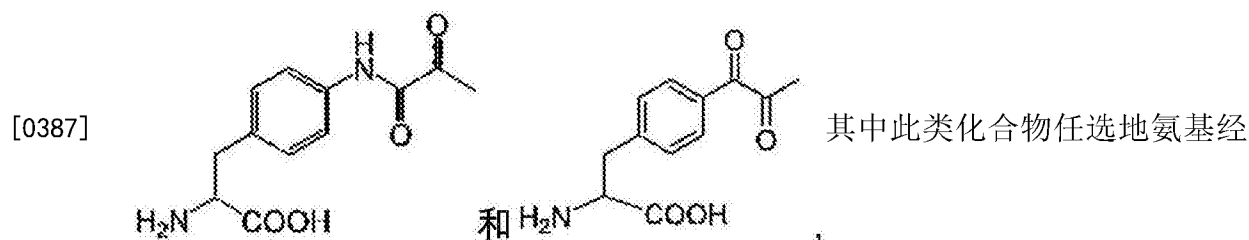
[0382] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0383] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0384] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

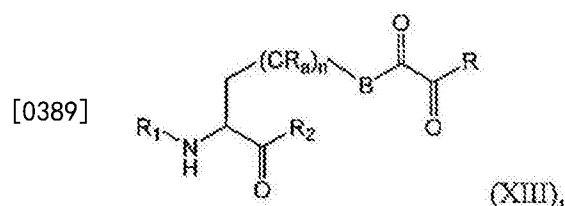
[0385] 其中每个R_a均独立地选自H、卤素、烷基、经取代烷基、-N(R')₂、-C(O)kR' (其中k为1、2或3)、-C(O)N(R')₂、-OR' 和-S(O)kR' 组成的组，其中每个R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基。

[0386] 另外，包括以下氨基酸：



保护、任选地羧基经保护、任选地氨基经保护并且羧基也经保护，或为其盐。另外，这些非天然氨基酸以及以下非天然氨基酸中的任一种都可掺入到非天然氨基酸多肽中。

[0388] 另外，包括以下具有式(XIII)结构的氨基酸：



[0390] 其中B是任选的，并且当存在时为选自以下各基团组成的组的连接子：低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、低级亚杂烷基、经取代低级亚杂烷基、-O-、-O- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S-、-S- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-S(O)k- (其中k为1、2或3)、-S(O)k (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')-、-NR'- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-N(R')CO- (亚烷基或经取代亚烷基)-、-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-和 -C(R')₂-N(R')-N(R')-，其中每个R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基；

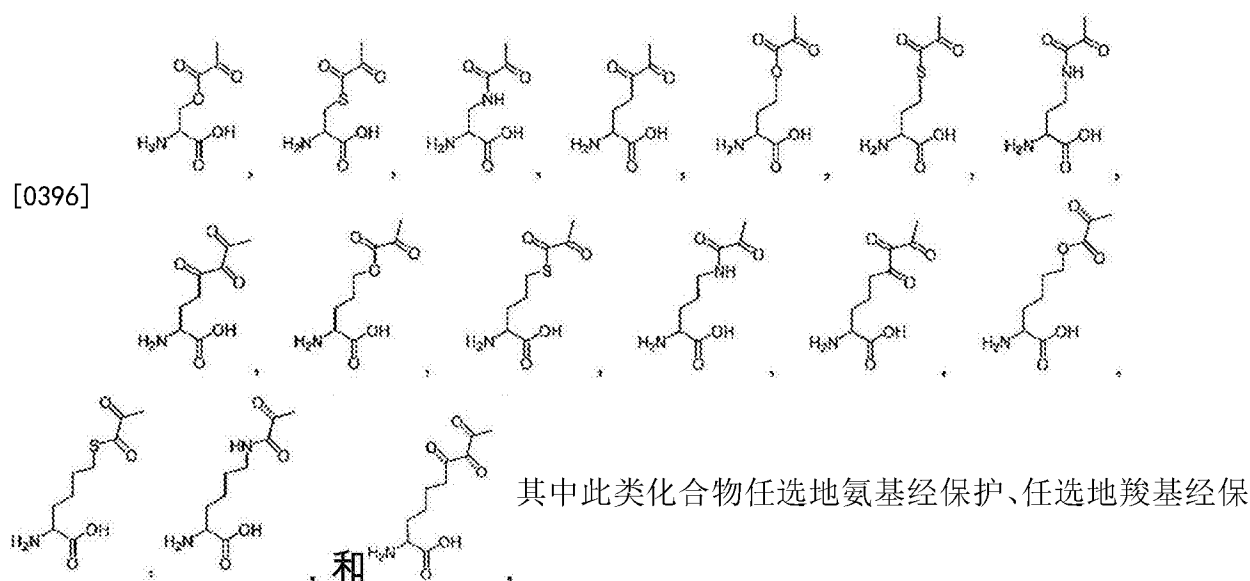
[0391] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0392] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0393] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0394] 每个R_a均独立地选自H、卤素、烷基、经取代烷基、-N(R')₂、-C(O)kR' (其中k为1、2或3)、-C(O)N(R')₂、-OR' 和-S(O)kR' 组成的组，其中每个R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基；并且n为0至8。

[0395] 另外，包括以下氨基酸：



[0399] 其中:

[0400] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基芳基、经取代亚烷基芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

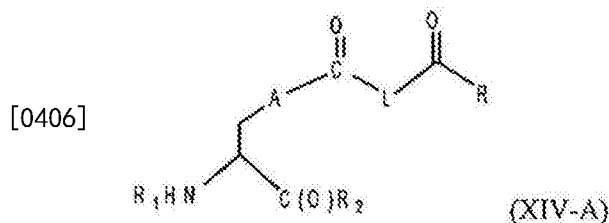
[0401] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0402] R1是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0403] R2是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0404] X1为C、S或S(O);并且L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基),其中R'为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0405] 另外,包括以下具有式 (XIV-A) 结构的氨基酸:



[0407] 其中:

[0408] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取

代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基；

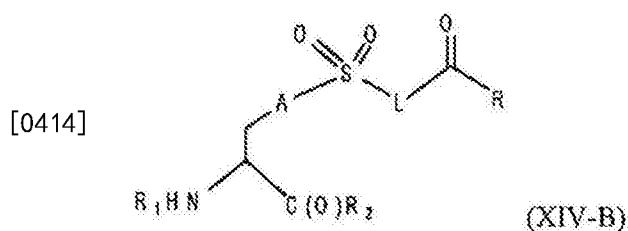
[0409] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0410] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0411] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0412] L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基)，其中R' 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0413] 另外，包括以下具有式 (XIV-B) 结构的氨基酸：



[0415] 其中：

[0416] A是任选的，并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基；

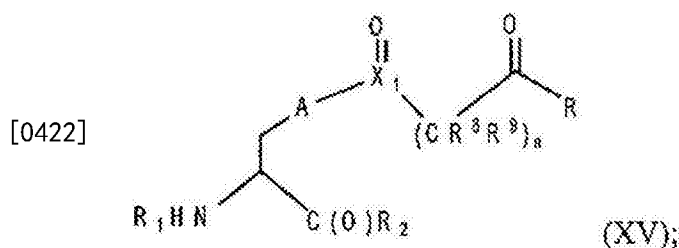
[0417] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0418] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0419] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0420] L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基)，其中R' 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0421] 另外，包括以下具有式 (XV) 结构的氨基酸：



[0423] 其中：

[0424] A是任选的，并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基；

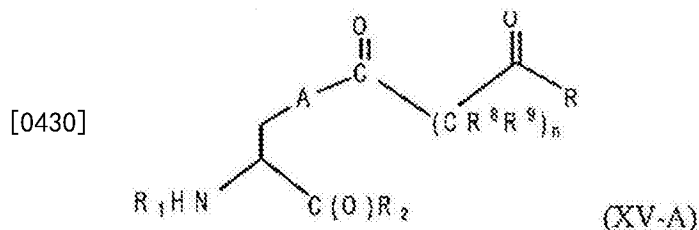
[0425] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0426] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0427] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0428] X_1 为C、S、或S(O);并且n为0、1、2、3、4或5;并且每个 CR^8R^9 基团上的每个 R^8 和 R^9 均独立地选自由H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基组成的组,或任何 R^8 和 R^9 可一起形成=O或环烷基,或任何两个相邻 R^8 基团可一起形成环烷基。

[0429] 另外,包括以下具有式(XV-A)结构的氨基酸:



[0431] 其中:

[0432] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

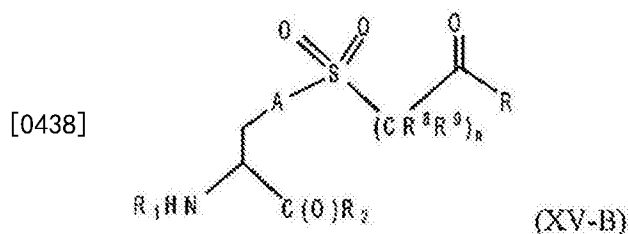
[0433] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0434] R_1 是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0435] R_2 是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0436] n为0、1、2、3、4或5;并且每个 CR^8R^9 基团上的每个 R^8 和 R^9 均独立地选自由H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基组成的组,或者任何 R^8 和 R^9 可一起形成=O或环烷基,或者任何两个相邻 R^8 基团可一起形成环烷基。

[0437] 另外,包括以下具有式(XV-B)结构的氨基酸:



[0439] 其中:

[0440] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

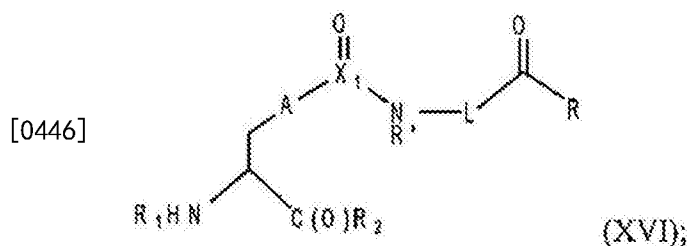
[0441] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0442] R_1 是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0443] R_2 是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0444] n为0、1、2、3、4或5;并且每个 CR^8R^9 基团上的每个 R^8 和 R^9 均独立地选自由H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基组成的组,或者任何 R^8 和 R^9 可一起形成=O或环烷基,或者任何两个相邻 R^8 基团可一起形成环烷基。

[0445] 另外,包括以下具有式(XVI)结构的氨基酸:



[0447] 其中:

[0448] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

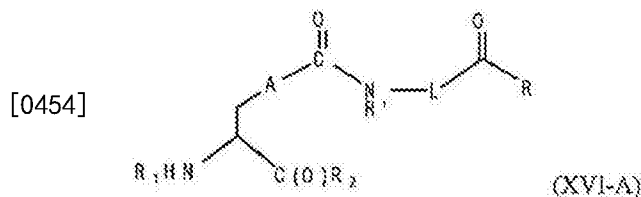
[0449] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0450] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0451] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0452] X₁为C、S、或S(O);并且L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基),其中R' 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0453] 另外,包括以下具有式 (XVI-A) 结构的氨基酸:



[0455] 其中:

[0456] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷芳基、经取代亚烷芳基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基;

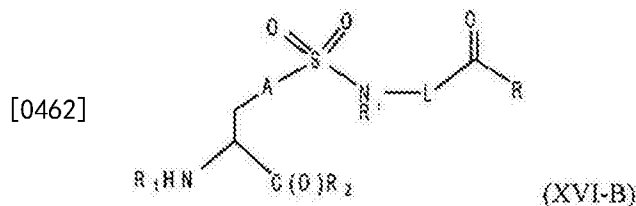
[0457] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0458] R₁是任选的,并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;并且

[0459] R₂是任选的,并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0460] L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基),其中R' 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0461] 另外,包括以下具有式 (XVI-B) 结构的氨基酸:



[0463] 其中:

[0464] A是任选的,并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基

基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基；

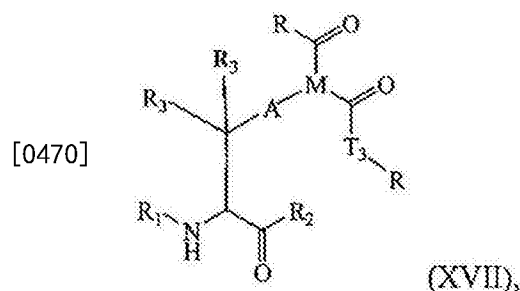
[0465] R为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0466] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0467] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0468] L为亚烷基、经取代亚烷基、N(R') (亚烷基) 或N(R') (经取代亚烷基)，其中R' 为H、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

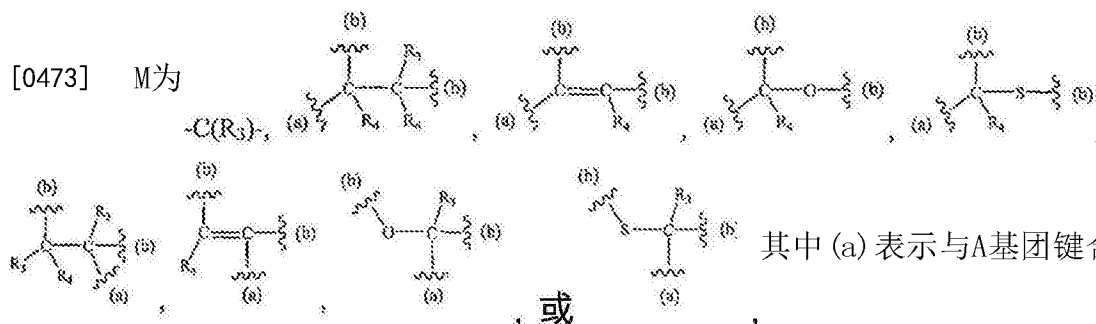
[0469] 另外，包括具有式 (XVII) 结构的氨基酸：



[0471] 其中：

[0472] A是任选的，并且当存在时为低级亚烷基、经取代低级亚烷基、低级亚环烷基、经取代低级亚环烷基、低级亚烯基、经取代低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、经取代亚杂烷基、低级亚杂环烷基、经取代低级亚杂环烷基、亚芳基、经取代亚芳基、亚杂芳基、经取代亚杂芳基、亚烷基、经取代亚烷基、亚芳烷基或经取代亚芳烷基；

[0473] M为



表示与各自的羰基键合，R₃和R₄独立地选自H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基，或者R₃和R₄或两个R₃基团或两个R₄基团任选地形成环烷基或杂环烷基；

[0474] R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

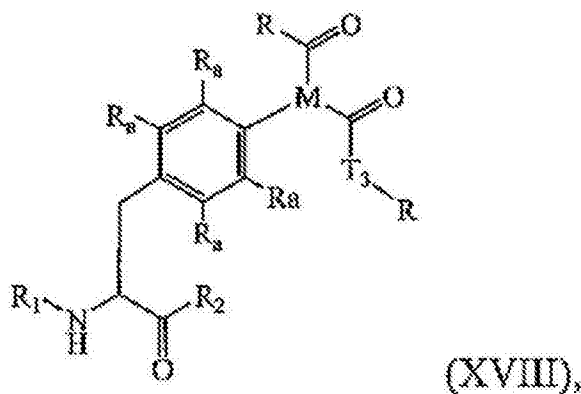
[0475] T₃为键、C(R) (R)、O或S，并且R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基；

[0476] R₁是任选的，并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0477] R₂是任选的，并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

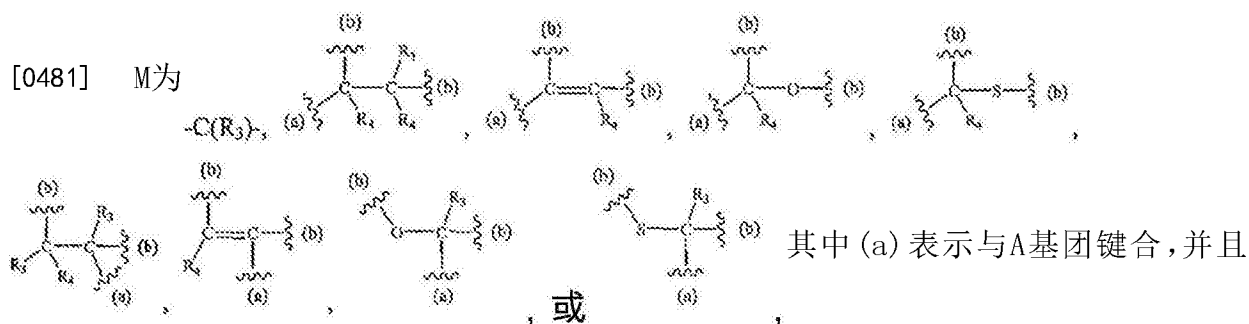
[0478] 另外，包括具有式 (XVIII) 结构的氨基酸：

[0479]



[0480] 其中:

[0481] M为



[0482] R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

[0483] T₃为键、C(R)(R)、O或S, 并且R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基;

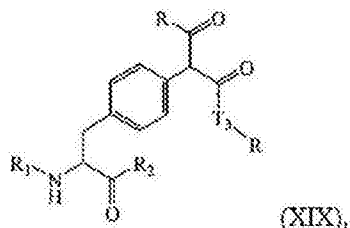
[0484] R₁是任选的, 并且当存在时为H、氨基保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸; 并且

[0485] R₂是任选的, 并且当存在时为OH、酯保护基、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸;

[0486] 每个R_a均独立地选自H、卤素、烷基、经取代烷基、-N(R')₂、-C(O)_kR' (其中k为1、2或3)、-C(O)N(R')₂、-OR' 和-S(O)_kR' 组成的组, 其中每个 R' 均独立地为H、烷基或经取代烷基。

[0487] 另外, 包括具有式 (XIX) 结构的氨基酸:

[0488]



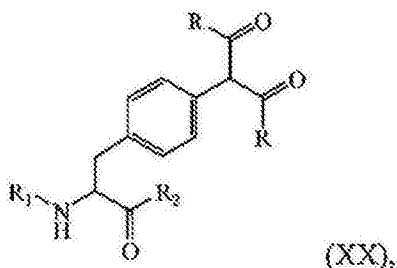
[0489] 其中:

[0490] R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基; 并且

[0491] T₃为O或S。

[0492] 另外, 包括具有式 (XX) 结构的氨基酸:

[0493]

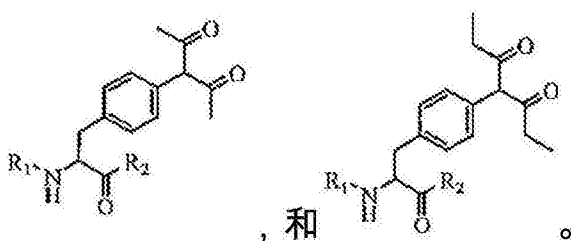


[0494] 其中:

[0495] R为H、卤素、烷基、经取代烷基、环烷基或经取代环烷基。

[0496] 另外,包括以下具有式 (XXI) 结构的氨基酸:

[0497]



[0498] 在一些实施方案中,以化学方式修饰包含非天然氨基酸的多肽以产生反应性羰基或二羰基官能团。举例来说,可由具有相邻氨基和羟基的官能团产生可用于缀合反应的醛官能团。当生物活性分子为多肽时,例如可使用N-端丝氨酸或苏氨酸(其可正常存在,或可经由化学或酶促消化而暴露)在温和的氧化裂解条件下使用高碘酸盐产生醛官能团。参见例如Gaertner等, *Bioconjug. Chem.* 3:262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner等, *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994)。然而,本领域中已知的方法局限于在肽或蛋白质的N端处的氨基酸。

[0499] 在本发明中,带有相邻羟基和氨基的非天然氨基酸可作为“经掩蔽”的醛官能团掺入到多肽中。例如,5-羟基赖氨酸带有与ε-胺相邻的羟基。用于产生醛的反应条件通常涉及在温和条件下添加摩尔过量的偏高碘酸钠,以避免在多肽内的其它位点处发生氧化。氧化反应的pH通常为约7.0。典型反应涉及向多肽的缓冲溶液中添加约1.5摩尔过量的偏高碘酸钠,接着在黑暗环境中温育约10分钟。参见例如美国专利第6,423,685号。

[0500] 羰基或二羰基官能团可在温和条件下在水溶液中与含羟胺的试剂选择性反应,从而形成在生理条件下稳定的相应肟键。参见例如Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. 和 Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)。此外,羰基或二羰基的独特反应性允许在存在其它氨基酸侧链的情况下进行选择性的修饰。参见例如Cornish, V. W. 等, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K. 等, *Science* 276:1125-1128 (1997)。

[0501] 非天然氨基酸的结构与合成:含羟胺的氨基酸

[0502] 美国专利申请第11/316,534号(美国公布第20060189529号)以引用的方式完整地并入本文。因此,美国专利申请第11/316,534号(美国公布第20060189529号)中的第V章(标题为“Non-natural Amino Acids”),B部分(标题为“Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids”)中所提供的公开内容完全应用于制备、纯化、表征和使用本文描述的非天然氨基酸、非天然氨基酸多肽和经修饰非天然氨基酸多肽的方法、组合物(包括式I-XXXV)、技术和策略,其应用程度就如同所述公

开内容完全呈现于本文中。美国专利公布第 2006/0194256号、第2006/0217532号和第2006/0217289号以及标题为“Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides,”的W02006/069246也以引用的方式完整地并入本文。

[0503] 非天然氨基酸的化学合成

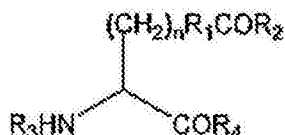
[0504] 适用于本发明中的许多非天然氨基酸可从例如Sigma (USA) 或Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 商购获得。无法商购获得的非天然氨基酸是任选地如本文中所提供的那样或如各种出版物中所提供的那样合成, 或者使用本领域普通技术人员已知的标准方法合成。对于有机合成技术, 参见例如Fessenden 和Fessenden, Organic Chemistry, (1982, 第二版, Willard Grant Press, Boston Mass.); March, Advanced Organic Chemistry (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York); 以及Carey和Sundberg, Advanced Organic Chemistry (第三版, 部分A和B, 1990, Plenum Press, New York)。描述非天然氨基酸的合成的另外的出版物包括, 例如, 标题为“In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids”的WO 2002/085923; Matsoukas等, (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. 等 (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4-[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pivcolates 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等, (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; 以及, Subasinghe等, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7。还参见标题为“Protein Arrays”的美国专利公布第US 2004/0198637号, 其以引用的方式并入本文。

[0505] A. 羰基反应性基团

[0506] 具有羰基反应性基团的氨基酸尤其允许多种经由亲核加成或醇醛缩合反应连接分子(包括但不限于PEG或其它水溶性分子)的反应。

[0507] 示例性含羰基的氨基酸可如下表示:

[0508]



[0509] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、经取代烷基,或经取代芳基;R₂为H、烷基、芳基、经取代烷基和经取代芳基;并且R₃为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R₄为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基并且R₂为简单烷基(即甲基、乙基或丙基),并且酮部分位于相对于烷基侧链的对位。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基并且R₂为简单烷基(即甲基、乙基或丙基),并且酮部分位于相对于烷基侧链的间位。

[0510] 对乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸和间乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸的合成描述于Zhang, Z.等,Biochemistry 42:6735-6746 (2003)中,其以引用的方式并入本文。本领域普通技术人员可类似地制备其它含羰基的氨基酸。

[0511] 在一些实施方案中,以化学方式修饰包含非天然编码氨基酸的多肽以产生反应性羰基官能团。举例来说,可由具有相邻氨基和羟基的官能团产生可用于缀合反应的醛官能团。当生物活性分子为多肽时,例如可使用N端丝氨酸或苏氨酸(其可正常存在,或可经由化学或酶促消化而暴露)在温和的氧化裂解条件下使用高碘酸盐产生醛官能团。参见例如Gaertner等,Bioconjug. Chem. 3:262-268 (1992);Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992);Gaertner等,J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)。然而,本领域中已知的方法局限于在肽或蛋白质的N端处的氨基酸。

[0512] 在本发明中,带有相邻羟基和氨基的非天然编码氨基酸可作为“经掩蔽”的醛官能团掺入到多肽中。例如,5-羟基赖氨酸带有与ε胺相邻的羟基。用于产生醛的反应条件通常涉及在温和条件下添加摩尔过量的偏高碘酸钠,以避免在多肽内的其它位点处发生氧化。氧化反应的pH通常为约7.0。典型反应涉及向多肽的缓冲溶液中添加约1.5摩尔过量的偏高碘酸钠,接着在黑暗环境中温育约10分钟。参见例如美国专利第6,423,685号,其以引用的方式并入本文。

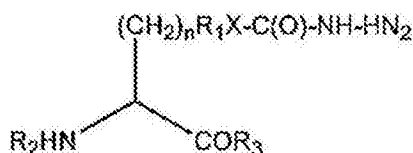
[0513] 羰基官能团可在温和条件下在水溶液中与含肼、酰肼、羟胺或氨基脲的试剂选择性反应,以分别形成在生理条件下稳定的相应腙、肟或缩氨基脲键。参见例如Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. 和 Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。此外,羰基的独特反应性允许在存在其它氨基酸侧链的情况下进行选择性的修饰。参见例如Cornish, V. W. 等, J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K. 等, Science 276:1125-1128 (1997)。

[0514] B. 肼、酰肼或氨基脲反应性基团

[0515] 含有亲核基团如肼、酰肼或氨基脲的非天然编码氨基酸允许与多种亲电子基团反应形成缀合物(包括但不限于与PEG或其它水溶性聚合物反应)。

[0516] 示例性含肼、酰肼或氨基脲的氨基酸可如下表示:

[0517]



[0518] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、经取代烷基或经取代芳基或不存在;X为O、N或S或不存在;R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0519] 在一些实施方案中,n为4,R₁不存在并且X为N。在一些实施方案中,n为2,R₁不存在并且X不存在。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X为O,并且氧原子位于芳环上脂肪族基团的对位。

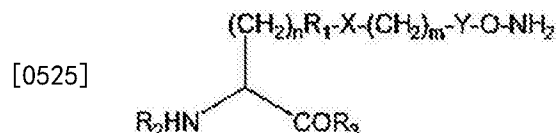
[0520] 含酰肼、肼和氨基脒的氨基酸可获自商业来源。举例来说,L-谷氨酸- α -酰肼可获自Sigma Chemical (St.Louis,MO)。无法商购获得的其它氨基酸可由本领域普通技术人员制备。参见例如美国专利第6,281,211号,其以引用的方式并入本文。

[0521] 含有带有酰肼、肼或氨基脒官能团的非天然编码氨基酸的多肽可与多种含有醛或具有类似化学反应性的其它官能团的分子有效并选择性地反应。参见例如Shao, J. 和 Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。与20种常见氨基酸上存在的亲核基团(包括但不限于丝氨酸或苏氨酸的羟基或赖氨酸的氨基以及N端)相比,酰肼、肼和氨基脒官能团的独特反应性使它们对醛、酮和其它亲电子基团的反应性显著更强。

[0522] C. 含氨氧基的氨基酸

[0523] 含有氨氧基(也被称作羟胺)的非天然编码氨基酸允许与多种亲电子基团反应形成缀合物(包括但不限于与PEG或其它水溶性聚合物反应)。如同肼、酰肼和氨基脒一样,氨氧基的增强的亲核性使它与多种含有醛或具有类似化学反应性的其它官能团的分子有效并选择性地反应。参见例如Shao, J. 和 Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang和C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34:727-736 (2001)。尽管与肼基团反应的结果为相应脎,但氨氧基与含羰基的基团如酮的反应通常产生脎。

[0524] 示例性含氨氧基的氨基酸可如下表示:



[0526] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、经取代烷基或经取代芳基或不存在;X为O、N、S或不存在;m为0-10;Y=C(O)或不存在;R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X为O,m为1,并且Y存在。在一些实施方案中,n为2,R₁和X不存在,m为0,并且Y不存在。

[0527] 含氨氧基的氨基酸可由可容易获得的氨基酸前体(高丝氨酸、丝氨酸和苏氨酸)制备。参见例如M. Carrasco和R. Brown, J. Org. Chem. 68:8853-8858 (2003)。某些含氨氧基的氨基酸如L-2-氨基-4-(氨氧基)丁酸已从天然来源分离(Rosenthal, G., Life Sci. 60:1635-1641 (1997))。其它含氨氧基的氨基酸可由本领域普通技术人员来制备。

[0528] D. 叠氮基和炔基反应性基团

[0529] 叠氮基和炔基官能团的独特反应性使它们对多肽和其它生物分子的选择性修饰极为有用。有机叠氮基,尤其是脂肪族叠氮基,以及炔基一般对常见的反应性化学条件稳定。具体来说,叠氮基与炔基官能团都对天然存在的多肽中存在的20种常见氨基酸的侧链(即R基团)呈惰性。然而,当使叠氮基与炔基靠近时,它们的“弹簧负载(spring-loaded)”性质显露,并且它们经由休斯根[3+2]环加成反应选择性并有效地反应从而产生相应三唑。参

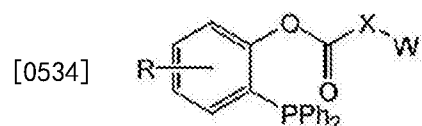
见例如 Chin J.等, Science 301:964-7 (2003); Wang, Q.等, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W.等, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)。

[0530] 因为休斯根环加成反应涉及选择性环加成反应(例如参见 Padwa, A., comprehensive organic synthesis, 第4卷, (Trost, B. M. 编, 1991), 第1069-1109 页; Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (Padwa, A. 编, 1984), 第1-176页)而非亲核取代, 所以掺入带有含叠氮基和含炔基的侧链的非天然编码氨基酸使得所得多肽能在非天然编码氨基酸的位置处被选择性修饰。涉及含叠氮基或含炔基的松弛素多肽的环加成反应可在室温下在水性条件下通过在催化量的用于将Cu(II)原位还原为Cu(I)的还原剂存在下添加Cu(II)(包括但不限于呈催化量的CuSO₄的形式)来进行。参见例如Wang, Q.等, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W.等, J. Org. Chem. 67: 3057-3064 (2002); Rostovtsev等, Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599 (2002)。示例性还原剂包括(包括但不限于)抗坏血酸盐、金属铜、奎宁(quinine)、氢醌、维生素K、谷胱甘肽、半胱氨酸、Fe²⁺、Co²⁺以及外加电位。

[0531] 在一些需要介于叠氮基与炔基之间的休斯根[3+2]环加成反应的情况下, 松弛素多肽包含含有炔部分的非天然编码氨基酸, 并且待与所述氨基酸连接的水溶性聚合物包含叠氮部分。或者, 也可进行逆向反应(即在氨基酸上具有叠氮部分, 而在水溶性聚合物上存在炔部分)。

[0532] 叠氮官能团也可与含有芳基酯并且经芳基磷部分适当地官能化的水溶性聚合物选择性地反应从而产生酰胺键。芳基磷基团原位还原叠氮基, 并且所得胺随后与最接近的酯键有效反应从而产生相应酰胺。参见例如E. Saxon 和C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)。含叠氮基的氨基酸可为烷基叠氮化物(包括但不限于2-氨基-6-叠氮基-1-己酸)或芳基叠氮化物(对叠氮基-苯丙氨酸)。

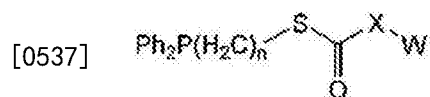
[0533] 含有芳基酯和磷部分的示例性水溶性聚合物可如下表示:



[0535] 其中X可为O、N、S或不存在, Ph为苯基, W为水溶性聚合物并且R 可为H、烷基、芳基、经取代烷基和经取代芳基。示例性R基团包括但不限于-CH₂、-C(CH₃)₃、-OR'、-NR' R''、-SR'、-卤素、-C(O) R'、-CONR' R''、-S(O)₂ R'、-S(O)₂ NR' R''、-CN以及-NO₂。R'、R''、R'''和R'''各自独立地指代氢、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的芳基(包括但不限于被1-3个卤素取代的芳基)、经取代或未经取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基, 或芳基烷基。当本发明化合物包括一个以上R基团时, 例如, 每个R基团均独立地加以选择, 而当存在R'、R''、R'''和R'''基团中的一者以上时, 这些基团同样是各自独立地加以选择。当R'和R''与同一氮原子连接时, 它们可与氮原子组合形成5元、6元或7元环。例如, -NR' R''意在包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据对取代基的上述论述, 本领域技术人员应了解术语“烷基”意在包括包含与除氢基以外的基团结合的碳原子的基团, 例如卤代烷基(包括但不限于-CF₃和-CH₂CF₃)和酰基(包括但不限于-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃等)。

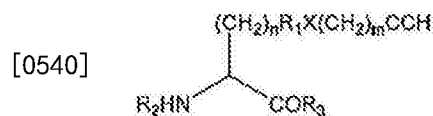
[0536] 叠氮官能团也可与含有硫酯并且经芳基磷部分适当地官能化的水溶性聚合物选择性地反应从而产生酰胺键。芳基磷基团原位还原叠氮基, 并且所得胺随后与硫酯键有效

反应从而产生相应酰胺。含有硫酯和磷部分的示例性水溶性聚合物可如下表示:



[0538] 其中n为1-10;X可为O、N、S或不存在,Ph为苯基,并且W为水溶性聚合物。

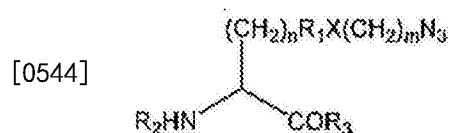
[0539] 示例性含炔基的氨基酸可如下表示:



[0541] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、经取代烷基或经取代芳基或不存在;X为O、N、S或不存在;m为0-10,R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X不存在,m为0并且乙炔部分位于相对于烷基侧链的对位。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X为O,m为1并且炔丙基氧基位于相对于烷基侧链的对位(即O-炔丙基-酪氨酸)。在一些实施方案中,n为1,R₁和X不存在并且m为0(即炔丙基甘氨酸)。

[0542] 含炔基的氨基酸可商购获得。例如,炔丙基甘氨酸可从Peptech (Burlington,MA)商购获得。或者,可根据标准方法来制备含炔基的氨基酸。举例来说,例如可如Deiters,A.等,J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783 (2003) 中所描述的那样合成对炔丙基氧基苯丙氨酸,并且可如Kayser,B.等,Tetrahedron 53(7):2475-2484 (1997) 中所描述的那样来合成4-炔基-L-苯丙氨酸。本领域普通技术人员可制备其它含炔基的氨基酸。

[0543] 示例性含叠氮基的氨基酸可如下表示:



[0545] 其中n为0-10;R₁为烷基、芳基、经取代烷基、经取代芳基或不存在;X为O、N、S或不存在;m为0-10;R₂为H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R₃为H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X不存在,m为0并且叠氮部分位于烷基侧链的对位。在一些实施方案中,n为0-4并且R₁和X不存在,并且m=0。在一些实施方案中,n为1,R₁为苯基,X为O,m为2并且β-叠氮基乙氧基部分位于相对于烷基侧链的对位。

[0546] 含叠氮基的氨基酸可获自商业来源。举例来说,4-叠氮基苯丙氨酸可获自Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL)。对于无法商购获得的含叠氮基的氨基酸,可相对容易地使用本领域普通技术人员已知的标准方法来制备叠氮基,所述方法包括但不限于通过置换合适的离去基团(包括但不限于卤离子、甲磺酸根、甲苯磺酸根)或通过打开经适当保护的內酯。参见例如 March, Advanced Organic Chemistry (第3版, 1985, Wiley and Sons, New York)。

[0547] E. 氨基硫醇反应性基团

[0548] β取代的氨基硫醇官能团的独特反应性使它们对于通过形成噻唑烷来选择性修饰含有醛基的多肽和其它生物分子极为有用。参见例如 J. Shao 和 J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899。在一些实施方案中,β取代的氨基硫醇氨基酸可掺入到松弛素多肽中并且随后与包含醛官能团的水溶性聚合物反应。在一些实施方案中,

水溶性聚合物、药物缀合物或其它有效负载可通过形成噻唑烷而与包含 β 取代的氨基硫醇氨基酸的松弛素多肽偶联。

[0549] F. 另外的反应性基团

[0550] 以下专利申请中描述了可掺入到本发明中的松弛素多肽中的另外的反应性基团和非天然编码氨基酸(包括但不限于对氨基-苯丙氨酸),所述专利申请都以引用的方式完整地并入本文:美国专利公布第2006/0194256号;美国专利公布第2006/0217532号;美国专利公布第2006/0217289号;美国临时专利第60/755,338号;美国临时专利第60/755,711号;美国临时专利第60/755,018号;国际专利申请第PCT/US06/49397号;WO 2006/069246;美国临时专利第60/743,041号;美国临时专利第60/743,040号;国际专利申请第PCT/US06/47822号;美国临时专利第60/882,819号;美国临时专利第60/882,500号;以及美国临时专利第60/870,594号。这些申请还论述了可存在于PEG或其它聚合物上的反应性基团,包括但不限于缀合用羟胺基(氨氧基)。

[0551] 非天然氨基酸的细胞摄取

[0552] 细胞对非天然氨基酸的摄取为设计并选择(包括但不限于)用于掺入到蛋白质中的非天然氨基酸时通常考虑的一个问题。例如, α -氨基酸的高电荷密度揭示这些化合物不可能为细胞可渗透的。天然氨基酸经由基于蛋白质的转运系统的集合而被吸收到真核细胞中。可进行快速筛选以评估哪些非天然氨基酸(如果存在)是由细胞吸收。例如参见例如标题为“Protein Arrays”的美国专利公布第US 2004/0198637号(其以引用的方式并入本文)以及Liu, D. R. & Schultz, P. G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785中的毒性测定法。尽管容易利用各种测定分析摄取,但设计适用于细胞摄取途径的非天然氨基酸的替代方案是提供在活体内产生氨基酸的生物合成途径。

[0553] 非天然氨基酸的生物合成

[0554] 许多生物合成途径已存在于细胞中以用于产生氨基酸和其它化合物。自然界(包括但不限于细胞)中可能不存在特定非天然氨基酸的生物合成方法,但本发明提供了此类方法。例如,任选地通过添加新酶或改变现有宿主细胞途径而在宿主细胞中产生非天然氨基酸的生物合成途径。另外的新酶任选地为天然存在的酶或人工开发的酶。例如,对氨基苯丙氨酸的生物合成(如在标题为“In vivo incorporation of unnatural amino acids”的WO 2002/085923中的实例中所阐述)依赖于来自其它生物体的已知酶的组合的加入。可通过利用包含这些酶的基因的质粒转化细胞而将所述基因引入真核细胞中。当在细胞中被表达时,所述基因提供了合成所需化合物的酶促途径。任选地添加的酶类型的实例提供于下文实例中。另外的酶序列可见于例如Genbank中。人工开发的酶也任选地以相同方式添加到细胞中。以此方式操纵细胞的细胞机构和资源以产生非天然氨基酸。

[0555] 多种方法可用于产生用于生物合成途径中或用于发展现有途径的新颖酶。例如,任选地使用包括但不限于如Maxygen Inc. (可通过万维网在 maxygen.com上获得)所开发的递归重组来开发新颖酶和途径。参见例如 Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNASHuffling, Nature 370 (4):389-391;以及Stemmer, (1994), DNASHuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751。类似地,任选地

将Genencor (可通过万维网在 genencor.com上获得) 所开发的DesignPath™用于代谢途径工程改造,包括但不限于工程改造在细胞中产生O-甲基-L-酪氨酸的途径。这项技术使用新基因(包括但不限于经由功能基因组学以及分子进化和设计所鉴定的基因) 的组合在宿主生物体中重建现有途径。Diversa公司(可通过万维网在diversa.com上获得) 还提供了快速筛选基因文库和基因途径从而包括但不限于建立新途径的技术。

[0556] 通常,由本发明的工程改造化生物合成途径产生的非天然氨基酸是以足以进行有效蛋白质生物合成(包括但不限于天然细胞量),但未达到影响其它氨基酸的浓度或耗尽细胞资源的程度的浓度产生。以这种方式在活体内产生的典型浓度为约10mM至约0.05mM。在利用包含用于产生特定途径所需的酶的基因的质粒转化细胞并产生非天然氨基酸后,任选地使用活体内选择以针对核糖体蛋白质合成和细胞生长进一步优化非天然氨基酸的产生。

[0557] 具有非天然氨基酸的多肽

[0558] 可出于多种目的掺入非天然氨基酸,所述目的包括但不限于调整蛋白质结构和/或功能的变化;改变尺寸、酸度、亲核性、氢键合、疏水性、蛋白酶标靶位点的可接近性;靶向部分(包括但不限于针对蛋白质阵列);添加生物活性分子;连接聚合物;连接放射性核素;调节血清半衰期;调节组织渗透(例如肿瘤);调节主动转运;调节组织、细胞或器官特异性或分布;调节免疫原性;调节蛋白酶抗性等。包括非天然氨基酸的蛋白质可具有增强或甚至全新的催化或生物物理性质。例如,任选地通过在蛋白质中引入非天然氨基酸来改良以下性质:毒性、生物分布、结构性质、光谱性质、化学和/或光化学性质、催化能力、半衰期(包括但不限于血清半衰期)、与其它分子反应的能力(包括但不限于共价或非共价反应)等。包括包含至少一种非天然氨基酸的蛋白质的组合物对于(包括但不限于)新颖治疗剂、诊断剂、催化酶、工业酶、结合蛋白(包括但不限于抗体)以及(包括但不限于)蛋白质结构和功能研究有用。参见例如Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652。

[0559] 在本发明的一方面,组合物包括至少一种具有至少一种(包括但不限于至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种或更多种)非天然氨基酸的蛋白质。非天然氨基酸可相同或不同,包括但不限于在蛋白质中可存在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个不同位点,其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种或更多种不同的非天然氨基酸。在另一方面,组合物包括蛋白质中所存在的至少一种但少于全部的特定氨基酸被非天然氨基酸取代的蛋白质。对于具有一种以上非天然氨基酸的给定蛋白质来说,非天然氨基酸可相同或不同(包括但不限于所述蛋白质可包括两种或更多种不同类型的非天然氨基酸,或者可包括两种相同类型的非天然氨基酸)。对于具有两种以上非天然氨基酸的给定蛋白质来说,非天然氨基酸可相同、不同或为相同种类的多种非天然氨基酸与至少一种不同种类的非天然氨基酸的组合。

[0560] 感兴趣的具有至少一种非天然氨基酸的蛋白质或多肽是本发明的特征。本发明还包括使用本发明组合物和方法产生的具有至少一种非天然氨基酸的多肽或蛋白质。赋形剂(包括但不限于药学上可接受的赋形剂)也可与蛋白质一起存在。

[0561] 通过在真核细胞中利用至少一种非天然氨基酸来产生感兴趣的蛋白质或多肽,蛋白质或多肽通常将包括真核生物翻译后修饰。在某些实施方案中,蛋白质包括至少一种非天然氨基酸和至少一种由真核细胞在活体内进行的翻译后修饰,其中原核细胞不进行所述

翻译后修饰。例如,所述翻译后修饰包括(包括但不限于)乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸盐加成、磷酸化、糖脂键修饰、糖基化等。在一方面,所述翻译后修饰包括通过GlcNAc-天冬酰胺键使寡糖(包括但不限于(GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc))与天冬酰胺连接。参见表1,其列出真核生物蛋白的N-连接寡糖的一些实例(也可存在其它未示出的残基)。在另一方面,所述翻译后修饰包括通过GalNAc-丝氨酸或GalNAc-苏氨酸键或GlcNAc-丝氨酸或GlcNAc-苏氨酸键使寡糖(包括但不限于Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc等)与丝氨酸或苏氨酸连接。

[0562] 表1:通过GLCNAC键连接的寡糖的实例

型式	基本構造
高糖型多糖	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \quad \diagup \quad \diagdown \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
中糖型	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
低糖型	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $
木糖	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \quad \diagup \quad \diagdown \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} $

[0564] 在又一方面,翻译后修饰包括前体(包括但不限于降血钙素前体、降血钙素基因相关肽前体、前甲状旁腺原激素(preparathyroid hormone)、前胰岛素原、胰岛素原、前阿黑皮素原(preproopiomelanocortin)、阿黑皮素原等)的蛋白水解加工,组装成多亚单位蛋白或大分子组装物,翻译到细胞中的另一位点中(包括但不限于翻译到诸如内质网、高尔基体(Golgi apparatus)、核、溶酶体、过氧化物酶体、线粒体、叶绿体、液泡等细胞器中,或通过分泌途径)。在某些实施方案中,蛋白质包含分泌或定位序列、表位标签、FLAG 标签、聚组氨酸标签、GST融合体等。

[0565] 非天然氨基酸的一个优点在于,它提供了可用于添加另外的分子的另外的化学部分。这些修饰可在真核细胞或非真核细胞中活体内进行或在活体外进行。因此,在某些实施方案中,翻译后修饰是通过非天然氨基酸进行。例如,翻译后修饰可通过亲核-亲电子反应进行。目前用于蛋白质的选择性修饰的大多数反应涉及亲核与亲电子反应搭配物之间的共价键形成,包括但不限于 α -卤代酮与组氨酸或半胱氨酸侧链的反应。在这些情况下,选择性是由蛋白质中亲核残基的数目和可接近性决定。在本发明的蛋白质中,可在活体外及活体内使用其它选择性更大的反应,例如非天然酮基氨基酸与酰肼或氨基基化合物的反应。参

见例如Cornish等, (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal等, (1997) Science, 276: 1125-1128; Wang等, (2001) Science 292:498-500; Chin等, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027; Chin 等, (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang等, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang等, (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; 以及 Chin等, (2003) Science, 301:964-7, 所述文献都以引用的方式并入本文。这允许用包括荧光团、交联剂、糖类衍生物和细胞毒性分子的大量试剂选择性标记几乎任何蛋白质。还参见标题为“Glycoprotein synthesis”的美国专利第 6,927,042号, 其以引用的方式并入本文。包括但不限于通过叠氮基氨基酸进行的翻译后修饰也可通过施陶丁格连接反应 (Staudinger ligation) (包括但不限于用三芳基膦试剂) 进行。参见例如Kiick等, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24。

[0566] 本发明提供了选择性修饰蛋白质的另一种高度有效的方法, 其涉及响应于选择密码子而将非天然氨基酸遗传掺入到蛋白质中, 所述非天然氨基酸包括但不限于含有叠氮基或炔基部分的非天然氨基酸。然后, 可通过 (包括但不限于) 休斯根 [3+2] 环加成反应 (例如参见Padwa, A., Comprehensive Organic Synthesis, 第4卷, (1991) Trost, B.M. 编, Pergamon, Oxford, 第1069-1109 页; 和Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Padwa, A. 编, Wiley, New York, 第1-176页), 分别用 (包括但不限于) 炔基或叠氮基衍生物来修饰这些氨基酸侧链。因为这种方法涉及环加成而非亲核取代, 所以可以极高的选择性修饰蛋白质。可在室温下在水性条件下通过向反应混合物中添加催化量的Cu (I) 盐来以优异的区域选择性 (1,4>1,5) 进行这个反应。参见例如Tornoe等, (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; 以及Rostovtsev等, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599。可使用的另一方法为在双砷化合物上用四半胱氨酸基元进行配体交换, 参见例如Griffin等, (1998) Science 281:269-272。

[0567] 可通过[3+2]环加成而加成到本发明蛋白质上的分子包括具有叠氮基或炔基衍生物的几乎任何分子。分子包括但不限于染料、荧光团、交联剂、糖类衍生物、聚合物 (包括但不限于聚乙二醇的衍生物)、光交联剂、细胞毒性化合物、亲和性标记、生物素衍生物、树脂、珠粒、第二蛋白质或多肽 (或更多)、一种 (多种) 多核苷酸 (包括但不限于DNA、RNA等)、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物等。这些分子可分别加成到具有炔基的非天然氨基酸 (包括但不限于对炔丙基氧基苯丙氨酸) 或具有叠氮基的非天然氨基酸 (包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸) 上。

[0568] 包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽的活体内产生

[0569] 可使用经修饰tRNA和tRNA合成酶在活体内产生本发明的松弛素多肽, 以添加无法在天然存在的系统中编码的氨基酸或用所述氨基酸取代。

[0570] 使用天然存在的系统中无法编码的氨基酸产生tRNA和tRNA合成酶的方法描述于例如美国专利第7,045,337号和第7,083,970号中, 所述专利以引用的方式并入本文。这些方法涉及产生独立于翻译系统的内源性合成酶和 tRNA起作用 (且因此有时被称作“正交”) 的翻译机构。通常, 翻译系统包含正交tRNA (O-tRNA) 以及正交氨酰基tRNA合成酶 (O-RS)。通常, O-RS在翻译系统中优先利用至少一种非天然存在的氨基酸使O-tRNA氨酰化, 并且 O-tRNA识别至少一个不被系统中的其它tRNA识别的选择密码子。因此, 翻译系统响应于经编

码的选择密码子而将非天然编码氨基酸插入到系统所产生的蛋白质中,从而“将”氨基酸“取代”到编码多肽的某一位置中。

[0571] 本领域中已描述用于将特定合成氨基酸插入到多肽中的多种正交tRNA 和氨酰基tRNA合成酶,它们一般适用于本发明。例如,酮基特异性O-tRNA/ 氨酰基-tRNA合成酶描述于Wang,L.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA100:56-61 (2003)以及Zhang,Z.等,Biochem.42(22):6735-6746(2003)中。示例性O-RS 或其部分是由多核苷酸序列编码并且包括美国专利第7,045,337号和第7,083,970号中所公开的氨基酸序列,所述专利均以引用的方式并入本文。与O-RS一起使用的相应O-tRNA分子也描述于美国专利第7,045,337号和第7,083,970号中,所述专利以引用的方式并入本文。O-tRNA/氨酰基-tRNA 合成酶对的另外的实例描述于WO 2005/007870、WO 2005/007624和WO 2005/019415中。

[0572] 叠氮基特异性O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶系统的实例描述于Chin,J. W.等,J,Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002)中。对叠氮基-L-Phe的示例性O-RS序列包括但不限于如美国专利第7,083,970号(其以引用的方式并入本文)中所公开的核苷酸序列SEQ ID NO:14-16和29-32以及氨基酸序列SEQ ID NO:46-48和61-64。适用于本发明的示例性O-tRNA序列包括但不限于如美国专利第7,083,970号(其以引用的方式并入本文)中所公开的核苷酸序列SEQ IDNO:1-3。对特定非天然编码氨基酸具有特异性的O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对的其它实例描述于美国专利第7,045,337号(其以引用的方式并入本文)中。在酿酒酵母中掺入含酮基氨基酸与含叠氮基氨基酸的O-RS 和O-tRNA描述于Chin,J.W.等,Science 301:964-967(2003)中。

[0573] 已报道数种其它正交对。已描述用于将非天然氨基酸潜在地掺入到大肠杆菌中的来源于酿酒酵母tRNA和合成酶的谷氨酰胺酰基(参见例如Liu,D. R.和Schultz,P.G.(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96:4780-4785)、天冬氨酰基(参见例如Pastrnak,M.等,(2000)Helv.Chim.Acta 83:2277-2286)和酪氨酰基(参见例如Ohno,S.等,(1998)J.Biochem.(Tokyo,Jpn.)124:1065-1068;以及Kowal,A.K.等,(2001)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:2268-2273)系统。已描述用于酿酒酵母的来源于大肠杆菌谷氨酰胺酰基(参见例如Kowal,A.K.等,(2001)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:2268-2273)和酪氨酰基(参见例如Edwards,H.和Schimmel,P.(1990)Mol.Cell.Biol.10:1633-1641)合成酶的系统。大肠杆菌酪氨酰基系统已用于在哺乳动物细胞中活体内掺入3- 碘-L-酪氨酸。参见Sakamoto.K.等,(2002)Nucleic Acids Res.30:4692-4699。

[0574] O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的使用涉及选择编码非天然编码氨基酸的特定密码子。尽管可使用任何密码子,但一般希望选择在表达O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的细胞中很少或从未使用的密码子。例如,示例性密码子包括无义密码子如终止密码子(琥珀、赭石和蛋白石)、四个或更多个碱基的密码子以及很少使用或未使用过的其它天然三碱基密码子。

[0575] 可使用本领域中已知的诱变方法(包括但不限于位点特异性诱变、盒式诱变、限制选择诱变等)将一个(多个)特定的选择密码子引入到松弛素多核苷酸编码序列的适当位置中。

[0576] 用于产生可用于掺入非天然编码氨基酸的蛋白质生物合成机构的组分如O-RS、O-tRNA及正交O-tRNA/O-RS对的方法描述于Wang,L.等,Science 292:498-500(2001);Chin,

J.W.等, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z.等, Biochemistry 42:6735-6746 (2003) 中。用于活体内掺入非天然编码氨基酸的方法和组合物描述于美国专利第7,045,337号中,所述专利以引用的方式并入本文。用于选择用于生物体的活体内翻译系统中的正交tRNA-tRNA合成酶对的方法也描述于美国专利第7,045,337号和美国专利第7,083,970号中,所述专利以引用的方式并入本文。标题为“Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins,”的PCT公布第W0 04/035743号(其以引用的方式完整地并入本文)描述了用于掺入酮基氨基酸的正交RS和tRNA对。标题为“Expanding the Eukaryotic Genetic Code”的PCT公布第W0 04/094593号(其以引用的方式完整地并入本文)描述了在真核宿主细胞中掺入非天然编码氨基酸的正交RS和tRNA对。

[0577] 用于产生至少一种重组正交氨酰基-tRNA合成酶(O-RS)的方法包括:(a)从第一生物体产生来源于至少一种氨酰基-tRNA合成酶(RS)的(任选突变)RS的文库,所述第一生物体包括但不限于原核生物体,如詹氏甲烷球菌、嗜热自养甲烷杆菌、嗜盐菌、大肠杆菌、嗜嗜热古菌、强烈炽热球菌、极端嗜热古菌、嗜热泉生古细菌、极端嗜热菌(*T. thermophilus*)等;或真核生物体;(b)在RS(任选突变的RS)的文库中选择(和/或筛选)在存在非天然编码氨基酸和天然氨基酸的情况下使正交tRNA(O-tRNA)氨酰基化的成员,从而提供活性(任选突变)RS的池;和/或(c)在所述池中选择(任选地通过阴性选择来选择)在不存在非天然编码氨基酸的情况下优先使O-tRNA氨酰基化的活性RS(包括但不限于突变RS),从而提供至少一种重组O-RS;其中所述至少一种重组O-RS利用非天然编码氨基酸优先使O-tRNA氨酰化。

[0578] 在一种实施方案中,RS为非活性RS。非活性RS可通过使活性RS突变而产生。例如,可通过使至少约1种、至少约2种、至少约3种、至少约4种、至少约5种、至少约6种或至少约10种或更多种氨基酸突变为不同氨基酸(包括但不限于丙氨酸)来产生非活性RS。

[0579] 可使用本领域中已知的各种技术来产生突变RS的文库,所述技术包括但不限于基于蛋白质三维RS结构的合理设计,或在随机或合理设计技术中RS核苷酸的诱变。例如,可通过位点特异性突变、随机突变、产生多样性的重组突变、嵌合构建体、合理设计以及通过本文描述或本领域中已知的其它方法产生突变RS。

[0580] 在一个实施方案中,在RS(任选突变RS)的文库中选择(和/或筛选)(包括但不限于)在存在非天然编码氨基酸和天然氨基酸的情况下使正交tRNA(O-tRNA)氨酰基化的活性成员包括:将阳性选择或筛选标记(包括但不限于抗生素抗性基因等)和(任选突变)RS的文库引入到多个细胞中,其中阳性选择和/或筛选标记包含至少一个选择密码子(包括但不限于琥珀、赭石或蛋白石密码子);使所述多个细胞在存在选择剂的情况下生长;通过抑制阳性选择或筛选标记中的至少一个选择密码子来鉴定在存在选择剂和/或筛选剂的情况下存活(或显示出特异性反应)的细胞,从而提供含有活性(任选突变)RS的池的经阳性选择细胞的子集。任选地,可改变选择剂和/或筛选剂浓度。

[0581] 在一方面,阳性选择标记为氯霉素(chloramphenicol)乙酰基转移酶(CAT)基因,并且在CAT基因中,选择密码子为琥珀终止密码子。任选地,阳性选择标记为 β -内酰胺酶基因,并且在 β -内酰胺酶基因中,选择密码子为琥珀终止密码子。在另一方面,阳性筛选标记包含荧光或发光筛选标记或基于亲和性的筛选标记(包括但不限于细胞表面标记)。

[0582] 在一个实施方案中,在池中阴性选择或筛选在不存在非天然编码氨基酸的情况下优先使O-tRNA氨酰基化的活性RS(任选地突变体)包括:将阴性选择或筛选标记与来自阳性

选择或筛选的活性(任选突变)RS的池引入到第二生物体的多个细胞中,其中阴性选择或筛选标记包含至少一个选择密码子(包括但不限于抗生素抗性基因,其包括但不限于氯霉素乙酰基转移酶(CAT)基因);以及鉴定在补充有非天然编码氨基酸和筛选剂或选择剂的第一培养基中存活或显示出特异性筛选反应、但在未补充非天然编码氨基酸和选择剂或筛选剂的第二培养基中不能存活或显示出特异性反应的细胞,从而提供具有至少一种重组O-RS的存活细胞或筛选细胞。例如,CAT鉴定方案在适当O-RS重组体的确定中任选地充当阳性选择和/或阴性筛选。举例来说,任选地在存在或不存在一种或多种非天然编码氨基酸的情况下在含有CAT(其包含至少一个选择密码子)的生长板上复制克隆池。因此,认为仅在含有非天然编码氨基酸的平板上生长的菌落含有重组O-RS。在一方面,改变选择(和/或筛选)剂的浓度。在一些方面中,第一生物体与第二生物体不同。因此,第一生物体和/或第二生物体任选地包含:原核生物、真核生物、哺乳动物、大肠杆菌、真菌、酵母、古细菌(archaebacterium)、真细菌(eubacterium)、植物、昆虫、原生生物等。在其它实施方案中,筛选标记包含荧光或发光筛选标记或基于亲和性的筛选标记。

[0583] 在另一个实施方案中,在池中筛选或选择(包括但不限于阴性选择)活性(任选突变)RS包括:从阳性选择步骤(b)分离活性突变RS的池;将阴性选择或筛选标记和活性(任选突变)RS的池引入到第二生物体的多个细胞中,其中阴性选择或筛选标记包含至少一个选择密码子(包括但不限于包含至少一个选择密码子的毒性标记基因,其包括但不限于核糖核酸酶barnase基因);以及鉴定在未补充非天然编码氨基酸的第一培养基中存活或显示出特异性筛选反应、但在补充有非天然编码氨基酸的第二培养基中不能存活或显示出特异性筛选反应的细胞,从而提供具有至少一种重组O-RS的存活细胞或筛选细胞,其中所述至少一种重组O-RS对非天然编码氨基酸具特异性。在一方面,所述至少一个选择密码子包含约两个或更多个选择密码子。此类实施方案任选地可包括其中所述至少一个选择密码子包含两个或更多个选择密码子的情形,以及其中第一生物体与第二生物体不同(包括但不限于每个生物体任选地为(包括但不限于)原核生物、真核生物、哺乳动物、大肠杆菌、真菌、酵母、古细菌、真细菌、植物、昆虫、原生生物等)的情形。另外,一些方面包括其中阴性选择标记包含核糖核酸酶barnase基因(其包含至少一个选择密码子)的情形。其它方面包括其中筛选标记任选地包含荧光或发光筛选标记或基于亲和性的筛选标记的情形。在本文中的实施方案中,筛选和/或选择任选地包括筛选和/或选择严格度的变化。

[0584] 在一个实施方案中,用于产生至少一种重组正交氨酰基-tRNA合成酶(O-RS)的方法可进一步包括:(d)分离所述至少一种重组O-RS;(e)产生来源于所述至少一种重组O-RS的第二组O-RS(任选突变的);以及(f)重复步骤(b)和(c),直到获得包含优先使O-tRNA氨酰基化的能力的突变O-RS。任选地,将步骤(d)-(f)重复(包括但不限于)至少约两次。在一方面,可通过诱变(包括但不限于随机诱变、位点特异性诱变、重组或其组合)产生来源于至少一种重组O-RS的第二组突变O-RS。

[0585] 在上述方法中,选择/筛选步骤(包括但不限于阳性选择/筛选步骤(b)、阴性选择/筛选步骤(c)或阳性与阴性选择/筛选步骤(b)与(c))的严格度任选地包括改变选择/筛选严格度。在另一个实施方案中,阳性选择/筛选步骤(b)、阴性选择/筛选步骤(c)或阳性与阴性选择/筛选步骤(b)与(c)包括使用报告基因,其中报告基因利用荧光激活细胞分类(FACS)检测或者其中报告基因利用发光检测。任选地,报告基因展示在细胞表面、噬菌体展

示等上,并且根据涉及非天然编码氨基酸或类似物的亲和性或催化活性加以选择。在一个实施方案中,突变合成酶展示在细胞表面、噬菌体展示等上。

[0586] 用于产生重组正交tRNA (O-tRNA) 的方法包括:(a) 从第一生物体产生来源于至少一种tRNA (包括但不限于抑制因子tRNA) 的突变tRNA文库;(b) 在所述文库中选择(包括但不限于阴性选择)或筛选在不存在来自第一生物体的RS的情况下由来自第二生物体的氨酰基-tRNA合成酶(RS)氨酰基化的(任选突变的)tRNA,从而提供tRNA(任选地突变体)的池;以及(c) 在所述tRNA(任选地突变体)池中选择或筛选由所引入的正交RS(O-RS)氨酰基化的成员,从而提供至少一种重组O-tRNA;其中所述至少一种重组O-tRNA识别选择密码子并且无法由来自第二生物体的RS有效识别并且优先由O-RS氨酰基化。在一些实施方案中,所述至少一种tRNA为抑制因子tRNA和/或包含具有天然和/或非天然碱基的独特三碱基密码子,或者为无义密码子、稀有密码子、非天然密码子、包含至少4个碱基的密码子、琥珀密码子、赭石密码子或蛋白石终止密码子。在一个实施方案中,重组O-tRNA具有正交性的改进。应了解在一些实施方案中,O-tRNA无需修饰而任选地从第二生物体被导入到第一生物体中。在各种实施方案中,第一生物体与第二生物体相同或不同,并且任选地选自(包括但不限于)原核生物(包括但不限于詹氏甲烷球菌、嗜热自养甲烷杆菌、大肠杆菌、嗜盐菌等)、真核生物、哺乳动物、真菌、酵母、古细菌、真细菌、植物、昆虫、原生生物等。另外,重组tRNA任选地由非天然编码氨基酸氨酰基化,其中非天然编码氨基酸是在活体内天然地生物合成的或通过基因操纵生物合成的。任选地将非天然编码氨基酸添加到至少第一生物体或第二生物体的生长培养基中。

[0587] 在一方面,在所述文库中选择(包括但不限于阴性选择)或筛选由氨酰基-tRNA合成酶氨酰基化的(任选突变的)tRNA(步骤(b))包括:将毒性标记基因和(任选突变的)tRNA文库引入到来自第二生物体的多个细胞中,其中毒性标记基因包含至少一个选择密码子(或导致产生毒性剂或抑制剂(static agent)的基因或生物体必需的基因,其中此类标记基因包含至少一个选择密码子);以及选择存活细胞,其中存活细胞含有包含至少一个正交tRNA或非功能性tRNA的(任选突变的)tRNA的池。例如,可通过使用比较比率细胞密度测定来选择存活细胞。

[0588] 在另一方面,毒性标记基因可包括两个或更多个选择密码子。在所述方法的另一个实施方案中,毒性标记基因为核糖核酸酶barnase基因,其中核糖核酸酶barnase基因包含至少一个琥珀密码子。任选地,核糖核酸酶barnase基因可包括两个或更多个琥珀密码子。

[0589] 在一个实施方案中,在(任选突变的)tRNA的池中选择或筛选由所引入的正交RS(O-RS)氨酰基化的成员可包括:将阳性选择或筛选标记基因以及O-RS和(任选突变的)tRNA的池引入到来自第二生物体的多个细胞中,其中阳性标记基因包含药物抗性基因(包括但不限于 β -内酰胺酶基因,其包含至少一个选择密码子,如至少一个琥珀终止密码子)或生物体必需的基因或使得毒性剂解毒的基因;以及鉴定在包括但不限于抗生素的选择剂或筛选剂的存在下生长的存活或筛选细胞,从而提供具有至少一种重组tRNA的细胞池,其中所述至少一种重组tRNA由O-RS氨酰基化并且响应于所述至少一个选择密码子而将氨基酸插入到由阳性标记基因编码的翻译产物中。在另一个实施方案中,改变选择剂和/或筛选剂的浓度。

[0590] 提供了用于产生特异性O-tRNA/O-RS对的方法。所述方法包括：(a) 由第一生物体产生来源于至少一种tRNA的突变tRNA的文库；(b) 在所述文库中阴性选择或筛选在不存在来自第一生物体的RS的情况下由来自第二生物体的氨酰基-tRNA合成酶(RS)氨酰基化的(任选突变的)tRNA,从而提供(任选突变的)tRNA池；(c) 在(任选突变的)tRNA池中选择或筛选由所引入的正交RS(O-RS)氨酰基化的成员,从而提供至少一种重组O-tRNA。所述至少一种重组O-tRNA识别选择密码子并且无法由来自第二生物体的RS有效识别并且优先由O-RS氨酰基化。所述方法还包括(d) 由第三生物体产生来源于至少一种氨酰基-tRNA合成酶(RS)的(任选突变的)RS的文库；(e) 在所述突变RS文库中选择或筛选在存在非天然编码氨基酸和天然氨基酸的情况下优先使所述至少一种重组O-tRNA氨酰基化的成员,从而提供活性(任选突变的)RS池；以及(f) 在所述池中阴性选择或筛选在不存在非天然编码氨基酸的情况下优先使所述至少一种重组O-tRNA氨酰基化的活性(任选突变的)RS,从而提供至少一个特异性O-tRNA/O-RS对,其中所述至少一个特异性O-tRNA/O-RS对包含至少一种对非天然编码氨基酸具有特异性的重组O-RS和所述至少一种重组O-tRNA。包括由所述方法产生的特异性O-tRNA/O-RS对。例如,特异性O-tRNA/O-RS对可包括(包括但不限于)mutRNATyr-mutTyrRS对如mutRNATyr-SS12TyrRS对、mutRNALeu-mutLeuRS对、mutRNAThr-mutThrRS对、mutRNAGlu-mutGluRS 对等。另外,此类方法包括其中第一与第三生物体相同(包括但不限于詹氏甲烷球菌)的情形。

[0591] 本发明中还包括选择用于第二生物体的活体内翻译系统中的正交 tRNA-tRNA合成酶对的方法。所述方法包括：将标记基因、tRNA和从第一生物体分离或获得的氨酰基-tRNA合成酶(RS)引入到来自第二生物体的第一组细胞中；将标记基因和tRNA引入到来自第二生物体的复制细胞组中；以及选择在复制细胞组中不能存活的第一组中的存活细胞或筛选显示特异性筛选反应但在复制细胞组中不能提供此种反应的细胞,其中第一组与复制细胞组是在存在选择剂或筛选剂的情况下生长,其中存活或筛选细胞包含用于第二生物体的活体内翻译系统中的正交tRNA-tRNA合成酶对。在一个实施方案中,比较和选择或筛选包括活体内互补测定。可改变选择剂或筛选剂的浓度。

[0592] 本发明生物体包含多种生物体和多种组合。例如,本发明方法的第一生物体与第二生物体可以相同或不同。在一个实施方案中,所述生物体任选地为原核生物体,包括但不限于詹氏甲烷球菌、嗜热自养甲烷杆菌、嗜盐菌、大肠杆菌、超嗜热古菌、强烈炽热球菌、极端嗜热古菌、嗜热泉生古细菌、极端嗜热菌等。或者,生物体任选地包含真核生物体,包括但不限于植物(包括但不限于复杂植物,如单子叶植物或双子叶植物)、藻类、原生生物、真菌(包括但不限于酵母等)、动物(包括但不限于哺乳动物、昆虫、节肢动物等)等。在另一个实施方案中,第二生物体为原核生物体,包括但不限于詹氏甲烷球菌、嗜热自养甲烷杆菌、嗜盐菌、大肠杆菌、超嗜热古菌、嗜盐菌、强烈炽热球菌、极端嗜热古菌、嗜热泉生古细菌、极端嗜热菌等。或者,第二生物体可以为真核生物体,包括但不限于酵母、动物细胞、植物细胞、真菌、哺乳动物细胞等。在各个实施方案中,第一生物体与第二生物体不同。

[0593] 非天然存在氨基酸在松弛素多肽中的位置

[0594] 本发明考虑到将一种或多种非天然存在氨基酸掺入到松弛素多肽中。可将一种或多种非天然存在氨基酸掺入到特定位置处而不破坏多肽活性。这可通过进行“保守”取代来实现,所述取代包括但不限于用疏水性氨基酸取代疏水性氨基酸、用庞大氨基酸取代庞大

氨基酸、用亲水性氨基酸取代亲水性氨基酸和/或在活性不需要的位置中插入非天然存在氨基酸。

[0595] 可使用多种生物化学和结构方法来选择胰岛素多肽内供非天然编码氨基酸取代所需的位点。对于本领域普通技术人员显而易见,多肽链的任何位置都适于选择以掺入非天然编码氨基酸,并且选择可基于合理设计或通过随机选择来进行以实现任何目的或无特定需要的目的。所需位点的选择可用于产生具有任何所需性质或活性的松弛素分子(包括但不限于激动剂、超激动剂、逆激动剂、拮抗剂、受体结合调节剂、受体活性调节剂)、二聚物或多聚物形成、与天然分子相比不改变活性或性质,或操纵多肽的任何物理或化学性质如溶解性、聚集或稳定性。例如,可使用本领域中已知的点突变分析、丙氨酸扫描、饱和诱变和生物活性筛选或同源物扫描方法来鉴定多肽中为松弛素多肽的生物活性所需的位置。可使用其它方法鉴定用于修饰松弛素多肽的残基,包括但不限于序列分析(sequence profiling) (Bowie和Eisenberg, Science 253 (5016):164-70, (1991))、旋转异构体文库选择(Dahiyat和Mayo, Protein Sci 5 (5):895-903 (1996); Dahiyat和Mayo, Science 278 (5335):82-7 (1997); Desjarlais和Handel, Protein Science 4:2006-2018 (1995); Harbury等, PNAS USA92 (18):8408-8412 (1995); Kono等, Proteins: Structure, Function and Genetics 19:244-255 (1994); Hellinga和Richards, PNAS USA91:5803- 5807 (1994)); 和残基对势(residue pair potential) (Jones, Protein Science 3: 567-574, (1994)), 以及使用Protein DesignAutomation®技术的合理设计。(参见美国专利第6,188,965号、第6,269,312号、第6,403,312号、第W098/47089 号,其以引用的方式并入本文)。对松弛素生物活性至关重要的残基、与药物稳定性有关的残基、抗体表位或受体结合残基可发生突变。美国专利第 5,580,723号、第5,834,250号、第6,013,478号、第6,428,954号和第6,451,561 号(其以引用的方式并入本文)描述了通过用标靶物质鉴定影响多肽活性的活性结构域来系统分析多肽如松弛素的结构和功能的方法。除由丙氨酸或同源物扫描诱变鉴定为对生物活性至关重要的残基以外的残基可视多肽所追求的所需活性而为供非天然编码氨基酸取代的良好候选者。或者,被鉴定为对生物活性至关重要的位点也可视多肽所追求的所需活性而为供非天然编码氨基酸取代的良好候选者。另一种替代方法将为在多肽链上的每个位置中利用非天然编码氨基酸简单地连续取代并且观察对多肽活性的影响。对于本领域普通技术人员显而易见,在任何多肽中选择供非天然氨基酸取代的位置的任何方式、技术或方法都适用于本发明中。

[0596] 也可检查含有缺失的松弛素多肽的突变体的结构和活性以确定可能允许用非天然编码氨基酸进行取代的蛋白质区。可以类似方式使用蛋白酶消化和单克隆抗体来鉴定负责结合松弛素受体的松弛素区。在排除可能不允许被非天然编码氨基酸取代的残基后,可检查所提出的取代在每个剩余位置处的影响。可根据其它松弛素家族成员和松弛素受体的三维晶体结构产生模型。蛋白质数据库(PDB,通过万维网在rcsb.org上获得)是含有蛋白质和核酸大分子的三维结构数据的集中数据库。如果无法获得三维结构数据,那么可建立模型来研究多肽的二级和三级结构。因此,本领域普通技术人员可容易地鉴定可被非天然编码氨基酸取代的氨基酸位置。

[0597]

数据表A续		复合氨基酸组成数据			氨基酸组成数据		
氨基酸名称	氨基酸序号	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值
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	0.588865
SER	4	2.039557	1.726208	2.666253	0.094701	0.127334	0.028435
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

[0598]

数据表B续		复合氨基酸组成数据			氨基酸组成数据		
氨基酸名称	氨基酸序号	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值	氨基酸平均值
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

[0599]

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

[0600] 在一些实施方案中,本发明松弛素多肽包含位于不破坏多肽的结构蛋白质区中的一种或多种非天然编码氨基酸。

[0601] 掺入非天然编码氨基酸的示例性残基可以为潜在受体结合区中不包括的残基,可以完全或部分暴露在溶剂中,与附近残基具有最小或无氢键合相互作用,可以最低程度地暴露于附近的反应性残基,可以位于一个或多个暴露面上,可以为一个或多个与第二松弛素或其它分子或其片段并列的位点,可以处于如根据与其受体结合或未结合或者与另一生物活性分子偶联或未偶联的松弛素的三维、二级、三级或四级结构所预测的高度柔性或结构呈刚性的区中,或者可以通过按需要改变完整结构的柔性或刚性来调节松弛素本身或包含一种或多种松弛素的二聚物或多聚物的构象。

[0602] 本领域普通技术人员认识到,此种松弛素分析使得能够确定哪些氨基酸残基相比于隐藏在蛋白质三级结构内的氨基酸残基来说是表面暴露的。因此,用非天然编码氨基酸取代作为表面暴露残基的氨基酸是本发明的一个实施方案。

[0603] 在一些实施方案中,将一种或多种非天然编码氨基酸掺入到松弛素的一个或多个以下位置处:A链中的位置1(即在N端)之前、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22(即在蛋白质的羧基端)和其任何组合(SEQ ID NO:1);或B链中的位置1(即在N端)之前、位置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(SEQ ID NO:2)。

[0604] 关于松弛素的晶体结构及其与松弛素受体的相互作用的研究可指示哪些特定氨基酸残基具有可完全或部分接近溶剂的侧链。这些位置处的非天然编码氨基酸侧链可远离蛋白质表面并进入溶剂中。

[0605] 在一些实施方案中,一个或多个以下位置处的非天然编码氨基酸与水溶性聚合物连接,包括但不限于位置:A链中的位置1(即在N端)之前、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22(即在蛋白质的羧基端)和其任何组合(SEQ ID NO:1);或B链中的位置1(即在N端)之前、位置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 (SEQ ID NO:2)。

[0606] 可用多种非天然编码氨基酸取代松弛素多肽中的给定位置,或可将多种非天然编码氨基酸掺入到松弛素多肽中的给定位置中。一般而言,根据对松弛素多肽或其它松弛素家族成员或松弛素类似物与其受体的三维晶体结构的研究来选择供掺入的特定非天然编码氨基酸,其中优选保守取代(即,用基于芳基的非天然编码氨基酸如对乙酰基苯丙氨酸或O-炔丙基酪氨酸取代 Phe、Tyr或Trp)以及希望引入到松弛素多肽中的特异性结合化学(例如,如果需要利用具有炔部分的水溶性聚合物来实现休根斯[3+2]环加成,或者需要利用具有继而掺入膦部分的芳基酯的水溶性聚合物来形成酰胺键,那么引入4-叠氮基苯丙氨酸)。

[0607] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括将非天然氨基酸掺入到蛋白质中,其中所述非天然氨基酸包含第一反应性基团;以及使蛋白质与包含第二反应性基团的分子(包括但不限于标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和性标记、光亲和性标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖官能团、与其它分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化部分、光化辐射可激发的部分、可光致异构化部分、生物素、生物素衍生物、生物素类似物、掺有重原子的部分、可化学裂解的基团、可光裂解的基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性部分、经同位素标记的部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测标记、小分子、量子点、纳米传递素、放射性核苷酸、放射性传递素、中子俘获剂或上述物质的任何组合,或任何其它所需化合物或物质)接触。第一反应性基团与第二反应性基团反应从而使所述分子通过[3+2]环加成与非天然氨基酸连接。在一个实施方案中,第一反应性基团为炔基或叠氮部分,并且第二反应性基团为叠氮基或炔基部分。例如,第一反应性基团为炔基部分(包括但不限于在非天然氨基酸对炔丙基氧基苯丙氨酸中)并且第二反应性基团为叠氮部分。在另一个实例中,第一反应性基团为叠氮部分(包括但不限于在非天然氨基酸对叠氮基-L-苯丙氨酸中)并且第二反应性基团为炔基部分。

[0608] 在一些情况下,将一个(多个)非天然编码氨基酸取代与松弛素多肽内的其它添加、取代或缺失组合以影响松弛素多肽的其它生物性状。在一些情况下,其它添加、取代或缺失可增加松弛素多肽的稳定性(包括但不限于对蛋白水解降解的抗性)或增加松弛素多肽对其受体的亲和性。在一些情况下,其它添加、取代或缺失可增加松弛素多肽的药物稳定性。在一些情况下,其它添加、取代或缺失可增强松弛素多肽的抗病毒活性。在一些情况下,其它添加、取代或缺失可增加松弛素多肽的溶解性(包括但不限于在大肠杆菌或其它宿主细胞中表达时)。在一些实施方案中,添加、取代或缺失可增加松弛素多肽在大肠杆菌或其它重组宿主细胞中表达之后的溶解性。在一些实施方案中,除掺入非天然氨基酸的位点外还选择另一些位点以供天然编码或非天然氨基酸取代,其使得在大肠杆菌或其它重组宿主细胞中表达后多肽溶解性增加。在一些实施方案中,松弛素多肽包含另一个添加、取代或缺失,其调节对松弛素多肽受体、结合蛋白或缔合配体的亲和性,调节与松弛素受体结合后的信号转导,调节循环半衰期,调节释放或生物可利用性,促进纯化,或者改进或改变特定施

用途。在一些实施方案中,松弛素多肽包含增加松弛素变异体对其受体的亲和性的添加、取代或缺失。类似地,松弛素多肽可包含改进多肽的检测(包括但不限于GFP)、纯化、通过组织或细胞膜的转运、前药释放或活化、松弛素尺寸减小或其它性状的化学或酶裂解序列、蛋白酶裂解序列、反应性基团、抗体结合结构域(包括但不限于FLAG或poly-His)或其它基于亲和性的序列(包括但不限于FLAG、poly-His、GST 等)或连接分子(包括但不限于生物素)。

[0609] 在一些实施方案中,非天然编码氨基酸的取代产生松弛素拮抗剂。在一些实施方案中,在与受体结合有关的区中取代或添加非天然编码氨基酸。在一些实施方案中,松弛素拮抗剂包含至少一个使松弛素充当拮抗剂的取代。在一些实施方案中,松弛素拮抗剂包含与水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸,其存在于松弛素分子的受体结合区中。

[0610] 在一些情况下,用一种或多种非天然编码氨基酸取代1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种氨基酸。在一些情况下,松弛素多肽进一步包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个用一种或多种非天然编码氨基酸对天然存在氨基酸的取代。例如,在一些实施方案中,用一种或多种非天然编码氨基酸取代松弛素中的一个或多个残基。在一些情况下,将一种或多种非天然编码残基与一种或多种较低分子量的线性或分支PEG连接,从而相对于与单一较高分子量PEG连接的物质增强结合亲和性并且具有相当的血清半衰期。

[0611] 在一些实施方案中,松弛素的以下残基中的至多两个残基被一种或多种非天然编码氨基酸取代。

[0612] 非真核细胞和真核细胞中的表达

[0613] 为了获得所克隆的松弛素多核苷酸的高水平表达,通常将编码本发明松弛素多肽的多核苷酸亚克隆到含有指导转录的强启动子、转录/翻译终止子以及(如果就编码蛋白质的核酸来说)供翻译启动用的核糖体结合位点的表达载体中。本领域普通技术人员已知合适的细菌启动子,并且其例如描述于Sambrook等以及Ausubel等中。

[0614] 用于表达本发明松弛素多肽的细菌表达系统可在(包括但不限于)大肠杆菌、芽孢杆菌属某个种(*Bacillus* sp.)、荧光假单胞菌、绿脓杆菌、恶臭假单胞菌和沙门氏菌(*Salmonella*)中获得(Palva等, *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach等, *Nature* 302:543-545 (1983))。用于此类表达系统的试剂盒可商购获得。本领域普通技术人员已知哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达系统,并且它们也可商购获得。在使用正交tRNA和氨酰基tRNA合成酶(上述)来表达本发明松弛素多肽的情况下,用于表达的宿主细胞是根据它们使用正交组分的能力进行选择的。示例性宿主细胞包括革兰氏阳性细菌(包括但不限于短芽孢杆菌(*B. brevis*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)或链霉菌(*Streptomyces*))和革兰氏阴性细菌(大肠杆菌、荧光假单胞菌、绿脓杆菌、恶臭假单胞菌),以及酵母和其它真核细胞。包含O-tRNA/O-RS对的细胞可如本文描述的那样使用。

[0615] 本发明真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供了合成较大有用量的包含非天然氨基酸的蛋白质的能力。在一方面,组合物任选地包括(包括但不限于)至少10微克、至少50微克、至少75微克、至少100微克、至少200 微克、至少250微克、至少500微克、至少1毫克、至少10毫克、至少100 毫克、至少1克或更多的包含非天然氨基酸的蛋白质,或可利用活体内蛋白质制备方法实现的量的所述蛋白质(关于重组蛋白生产和纯化的细节提供于本文中)。在另一方面,所述蛋白质任选地以在(包括但不限于)细胞裂解物、缓冲液、药物缓冲液或其它液体悬浮液中的(包括但不限于)每升至少 10微克蛋白质、每升至少50微克蛋白质、每升至

少75微克蛋白质、每升至少100微克蛋白质、每升至少200微克蛋白质、每升至少250微克蛋白质、每升至少500微克蛋白质、每升至少1毫克蛋白质或每升至少10毫克或更多蛋白质的浓度(包括但不限于以包括但不限于约1nL至约100L或更高体积中的任一体积的体积)存在于组合物中。在真核细胞中产生大量(包括但不限于大于用包括但不限于活体外翻译的其它方法通常可能获得的量)的包括至少一种非天然氨基酸的蛋白质是本发明的特征。

[0616] 本发明真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供了生物合成较大有用量的包含非天然氨基酸的蛋白质的能力。例如,可在细胞提取物、细胞裂解物、培养基、缓冲液等中产生浓度为(包括但不限于)至少10微克/升、至少50 微克/升、至少75微克/升、至少100微克/升、至少200微克/升、至少250 微克/升或至少500微克/升、至少1毫克/升、至少2毫克/升、至少3毫克/升、至少4毫克/升、至少5毫克/升、至少6毫克/升、至少7毫克/升、至少 8毫克/升、至少9毫克/升、至少10毫克/升、至少20毫克/升、30毫克/升、40毫克/升、50毫克/升、60毫克/升、70毫克/升、80毫克/升、90毫克/升、100毫克/升、200毫克/升、300毫克/升、400毫克/升、500毫克/升、600毫克/升、700毫克/升、800毫克/升、900毫克/升、1克/升、5克/升、10克/升或10克/升以上的包含非天然氨基酸的蛋白质。

[0617] 许多适于表达松弛素的载体都可商购获得。对于真核生物宿主的有用的表达载体包括但不限于包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒及细胞肥大病毒的表达控制序列的载体。此类载体包括pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA)和pCI-neo(Stratagene, La Jolla, Calif., USA)。可使用细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒(包括pBR322、pET3a和pET12a)、较宽宿主范围质粒(如RP4);噬菌体DNA,例如噬菌体 λ (例如NM989)和其它 DNA噬菌体(如M13和丝状单链DNA噬菌体)的许多衍生物。2 μ 质粒和其衍生物、POT1载体(美国专利第4,931,373号,其以引用的方式并入本文)、(Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996)中描述的pJS037载体以及pPICZ A、B或C(invitrogen)可与酵母宿主细胞一起使用。对于昆虫细胞,所述载体包括但不限于pVL941、pBG311(Cate等, "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, 第685-98页(1986))、pBluebac 4.5以及pMelbac(Invitrogen, Carlsbad, CA)。

[0618] 编码松弛素多肽的核苷酸序列还可包括或不包括编码信号肽的序列。当多肽是由表达所述多肽的细胞分泌时,存在信号肽。此种信号肽可为任何序列。信号肽可为原核生物信号肽或真核生物信号肽。Coloma, M(1992) J. Imm. Methods 152:89-104)描述了用于哺乳动物细胞中的信号肽(鼠类Ig κ 轻链信号肽)。其它信号肽包括但不限于来自酿酒酵母的 α -因子信号肽(美国专利第4,870,008号,其以引用的方式并入本文)、小鼠唾液淀粉酶的信号肽(O. Hagenbuchle等, Nature 289, 1981, 第643-646页)、经修饰羧基肽酶信号肽(L. A. Valls等, Cell 48, 1987, 第887-897页)、酵母BAR1信号肽(WO 87/02670, 其以引用的方式并入本文)以及酵母天冬氨酸蛋白酶3(yeast aspartic protease 3, YAP3)信号肽(参见M. Egel-Mitani等, Yeast 6, 1990, 第127-137页)。

[0619] 本领域普通技术人员已知合适的哺乳动物宿主细胞的实例。此类宿主细胞可为中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞(例如CHO-K1; ATCC-CCL-61)、绿猴细胞(Green Monkey cell, COS)(例如COS 1(ATCC CRL-1650)、COS 7(ATCC CRL-1651))、小鼠细胞(例如NS/O)、幼仓鼠肾(Baby Hamster Kidney, BHK)细胞系(例如ATCC CRL-1632或ATCC

CCL-10) 和人类细胞(例如HEK293(ATCC CRL-1573))以及组织培养物中的植物细胞。这些细胞系和其它细胞系可从诸如美国典型微生物菌种保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Md)的公共寄存场所获得。为了改进松弛素多肽的糖基化,可修饰哺乳动物宿主细胞以表达唾液酸转移酶,例如,如美国专利第5,047,335号中所描述的1,6-唾液酸转移酶,所述专利以引用的方式并入本文。

[0620] 将外源DNA引入到哺乳动物宿主细胞中的方法包括但不限于磷酸钙介导的转染、电穿孔、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、病毒载体以及Life Technologies Ltd, Paisley, UK中所描述的使用Lipofectamine 2000 的转染方法和Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA中所描述的使用FuGENE 6的转染方法。这些方法是本领域熟知的并且描述于Ausbel 等(编), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, USA中。哺乳动物细胞的培养可根据例如如(Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Nigel Jenkins编, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA; 以及Harrison Mass.和Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997)中所公开的所制定的方法来进行。

[0621] 表达系统、培养和分离

[0622] 松弛素多肽可在许多合适的表达系统中表达,所述合适的表达系统包括例如酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞和细菌。示例性表达系统的描述提供于下文中。

[0623] 酵母如本文中所使用的术语“酵母”包括能够表达编码松弛素多肽的基因的多种酵母中的任一种。此类酵母包括但不限于产子囊酵母(ascosporogenous yeast)(内孢霉目(Endomycetales))、担孢子酵母(basidiosporogenous)和属于半知菌(芽孢纲(Blastomycetes))类的酵母。产子囊酵母分为两个科: 蚀精霉科(Spermophthoraceae)和酵母菌科(Saccharomycetaceae)。后者包含四个亚科, 裂殖酵母亚科(Schizosaccharomycoidae)(例如裂殖酵母(Schizosaccharomyces)属)、拿逊酵母亚科(Nadsonioideae)、脂酵母亚科(Lipomycoideae)以及酵母亚科(Saccharomycoidae)(例如毕赤酵母(Pichia)属、克鲁维酵母(Kluyveromyces)属和酵母菌(Saccharomyces)属)。担孢子酵母包括白冬孢酵母(Leucosporidium)属、红冬孢酵母(Rhodospiridium)属、锁掷酵母(Sporidiobolus)属、线黑粉酵母(Filobasidium)属和香灰拟锁担菌(Filobasidiella)属。属于半知菌(芽孢纲)类的酵母分为两个科: 掷孢酵母科(Sporobolomycetaceae)(例如掷孢酵母(Sporobolomyces)属和布勒掷孢酵母(Bullera)属)和隐球酵母科(Cryptococcaceae)(例如假丝酵母(Candida)属)。

[0624] 用于与本发明一起使用的尤其感兴趣的物种为毕赤酵母属、克鲁维酵母属、酵母菌属、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)、汉逊酵母属(Hansenula)、球拟酵母属(Torulopsis)和假丝酵母属内的物种,其包括但不限于巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)、谷勒氏酵母(P.guilliermondii)、酿酒酵母、卡尔斯伯酵母(S. carlsbergensis)、糖化酵母(S.diastaticus)、道格拉斯酵母(S.douglasii)、克鲁维酵母(S.kluyveri)、诺本酵母(S.norbensis)、卵形酵母(S.oviformis)、乳酸克鲁维酵母(K.lactis)、脆壁克鲁维酵母(K.fragilis)、白假丝酵母菌(C.albicans)、麦芽糖假丝酵母(C.maltosa)和多形汉森酵母(H.polymorpha)。

[0625] 适用于表达松弛素多肽的酵母的选择在本领域普通技术人员的技能范围内。在选

择用于表达的酵母宿主时,合适的宿主可包括被证明具有例如良好分泌能力、低蛋白水解活性、良好分泌能力、良好可溶性蛋白质产生以及总体坚固性的酵母宿主。酵母一般可获自多种来源,包括但不限于加利福尼亚大学生物物理和医学物理系酵母基因保藏中心(Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, CA)和美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, "ATCC") (Manassas, VA)。

[0626] 术语“酵母宿主”或“酵母宿主细胞”包括可用作或已用作重组载体或其它转移DNA的接受者的酵母。所述术语包括已接受重组载体或其它转移DNA的原始酵母宿主细胞的后代。应理解,由于偶发突变或故意突变,单一母体细胞的后代在形态上或在与原始母体互补的基因组DNA或总DNA上可能未必完全一致。与将要以相关性质(如存在编码松弛素多肽的核苷酸序列)表征的母体充分类似的母体细胞的后代包括在由这个定义所意指的后代中。

[0627] 包括染色体外复制子或整合载体的表达和转化载体已被开发用于转化到许多酵母宿主中。例如,已开发用于以下各酵母的表达载体:酿酒酵母(Sikorski等, GENETICS (1989) 122:19; Ito等, J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen等, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); 白假丝酵母菌(Kurtz等, MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); 麦芽糖假丝酵母(Kunze等, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 多形汉森酵母(Gleeson等, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp等, MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); 脆壁克鲁维酵母(Das等, J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); 乳酸克鲁维酵母(De Louvencourt等, J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg等, BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); 谷勒氏酵母(Kunze等, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 巴斯德毕赤酵母(美国专利第5,324,639号;第4,929,555号;和第4,837,148号; Cregg等, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); 粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach等, NATURE (1982) 300:706); 以及解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*); 构巢曲霉(*A. nidulans*) (Ballance等, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn等, GENE (1983) 26:205-221; 和 Yelton等, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); 黑曲霉(*A. niger*) (Kelly和Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); 里氏木霉(*T. reesia*) (EP 0 244 234); 以及丝状真菌,例如脉孢菌(*Neurospora*)、青霉菌(*Penicillium*)、弯颈霉(*Tolypocladium*) (WO 91/00357),其中每篇文献均以引用的方式并入本文。

[0628] 本领域普通技术人员已知用于酵母载体的控制序列,所述序列包括但不限于来自诸如以下的基因的启动子区:醇脱氢酶(ADH) (EP 0 284 044); 烯醇酶; 葡萄糖激酶; 葡萄糖-6-磷酸异构酶; 甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAP或 GAPDH); 己糖激酶; 磷酸果糖激酶; 3-磷酸甘油酸变位酶; 和丙酮酸激酶(PyK) (EP 0 329 203)。编码酸性磷酸酶的酵母PHO5基因也可提供有用的启动子序列(Miyanohara等, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1)。用于与酵母宿主一起使用的其它合适的启动子序列可包括3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等, J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073)和其它糖解酶(如丙酮酸脱羧酶、磷酸丙糖异构酶和磷酸葡萄糖异构酶(Holland等, BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess等, J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149))的启动子。具有由生长条件控制的转录的另外的优点的可诱导酵母启动子可包括醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、与氮代谢相关的降解酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和

启动子进一步描述于EP 0 073 657中。

[0629] 酵母增强子也可与酵母启动子一起使用。另外,合成启动子也可充当酵母启动子。例如,酵母启动子的上游活化序列(UAS)可与另一个酵母启动子的转录活化区连接,从而产生合成杂合启动子。此类杂合启动子的实例包括与GAP转录活化区连接的ADH调节序列。参见美国专利第4,880,734号和第4,876,197号,其以引用的方式并入本文。杂合启动子的其它实例包括由ADH2、GAL4、GAL10或PHO5基因的调节序列连同糖解酶基因如GAP或PyK的转录活化区所组成的启动子。参见EP 0 164 556。此外,酵母启动子可包括具有与酵母RNA聚合酶结合并启动转录的能力的非酵母来源的天然存在启动子。

[0630] 可构成酵母表达载体的一部分的其它控制元件包括例如来自GAPDH或烯醇酶基因的终止子(Holland等,J.BIOL.CHEM. (1981) 256:1385)。另外,来自2 μ 质粒来源的复制起点适用于酵母。适用于酵母的选择基因为酵母质粒中存在的trp1基因。参见Tschumper等,GENE (1980) 10:157;Kingsman 等,GENE (1979) 7:141。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母的突变菌株提供选择标记。类似地,由带有Leu2基因的已知质粒补充Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)。

[0631] 本领域普通技术人员已知将外源DNA引入到酵母宿主中的方法,所述方法通常包括但不限于转化原生质球状体或经碱性阳离子处理的完整酵母宿主细胞。例如,可根据Hsiao等,PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1979) 76:3829和Van Solingen等,J.BACT. (1977) 130:946中所描述的方法来进行酵母的转化。然而,也可如SAMBROOK等,MOLECULAR CLONING:ALAB. MANUAL (2001) 中一般所述的那样使用将DNA引入到细胞中的其它方法,例如通过核注射、电穿孔或原生质体融合进行。然后,可使用本领域普通技术人员已知的标准技术来培养酵母宿主细胞。

[0632] 本领域普通技术人员已知在酵母宿主细胞中表达异源蛋白的其它方法。一般参见美国专利公布第20020055169号;美国专利第6,361,969号;第6,312,923号;第6,183,985号;第6,083,723号;第6,017,731号;第5,674,706号;第5,629,203号;第5,602,034号;和第5,089,398号;美国复审专利第RE37,343号和第RE35,749号;PCT公开专利申请WO 99/07862;WO 98/37208;和WO 98/26080;欧洲专利申请EP 0 946 736;EP 0 732 403;EP 0 480 480;WO 90/10277;EP 0 340 986;EP 0 329 203;EP 0 324 274;和EP 0 164 556。还参见Gellissen等,ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62 (1-2):79-93;Romanos等,YEAST (1992) 8 (6):423-488;Goeddel,METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7,其中的每篇文献均以引用的方式并入本文。

[0633] 在使用本领域普通技术人员已知的标准进料分批发酵方法进行的扩增阶段期间,可使酵母宿主菌株在发酵罐中生长。所述发酵方法可适用于解释特定酵母宿主的碳利用途径或表达控制模式的差异。例如,酵母菌酵母宿主的发酵可能需要单一葡萄糖进料、复杂氮源(例如酪蛋白水解产物)和多种维生素补充。相反,甲基营养型酵母巴斯德毕赤酵母可能需要甘油、甲醇和痕量矿物进料,但仅需要简单铵(氮)盐以进行最佳生长和表达。参见例如美国专利第5,324,639号;Elliott等,J.PROTEIN CHEM. (1990) 9:95;和 Fieschko等,BIOTECH.BIOENG. (1987) 29:1113,其以引用的方式并入本文。

[0634] 然而,此类发酵方法可具有与所用的酵母宿主菌株无关的某些常见特征。例如,在扩增阶段期间,可将生长限制营养素(通常为碳)添加到发酵罐中以允许最大生长。另外,发

酵方法一般使用经设计成含有适量碳、氮、基本盐、磷和其它较少的营养素(维生素、痕量矿物质和盐等)的发酵培养基。适合于与毕赤酵母一起使用的发酵培养基的实例描述于美国专利第 5,324,639 号和第 5,231,178 号中,其以引用的方式并入本文。

[0635] 杆状病毒感染的昆虫细胞术语“昆虫宿主”或“昆虫宿主细胞”是指可用作或已用作重组载体或其它转移DNA的接受者的昆虫。所述术语包括已被转染的原始昆虫宿主细胞的后代。应理解,由于偶发突变或故意突变,单一母体细胞的后代在形态上或在与原始母体互补的基因组DNA或总DNA上可能未必完全一致。与将要以相关性质(例如存在编码松弛素多肽的核苷酸序列)表征的母体充分类似的母体细胞的后代包括在由这个定义所意指的后代中。松弛素多肽的杆状病毒表达可用于本发明并且因为松弛素可在包括细菌、哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母或真菌的许多宿主细胞中生物合成,所以使用rDNA技术、多肽或其前体。本发明的实施方案包括在细菌、酵母或哺乳动物细胞中生物合成松弛素、经修饰松弛素、松弛素多肽或松弛素类似物。本发明的另一个实施方案包括在大肠杆菌或酵母中进行生物合成。在哺乳动物细胞和转基因动物中生物合成的实例描述于Hakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69, (1997)]中。

[0636] 本领域普通技术人员已知适用于表达松弛素多肽的昆虫细胞的选择。数种昆虫物种在本领域中得到充分描述并且可商购获得,其包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、桑蚕 (*Bombyx mori*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)。在选择用于表达的昆虫宿主时,合适的宿主可包括被证明尤其具有良好分泌能力、低蛋白水解活性和总体稳健性的宿主。昆虫一般可获自多种来源,包括但不限于加利福尼亚大学生物物理和医学物理系昆虫基因保藏中心 (Berkeley, CA); 和美国典型菌种保藏中心 (“ATCC”) (Manassas, VA)。

[0637] 一般而言,杆状病毒感染的昆虫表达系统的组分包括:转移载体(通常为细菌质粒),其含有杆状病毒基因组的片段和用于插入待表达的异源基因的方便的限制位点;野生型杆状病毒,其具有与转移载体中的杆状病毒特异性片段同源的序列(这允许将异源基因同源重组到杆状病毒基因组中);以及适当的昆虫宿主细胞和生长培养基。本领域中已知用于构建载体、转染细胞、挑选斑块、使细胞在培养物中生长等的材料、方法和技术并且可使用描述这些技术的手册。

[0638] 在将异源基因插入到转移载体中之后,将载体和野生型病毒基因组转染到昆虫宿主细胞中,其中载体与病毒基因组重组。表达经包装的重组病毒,并且鉴定和纯化重组体斑块。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法可以试剂盒形式从例如Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) 商购获得。这些技术一般是本领域普通技术人员已知的,并且全面描述于SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN, 第1555期, (1987) 中,其以引用的方式并入本文。还参见RICHARDSON, 39METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING和POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); 以及O’REILLY等, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)。

[0639] 实际上,本领域普通技术人员已知使用杆状病毒/昆虫细胞表达系统来生产各种异源蛋白质。参见例如美国专利第6,368,825号、第6,342,216号、第6,338,846号、第6,

261,805号、第6,245,528、第6,225,060号、第6,183,987 号、第6,168,932号、第6,126,944号、第6,096,304号、第6,013,433号、第 5,965,393号、第5,939,285号、第5,891,676号、第5,871,986号、第5,861,279 号、第5,858,368号、第5,843,733号、第5,762,939号、第5,753,220号、第 5,605,827号、第5,583,023号、第5,571,709号、第5,516,657号、第5,290,686号、WO 02/06305、WO 01/90390、WO 01/27301、WO 01/05956、WO 00/55345、WO 00/20032、WO 99/51721、WO 99/45130、WO 99/31257、WO 99/10515、WO 99/09193、WO 97/26332、WO 96/29400、WO 96/25496、WO 96/06161、WO 95/20672、WO 93/03173、WO 92/16619、WO 92/02628、WO 92/01801、WO 90/14428、WO 90/10078、WO 90/02566、WO 90/02186、WO 90/01556、WO 89/01038、WO 89/01037、WO 88/07082,其以引用的方式并入本文。

[0640] 可用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的载体是本领域已知的,并且包括例如从杆状病毒苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 获得的昆虫表达和转移载体,其为不依赖于辅助细胞的病毒表达载体。从这个系统获得的病毒表达载体通常使用强病毒多角体蛋白基因启动子来驱动异源基因的表达。一般参见 O'Reilly 等, *BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL* (1992)。

[0641] 在将外来基因插入到杆状病毒基因组中之前,通常将包含启动子、前导序列(必要时)、感兴趣的编码序列和转录终止序列的上述组分组装到中间错位构建体 (intermediate transplacement construct) (转移载体) 中。中间错位构建体通常保持在能够稳定保持在宿主如细菌中的复制子如染色体外元件 (例如质粒) 中。复制子将具有复制系统,因此使它保持在适用于克隆和扩增的宿主中。更具体来说,质粒可含有多角体蛋白聚腺苷酸化信号 (Miller, *ANN. REV. MICROBIOL.* (1988) 42:177) 和用于在大肠杆菌中选择和繁殖的原核氨比西林 (ampicillin) 抗性 (amp) 基因和复制起点。

[0642] 一种将外来基因引入到 AcNPV 中的常用转移载体为 pAc373。也已经对本领域技术人员已知的许多其它载体进行设计,所述载体包括例如 pVL985,其将多角体蛋白起始密码子从 ATG 改变为 ATT,并且其在 ATT 下游 32 个碱基对处引入 BamHI 克隆位点。参见 Luckow 和 Summers, *VIROLOGY* 170:31 (1989)。其它可商购获得的载体包括例如 PBlueBac4.5/V5-His、pBlueBacHis2、pMelBac、pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。

[0643] 在插入异源基因之后,将转移载体和野生型杆状病毒基因组共转染到昆虫细胞宿主中。将异源 DNA 引入到杆状病毒的所需位点中的方法是本领域中已知的。参见 SUMMERS 和 SMITH, *TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN*, 第 1555 期, (1987); Smith 等, *MOL. CELL. BIOL.* (1983) 3:2156; Luckow 和 Summers, *VIROLOGY* (1989) 170:31。例如,可通过同源双交叉重组插入到诸如多角体蛋白基因的基因中;也可插入到所需杆状病毒基因中的经工程改造化的限制酶位点中。参见 Miller 等, *BIOESSAYS* (1989) 11 (4) :91。

[0644] 可通过电穿孔来实现转染。参见 TROTTER 和 WOOD, *39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1995); Mann 和 King, *J. GEN. VIROL.* (1989) 70:3501。或者,可使用脂质体来用重组表达载体和杆状病毒转染昆虫细胞。参见例如 Liebman 等, *BIOTECHNIQUES* (1999) 26 (1) :36; Graves 等, *BIOCHEMISTRY* (1998) 37:6050; Nomura 等, *J. BIOL. CHEM.* (1998) 273 (22) :13570; Schmidt 等, *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (1998) 12:323; Siffert 等, *NATURE GENETICS* (1998) 18:45; TILKINS 等, *CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK* 145-154 (1998); Cai 等, *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (1997) 10:263; Dolphin 等,

NATURE GENETICS (1997) 17:491;Kost等,GENE (1997) 190:139;Jakobsson等,J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203;Rowles等,J.BIOL.CHEM. (1996) 271 (37):22376;Reverey等,J.BIOL.CHEM. (1996) 271 (39):23607-10;Stanley 等,J.BIOL.CHEM. (1995) 270:4121;Sisk等,J.VIROL. (1994) 68 (2):766;以及Peng等,BIOTECHNIQUES (1993) 14 (2):274。可商购获得的脂质体包括例如Cellfectin®和Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA)。另外,可使用磷酸钙转染。参见TROTTER AND WOOD, 39METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18 (19):5667;以及Mann 和King, J.GEN.VIROL. (1989) 70:3501。

[0645] 杆状病毒表达载体通常含有杆状病毒启动子。杆状病毒启动子是能够与杆状病毒RNA聚合酶结合并且启动使编码序列(例如结构基因)进入mRNA 中的下游(3')转录的任何DNA序列。启动子将具有通常最接近编码序列的5'端放置的转录起始区。这个转录起始区通常包括RNA聚合酶结合位点和转录起始位点。杆状病毒启动子也可具有称作增强子的第二结构域,当存在所述结构域时,其通常在结构基因的末梢。而且,表达可为经调节的或为组成型的。

[0646] 在感染周期的后期经充分转录的结构基因提供尤其有用的启动子序列。实例包括源自编码病毒多面体蛋白的基因(FRIESEN等, The Regulation of Baculovirus Gene Expression, THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839和EP 0 155 476)和编码p10蛋白的基因(Vlak等, J.GEN.VIROL. (1988) 69:765)的序列。

[0647] 将新近形成的杆状病毒表达载体包装到感染性重组杆状病毒中并且随后可通过本领域普通技术人员已知的技术来纯化所生长的斑块。参见Miller 等, BIOESSAYS (1989) 11 (4):91; SUMMERS和SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN, 第1555期, (1987)。

[0648] 已开发用于感染到多种昆虫细胞中的重组杆状病毒表达载体。例如,已开发尤其用于埃及伊蚊(ATCC第CCL-125号)、桑蚕(ATCC第CRL-8910 号)、黑腹果蝇(ATCC第1963号)、草地贪夜蛾和粉纹夜蛾的重组杆状病毒。参见Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell等, J.VIROL. (1985) 56:153; Smith等, MOL.CELL.BIOL. (1983) 3:2156。一般参见Fraser等, IN VITRO CELL.DEV.BIOL. (1989) 25:225。更具体来说,用于杆状病毒表达载体系统的细胞系通常包括但不限于Sf9(草地贪夜蛾)(ATCC第 CRL-1711号)、Sf21(草地贪夜蛾)(Invitrogen Corp., 目录号11497-013 (Carlsbad, CA))、Tri-368(粉纹夜蛾)和High-Five™ BTI-TN-5B1-4(粉纹夜蛾)。

[0649] 用于异源多肽在杆状病毒/表达载体中的直接表达和融合表达的细胞和培养基可商购获得,并且细胞培养技术一般是本领域普通技术人员已知的。

[0650] 大肠杆菌、假单胞菌属物种和其它原核生物细菌表达技术是本领域普通技术人员已知的。多种载体可用于细菌宿主中。所述载体可以为单拷贝或低或高的多拷贝载体。载体可用于克隆和/或表达。鉴于关于载体的丰富文献、许多载体的商业可得性以及甚至描述载体和其限制酶图谱以及特征的手册,在本文中无需广泛讨论。众所周知,所述载体通常涉及允许选择的标记,所述标记可提供细胞毒性剂抗性、原营养或免疫性。通常存在多种标记,其提供不同特征。

[0651] 细菌启动子为能够结合细菌RNA聚合酶并且启动使编码序列(例如结构基因)进入mRNA中的下游(3')转录的任何DNA序列。启动子将具有通常最接近编码序列的5'端放置的

转录起始区。这个转录起始区通常包括RNA 聚合酶结合位点和转录起始位点。细菌启动子也可具有称作操纵基因的第二结构域,其可与开始RNA合成的相邻RNA聚合酶结合位点重叠。操纵基因允许阴性调节(可诱导)转录,这是因为基因抑制蛋白可结合操纵基因并从而抑制特定基因的转录。在不存在阴性调节元件如操纵基因的情况下可发生组成型表达。另外,可通过基因活化蛋白结合序列实现阳性调节,当存在所述结合序列时,所述序列通常最接近RNA聚合酶结合序列的(5')。基因活化蛋白的实例为代谢产物活化蛋白(CAP),其有助于启动大肠杆菌中lac操纵子的转录[Raibaud等,ANNU.REV.GENET.(1984)18:173]。因此,经调节的表达可为阳性或阴性表达,从而增强或减弱转录。

[0652] 编码代谢途径酶的序列提供尤其有用的启动子序列。实例包括来源于糖代谢酶如半乳糖、乳糖(lac) [Chang等,NATURE (1977) 198:1056]以及麦芽糖的启动子序列。另外的实例包括来源于生物合成酶如色氨酸(trp)的启动子序列[Goeddel等,NUC.ACIDS RES.(1980)8:4057;Yelverton等,NUCL. ACIDS RES.(1981)9:731;美国专利第4,738,921号;欧洲公布第036 776号及第121 775号,其以引用的方式并入本文]。 β -半乳糖苷酶(bla)启动子系统 [Weissmann(1981) "The cloning of interferon and other mistakes." Interferon 3 (I.Gresser编)],噬菌体 λ PL [Shimatake等,NATURE (1981) 292:128]以及 T5 [美国专利第4,689,406号,其以引用的方式并入本文]启动子系统也提供了有用的启动子序列。本发明的优选方法利用强启动子如T7启动子来诱导高水平的松弛素多肽。本领域普通技术人员已知此类载体的实例,其包括来自Novagen的pET29系列以及W099/05297 (其以引用的方式并入本文)中所描述的pPOP载体。此类表达系统在宿主中产生高水平的松弛素多肽,而不损害宿主细胞生存能力或生长参数。pET19 (Novagen)是本领域中已知的另一种载体。

[0653] 另外,在自然界中不存在的合成启动子也充当细菌启动子。例如,可使一个细菌或噬菌体启动子的转录活化序列与另一细菌或噬菌体启动子的操纵子序列连接,从而产生合成杂合启动子[美国专利第4,551,433号,其以引用的方式并入本文]。例如,tac启动子是包含trp启动子和lac操纵子序列的杂合trp-lac启动子,其由lac阻遏物调节[Amann等,GENE (1983) 25:167; de Boer等,PROC.NATL.ACAD.SCI.(1983) 80:21]。此外,细菌启动子可包括非细菌来源的天然存在启动子,其具有与细菌RNA聚合酶结合并启动转录的能力。也可使非细菌来源的天然存在启动子与可相容的RNA聚合酶偶联以产生一些基因在原核生物中的高水平表达。噬菌体T7RNA聚合酶/启动子系统是偶联启动子系统的实例[Studier等,J.MOL.BIOL.(1986) 189:113;Tabor等,Proc Natl.Acad.Sci.(1985) 82:1074]。另外,杂合启动子也可包含噬菌体启动子和大肠杆菌操纵基因区(欧洲公布第267851号)。

[0654] 除功能启动子序列之外,有效核糖体结合位点还可用于在原核生物中表达外来基因。在大肠杆菌中,核糖体结合位点被称作Shine-Dalgarno (SD) 序列并且包括起始密码子(ATG)和位于起始密码子上游3-11个核苷酸处的长度为3-9个核苷酸的序列[Shine等,NATURE (1975) 254:34]。据认为,SD序列通过SD序列与大肠杆菌16S rRNA的3'端之间的碱基配对来促进mRNA 与核糖体的结合[Steitz等,"Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA",Biological Regulation and Development:Gene Expression (Ed. R.F.Goldberger,1979)]。为了表达具有弱核糖体结合位点的真核基因和原核基因[Sambrook等,"Expression of cloned genes in Escherichia coli",

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]。

[0655] 术语“细菌宿主”或“细菌宿主细胞”是指可用作或已用作重组载体或其它转移DNA的接受者的细菌。所述术语包括已被转染的原始细菌宿主细胞的后代。应理解,由于偶发突变或故意突变,单一母体细胞的后代在形态上或在与原始母体互补的基因组DNA或总DNA上可能未必完全一致。与将要以相关性质(例如存在编码松弛素多肽的核苷酸序列)表征的母体充分类似的母体细胞的后代包括在由这个定义所意指的后代中。

[0656] 本领域普通技术人员已知适用于表达松弛素多肽的宿主细菌的选择。在选择用于表达的细菌宿主时,合适的宿主可包括被证明尤其具有良好包涵体形成能力、低蛋白水解活性以及总体稳健性的宿主。细菌宿主一般可获自多种来源,包括但不限于加利福尼亚大学生物物理和医学物理系细菌基因保藏中心(Berkeley, CA);以及美国典型菌种保藏中心(“ATCC”) (Manassas, VA)。工业/医药发酵一般使用来源于K菌株的细菌(例如W3110)或来源于B菌株的细菌(例如BL21)。这些菌株因其生长参数极其众所周知且稳健而特别有用。另外,这些菌株为非病原性的,出于安全性和环境原因,其在商业上是重要的。合适的大肠杆菌宿主的其它实例包括但不限于BL21、DH10B或其衍生物的菌株。在本发明方法的另一个实施方案中,大肠杆菌宿主为蛋白酶缺乏菌株,其包括但不限于OMP⁻和LON⁻。宿主细胞株可为假单胞菌种,包括但不限于荧光假单胞菌、绿脓杆菌以及恶臭假单胞菌。已知命名为菌株MB101的荧光假单胞菌生物型1可用于重组生产并且可用于治疗性蛋白质的生产过程。假单胞菌表达系统的实例包括可以宿主菌株形式获自Dow Chemical Company的系统(Midland, MI, 可通过万维网在dow.com上获得)。

[0657] 在形成重组宿主细胞株(即,已将表达构建体引入到宿主细胞中并且分离出具有合适表达构建体的宿主细胞)后,在适于产生松弛素多肽的条件下培养重组宿主细胞株。如对于本领域技术人员明显的,重组宿主细胞株的培养方法将依赖于所利用的表达构建体的性质及宿主细胞的特性。通常使用本领域普通技术人员已知的方法来培养重组宿主菌株。重组宿主细胞通常是在含有可吸收的碳源、氮源和无机盐源并且任选地含有维生素、氨基酸、生长因子和本领域普通技术人员已知的其它蛋白质培养补充物的液体培养基中进行培养。用于培养宿主细胞的液体培养基可任选地含有用于防止不合需要的微生物生长的抗生素或抗真菌剂,和/或包括但不限于用于选择含有表达载体的宿主细胞的抗生素的化合物。

[0658] 重组宿主细胞可以分批或连续模式培养,其中细胞收获(在松弛素多肽在细胞内积聚的情况下)或培养物上清液的收获以分批或连续模式进行。对于原核宿主细胞中的生产来说,优选分批培养和细胞收获。

[0659] 本发明松弛素多肽通常是在重组系统中表达之后进行纯化。松弛素多肽可采用本领域中已知的多种方法从宿主细胞或培养基中纯化出来。细菌宿主细胞中所产生的松弛素多肽可具有弱溶解性或不可溶(呈包涵体形式)。在本发明的一个实施方案中,使用本文中所公开的方法以及本领域中已知的方法,可容易地在松弛素多肽中进行为增加重组产生的蛋白质的溶解性而选择的氨基酸取代。在不溶性蛋白质的情况下,可通过离心从宿主细胞裂解物中收集蛋白质,并且其后可接着进行细胞的均质化。在具有弱溶解性的蛋白质的情况下,可添加包括但不限于聚乙烯亚胺(PEI)的化合物以诱导部分可溶的蛋白质的沉淀。然后可通过离心方便地收集沉淀的蛋白质。使用本领域普通技术人员已知的多种方法,可使重组宿主细胞破裂或均质化以使包涵体从细胞内部释放出来。可使用熟知的技术来进行宿

主细胞的破裂或均质化,所述技术包括但不限于酶促细胞破裂、超声处理、杜恩斯均质化(dounce homogenization)或高压释放破裂。在本发明方法的一个实施方案中,使用高压释放技术使大肠杆菌宿主细胞破裂以释放松弛素多肽的包涵体。在处理松弛素多肽的包涵体时,为了使包涵体产率最大化且不会由于诸如溶解、机械剪切或蛋白质水解的因素造成损失,将重复过程的均质化时间减至最低是有利的。

[0660] 然后,可使用本领域中已知的许多合适的增溶剂中的任一种来溶解不溶性或沉淀的松弛素多肽。可用尿素或盐酸胍溶解松弛素多肽。应将溶解的松弛素多肽的体积减至最低,以便可使用可方便操作的批量大小来生产大批量。在其中重组宿主可以体积为数千升的批量生长的大规模商业装置中,这个因素可能是重要的。另外,当在大规模商业装置中制造松弛素多肽时,特别是对于人类医药用途来说,如果可能的话,应避免可损害机器和容器的苛刻化学品或蛋白质产物本身。本发明的方法中已证明,可使用较温和的变性剂尿素代替较苛刻的变性剂盐酸胍来溶解松弛素多肽包涵体。尿素的使用显著降低损害松弛素多肽的制造和纯化过程中使用的不锈钢设备的风险,同时有效溶解松弛素多肽包涵体。

[0661] 就可溶性松弛素蛋白而言,可将松弛素分泌到周质空间或培养基中。另外,可溶性松弛素可能存在于宿主细胞的细胞质中。可能需要在执行纯化步骤之前浓缩可溶性松弛素。可使用本领域普通技术人员已知的标准技术从例如细胞裂解物或培养基浓缩可溶性松弛素。另外,可使用本领域普通技术人员已知的标准技术来使宿主细胞破裂并且使可溶性松弛素从宿主细胞的细胞质或周质空间释放出来。

[0662] 当生产呈融合蛋白形式的松弛素多肽时,可去除融合序列。可通过酶促或化学裂解来实现融合序列的去除。可使用本领域普通技术人员已知的方法来实现融合序列的酶促去除。如对于本领域普通技术人员将是明显的,用于去除融合序列的酶的选择将由融合体的特性决定,并且反应条件将根据酶的选择进行指定。可使用本领域普通技术人员已知的试剂来实现化学裂解,所述试剂包括但不限于溴化氰、TEV蛋白酶和其它试剂。可采用本领域普通技术人员已知的方法从裂解的融合序列中纯化出裂解的松弛素多肽。如对于本领域普通技术人员将是明显的,此类方法将由融合序列和松弛素多肽的特性和性质决定。用于纯化的方法可包括但不限于尺寸排阻色谱、疏水性相互作用色谱、离子交换色谱或透析或其任何组合。

[0663] 也可纯化松弛素多肽以从蛋白质溶液中去除DNA。虽然可通过本领域中已知的任何合适的方法如沉淀或离子交换色谱去除DNA,但也可通过用核酸沉淀剂,例如但不限于硫酸鱼精蛋白沉淀来去除DNA。可使用包括但不限于离心或过滤的熟知的标准方法使松弛素多肽与沉淀的DNA分离。在将使用松弛素多肽来治疗人类的背景中,宿主核酸分子的去除是重要因素,并且本发明方法将宿主细胞DNA降低到药学上可接受的水平。

[0664] 用于小规模或大规模发酵的方法也可用于蛋白质表达中,所述方法包括但不限于发酵罐、振荡烧瓶、流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养系统和搅拌槽生物反应器系统。这些方法中的每一种都可以分批、分批进料或连续模式工艺进行。

[0665] 一般可使用本领域中的标准方法来回收本发明的人松弛素多肽。例如,可离心或过滤培养基或细胞裂解物以去除细胞碎片。可将上清液浓缩或稀释至所需体积或过滤到合适的缓冲液中以调节用于进一步纯化的制备品。本发明松弛素多肽的进一步纯化包括从完整形式中分离脱除酰胺基和剪短的形式的松弛素多肽变异体。

[0666] 以下示例性程序中的任一种都可用于纯化本发明松弛素多肽：亲和色谱、阴离子或阳离子交换色谱(使用包括但不限于DEAE SEPHAROSE)、硅胶色谱、高效液相色谱(HPLC)、反相HPLC、凝胶过滤(使用包括但不限于SEPHADEX G-75)、疏水性相互作用色谱、尺寸排阻色谱、金属螯合物色谱、超滤/透滤、乙醇沉淀、硫酸铵沉淀、色谱聚焦、置换色谱、电泳程序(包括但不限于制备型等电聚焦)、差异溶解度(包括但不限于硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE,或萃取。

[0667] 根据本领域技术人员已知并使用的标准程序,可将本发明蛋白质部分或实质上纯化成均质,所述本发明蛋白质包括但不限于包含非天然氨基酸的蛋白质、包含非天然氨基酸的肽、针对包含非天然氨基酸的蛋白质的抗体、包含非天然氨基酸的蛋白质的结合搭配物等。因此,可采用本领域普通技术人员已知的多种方法中的任一种来回收和纯化本发明多肽,所述方法包括但不限于硫酸铵或乙醇沉淀、酸或碱萃取、柱色谱、亲和柱色谱、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水性相互作用色谱、羟基磷灰石色谱、外源凝集素色谱、凝胶电泳等。在制备正确折叠的成熟蛋白质时,需要时可使用蛋白质再折叠步骤。当需要高纯度时,在最后纯化步骤中可使用高效液相色谱(HPLC)、亲和色谱或其它合适的方法。在一个实施方案中,使用针对非天然氨基酸(或包含非天然氨基酸的蛋白质或肽)形成的抗体作为纯化试剂,从而(包括但不限于)用于包含一种或多种非天然氨基酸的蛋白质或肽的基于亲和性的纯化。需要时,在部分纯化或纯化成均质后,任选地将所述多肽用于多种应用,包括但不限于用作测定组分、治疗剂、预防剂、诊断剂、研究试剂和/或用作抗体产生的免疫原。可通过使用常规方案向动物,优选非人动物施用本发明多肽或带表位的片段或细胞来获得针对本发明多肽而产生的抗体。本领域普通技术人员可使用多种已知技术来产生抗体。此外,可使用转基因小鼠或包括其它哺乳动物在内的其它生物体来表达人源化抗体。可使用上述抗体来分离或鉴定表达多肽的克隆或纯化多肽。也可利用针对本发明多肽的抗体来治疗疾病。

[0668] 本发明多肽和多核苷酸也可用作疫苗。因此,在进一步的方面,本发明涉及一种在哺乳动物中诱导免疫反应的方法,其包括给哺乳动物接种足以产生抗体和/或T细胞免疫反应(包括例如产生细胞因子的T细胞或细胞毒性T细胞)的本发明多肽以保护所述动物免患疾病,而无论个体是否已产生所述疾病。也可采用如下方法诱导哺乳动物中的免疫反应,所述方法包括:在活体内通过指导多核苷酸表达并编码多肽的载体递送本发明多肽,以诱导此种免疫反应,从而产生抗体来保护所述动物免患本发明疾病。一种施用载体的方式是使载体以粒子上的涂层的形式或以其它形式加速进入所需细胞中。此种核酸载体可包含DNA、RNA、经修饰核酸或DNA/RNA杂合体。为了用作疫苗,多肽或核酸载体通常将以疫苗制剂(组合物)形式提供。所述制剂可进一步包含合适的载体。因为多肽可在胃中分解,所以其可肠胃外(例如皮下、肌肉内、静脉内或皮内注射)施用。适于肠胃外施用施用的制剂包括:水性和非水性的无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与接收者的血液等张的溶质;以及水性和非水性的无菌悬浮液,其可包括悬浮剂或增稠剂。疫苗制剂也可包括本领域普通技术人员已知的用于增强制剂的免疫原性的佐剂系统。剂量将视疫苗的特定活性而定并且可通过常规实验容易地确定。

[0669] 替代系统中的表达

[0670] 已使用数种策略将非天然氨基酸引入到非重组宿主细胞、诱变宿主细胞或不合细

胞的系统中的蛋白质中。这些系统也适用于制备本发明松弛素多肽。诸如Lys、Cys和Tyr的具有反应性侧链的氨基酸的衍生使得赖氨酸转化为N²-乙酰基-赖氨酸。化学合成还提供了掺入非天然氨基酸的直接方法。随着肽片段的酶促连接和天然化学连接的新近发展,可以制造较大蛋白质。参见例如P.E.Dawson和S.B.H.Kent, *Annu.Rev.Biochem*, 69:923 (2000)。化学肽连接和天然化学连接描述于美国专利第6,184,344号、美国专利公布第2004/0138412号、美国专利公布第2003/0208046号、WO 02/098902和 WO 03/042235中,这些文献以引用的方式并入本文。已使用将利用所需非天然氨基酸以化学方式酰化的抑制因子tRNA添加到能够支持蛋白质生物合成的活体外提取物中的通用活体外生物合成方法将超过100种非天然氨基酸位点特异性地掺入到几乎任何尺寸的多种蛋白质中。参见例如V.W.Cornish, D.Mendel和P.G.Schultz, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J.Noren, S.J.Anthony-Cahill, M.C.Griffith, P.G.Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244:182-188 (1989); 以及J.D.Bain, C.G.Glabbe, T.A.Dix, A.R.Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J.Am.Chem.Soc.* 111:8013-8014 (1989)。已经将广泛范围的官能团引入到蛋白质中用于蛋白质稳定性、蛋白质折叠、酶机理和信号转导的研究。

[0671] 除了本文中指出的其它参考文献外,本领域普通技术人员还已知多种纯化/蛋白质折叠方法,其包括但不限于以下文献中列出的那些方法:R.Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* 第182卷: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag 等 (1996) *Protein Methods*, 第2版, Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris和Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris和Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 第3版, Springer Verlag, NY; Janson和Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 第2版, Wiley-VCH, NY; 以及Walker (1998), *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ; 以及其中引用的参考文献。

[0672] 在真核宿主细胞或非真核宿主细胞中产生感兴趣的具有非天然氨基酸的蛋白质或多肽的一个优点在于,所述蛋白质或多肽通常将折叠成其天然构象。然而,在本发明的某些实施方案中,本领域技术人员应认识到,在合成、表达和/或纯化之后,蛋白质或多肽可以具有与相关多肽所需的构象不同的构象。在本发明的一方面,任选地使所表达的蛋白质或多肽变性并且然后使其复性。这利用本领域中已知的方法来实现,所述方法包括但不限于向感兴趣的蛋白质或多肽中添加伴侣蛋白(chaperonin)、将蛋白质溶解于诸如盐酸胍的离液剂中、利用蛋白质二硫化物异构酶等。

[0673] 一般而言,有时需要使所表达的多肽变性和还原并且然后使多肽再折叠成优选构象。例如,可将胍、尿素、DTT、DTE和/或伴侣蛋白添加到感兴趣的翻译产物中。本领域普通技术人员已知使蛋白质还原、变性和复性的方法(参见上述参考文献以及Debinski等 (1993))

J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman和Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; 以及 Buchner等, (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270)。Debinski等例如描述了胍-DTE中包涵体蛋白质的变性和还原。可在含有(包括但不限于)氧化型谷胱甘肽和L-精氨酸的氧化还原缓冲剂中使蛋白质再折叠。可使再折叠试剂流动或以其它方式移动以使其与一种或多种多肽或其它表达产物接触,或者反之亦然。

[0674] 就原核生产松弛素多肽而言,如此产生的松弛素多肽可能错误折叠并且因而缺乏生物活性或者生物活性降低。可通过“再折叠”来恢复蛋白质的生物活性。一般而言,通过使用例如一种或多种离液剂(例如尿素和/或胍)和能够还原二硫键的还原剂(例如二硫苏糖醇、DTT或2-巯基乙醇(2-ME))溶解(其中松弛素多肽也不可溶)、展开并还原多肽链来使错误折叠的松弛素多肽再折叠。在中等浓度的离液剂下,然后添加氧化剂(例如氧、胱氨酸或胱胺),这允许二硫键的再形成。可使用本领域中已知的标准方法使松弛素多肽再折叠,所述方法例如美国专利第4,511,502号、第4,511,503号和第4,512,922号中所描述的方法,所述文献以引用的方式并入本文。松弛素多肽也可与其它蛋白质共折叠以形成异源二聚体或异源多聚体。

[0675] 在再折叠之后,可进一步纯化松弛素。可使用本领域普通技术人员已知的多种技术实现松弛素的纯化,所述技术包括疏水性相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、反相高效液相色谱、亲和色谱等或其任何组合。另外的纯化也可包括干燥或沉淀经纯化蛋白质的步骤。

[0676] 在纯化后,可将松弛素更换到不同缓冲液中和/或通过本领域中已知的多种方法(包括但不限于透滤和透析)中的任一种使其浓缩。以单一纯化蛋白质形式提供的松弛素可进行聚集和沉淀。

[0677] 经纯化松弛素可以为至少90%纯(如由反相高效液相色谱,RP-HPLC,或十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)所测量),或至少95%纯,或至少98%纯,或至少99%或更纯。无论松弛素纯度的确切数值如何,松弛素对于用作药物产品或用于进一步处理,例如与诸如PEG的水溶性聚合物缀合来说都是足够纯的。

[0678] 在不存在其它活性成分或蛋白质(除赋形剂、载体和稳定剂、血清白蛋白等以外)的情况下,某些松弛素分子可用作治疗剂,或者它们可与另一种蛋白质或聚合物复合。

[0679] 一般纯化方法可以任何适当顺序对包含松弛素多肽的细胞裂解物、提取物、培养基、包涵体、宿主细胞的周质空间、宿主细胞的细胞质或其它材料或由任何分离步骤得到的任何松弛素多肽混合物执行多种分离步骤中的任一种分离步骤,所述任何分离步骤包括但不限于亲和色谱、离子交换色谱、疏水性相互作用色谱、凝胶过滤色谱、高效液相色谱(“HPLC”)、反相HPLC(“RP-HPLC”)、膨胀床吸附或其任何组合和/或重复。

[0680] 用于执行本文描述的技术的设备和其它必要材料可商购获得。泵、馏分收集器、监测器、记录器以及整个系统都可获自例如Applied Biosystems (Foster City, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA)以及Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ)。包括但不限于交换基质材料、培养基以及缓冲液的色谱材料也可获自此类公司。

[0681] 使用专用设备如泵可更迅速地实现平衡以及在本文描述的柱色谱过程中的其它步骤如洗涤和洗脱。可商购获得的泵包括但不限于HILOAD®泵P-50、蠕动泵P-1、泵P-901和泵P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0682] 馏分收集器的实例包括RediFrac馏分收集器、FRAC-100和FRAC-200 馏分收集器以及**SUPERFRAC®**馏分收集器 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。也可使用混合器来形成pH值和线性浓度梯度。可商购获得的混合器包括梯度混合器GM-1和管道混合器 (in-line mixer) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0683] 可使用任何可商购获得的监测器来监测色谱过程。此类监测器可用于收集如UV、pH值和传导率的信息。检测器的实例包括监测器UV-1、**UVICORD®S II**、监测器UV-M II、监测器UV-900、监测器UPC-900、监测器pH/C-900以及传导率监测器 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。实际上,整个系统都可商购获得,包括来自Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) 的各种**AKTA®**系统。

[0684] 在本发明的一个实施方案中,例如,可通过首先使所得的经纯化松弛素多肽在尿素中变性,接着将其稀释到在合适pH值下的含有还原剂(如DTT) 的TRIS缓冲液中来将松弛素多肽还原和变性。在另一个实施方案中,使松弛素多肽以约2M至约9M的浓度范围在尿素中变性,接着将其稀释到在约 5.0至约8.0的范围内的pH值下的TRIS缓冲液中。然后可温育这个实施方案的再折叠混合物。在一个实施方案中,将再折叠混合物在室温下温育4小时至24小时。然后,可进一步分离或纯化经还原并变性的松弛素多肽混合物。

[0685] 如本文中所陈述,在执行任何后续分离步骤之前,可调节第一松弛素多肽混合物的pH。另外,可使用本领域中已知的技术来浓缩第一松弛素多肽混合物或其任何后续混合物。而且,可使用本领域普通技术人员已知的技术将包含第一松弛素多肽混合物或其任何后续混合物的洗脱缓冲液更换为适用于下一分离步骤的缓冲液。

[0686] 离子交换色谱在一个实施方案中,并且作为任选的额外步骤,可对第一松弛素多肽混合物执行离子交换色谱。一般参见ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY:PRINCIPLES AND METHODS(目录号18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ))。可商购获得的离子交换柱包括**HITRAP®**柱、**HIPREP®**柱,和**HILOAD®**柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。此类柱利用强阴离子交换剂,如**QSEPHAROSE®**Fast Flow、**QSEPHAROSE®**High Performance,和**QSEPHAROSE®**XL;强阳离子交换剂,如**SPSEPHAROSE®**High Performance、**SPSEPHAROSE®**Fast Flow,和**SPSEPHAROSE®**XL;弱阴离子交换剂,如**DEAESEPHAROSE®**Fast Flow;以及弱阳离子交换剂,如**CMSEPHAROSE®**Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。可在纯化过程的任何阶段对松弛素多肽执行阴离子或阳离子交换柱色谱以分离实质上纯化的松弛素多肽。可使用任何合适的阳离子交换基质来执行阳离子交换色谱步骤。有用的阳离子交换基质包括但不限于纤维状、多孔、无孔、微粒状、珠粒或交联阳离子交换基质材料。此类阳离子交换基质材料包括但不限于纤维素、琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚苯乙烯、二氧化硅、聚醚或任何上述物质的复合物。

[0687] 阳离子交换基质可以为任何合适的阳离子交换剂,包括强阳离子交换剂和弱阳离子交换剂。强阳离子交换剂可能在宽pH值范围内保持离子化,并因此可能能够在宽pH值范围内与松弛素结合。然而,弱阳离子交换剂可能随着pH值变化而丧失离子化。例如,当pH值下降到约pH 4或pH 5以下时,弱阳离子交换剂可能失去电荷。合适的强阳离子交换剂包括但不限于带电官能团,如磺丙基 (SP)、甲基磺酸酯基 (S) 或磺乙基 (SE)。阳离子交换基质可

以为优选具有约2.5至约6.0的松弛素结合pH值范围的强阳离子交换剂。或者,强阳离子交换剂可具有约pH 2.5至约pH 5.5的松弛素结合pH值范围。阳离子交换基质可以为具有约3.0的松弛素结合pH值的强阳离子交换剂。或者,阳离子交换基质可以为优选具有约6.0至约8.0的松弛素结合pH值范围的强阳离子交换剂。阳离子交换基质可以为优选具有约8.0至约12.5的松弛素结合pH值范围的强阳离子交换剂。或者,强阳离子交换剂可具有约pH 8.0至约pH 12.0的松弛素结合pH值范围。

[0688] 在装载松弛素之前,例如可使用数个柱体积的稀弱酸,例如4个柱体积的20mM pH为3的乙酸来平衡阳离子交换基质。平衡后可添加松弛素并且在洗脱实质上纯化的松弛素之前,也可使用弱酸溶液如弱乙酸或磷酸溶液将柱洗涤一次至数次。例如,可使用约2-4个柱体积的20mM pH为3的乙酸来洗涤柱。使用例如2-4个柱体积的0.05M pH为5.5的乙酸钠或使用与0.1 M氯化钠混合的0.05M pH为5.5的乙酸钠进行另外的洗涤。或者,使用本领域中已知的方法,可使用数个柱体积的稀弱碱来平衡阳离子交换基质。

[0689] 或者,可通过使阳离子交换剂基质与具有足够低的pH值或离子强度的缓冲液接触从而置换基质中的松弛素来洗脱实质上纯化的松弛素。洗脱缓冲液的pH值可在约pH 2.5至约pH 6.0的范围内。更具体来说,洗脱缓冲液的 pH值可在约pH 2.5至约pH 5.5、约pH 2.5至约pH 5.0的范围内。洗脱缓冲液可具有约3.0的pH值。另外,洗脱缓冲液的量可在较大范围内改变并且一般将在约2至约10个柱体积的范围内。

[0690] 在使松弛素多肽吸附到阳离子交换剂基质上之后,可通过使基质与具有足够高的pH值或离子强度的缓冲液接触从而置换基质中的松弛素多肽来洗脱实质上纯化的松弛素多肽。适用于实质上纯化的松弛素多肽的高pH值洗脱的缓冲液可包括但不限于浓度在至少约5mM至至少约100mM范围内的柠檬酸盐、磷酸盐、甲酸盐、乙酸盐、HEPES以及MES缓冲液。

[0691] 反相色谱可遵照本领域普通技术人员已知的合适方案进行RP-HPLC 以纯化蛋白质。参见例如Pearson等,ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982);Rivier等,J.CHROM. (1983) 268:112-119;Kunitani等,J.CHROM. (1986) 359:391-402。可对松弛素多肽执行RP-HPLC以分离实质上纯化的松弛素多肽。关于这一点,可使用含有具有多种长度的烷基官能团的二氧化硅衍生化树脂,其包括但不限于至少约C3至至少约C30、至少约C3至至少约C20,或至少约C3至至少约C18树脂。或者,可使用聚合树脂。例如,可使用TosoHaas Amberchrome CG1000sd树脂,其为苯乙烯聚合物树脂。也可使用具有多种烷基链长度的氰基或聚合树脂。此外,可用诸如乙醇的溶剂洗涤RP-HPLC柱。Source RP柱是RP-HPLC柱的另一个实例。

[0692] 可使用含有离子配对剂和有机改质剂如甲醇、异丙醇、四氢呋喃、乙腈或乙醇的合适洗脱缓冲液从RP-HPLC柱洗脱松弛素多肽。最常用的离子配对剂包括但不限于乙酸、甲酸、高氯酸、磷酸、三氟乙酸、七氟丁酸、三乙胺、四甲基铵、四丁基铵和乙酸三乙基铵。可使用一种或多种梯度或等度条件来进行洗脱,其中优选减少分离时间并降低峰宽度的梯度条件。另一种方法涉及使用两种具有不同溶剂浓度范围的梯度。适用于本文中的洗脱缓冲液的实例可包括但不限于乙酸铵和乙腈溶液。

[0693] 疏水性相互作用色谱纯化技术可对松弛素多肽执行疏水性相互作用色谱(HIC)。一般参见HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK:PRINCIPLES AND METHODS(目录号18-1020-90,Amersham Biosciences(Piscataway,NJ),其以引用的方式并

入本文。合适的HIC基质可包括但不限于烷基或芳基取代的基质,如丁基、己基、辛基或苯基取代的基质,所述基质包括琼脂糖、交联琼脂糖、琼脂糖凝胶(sepharose)、纤维素、二氧化硅、葡聚糖、聚苯乙烯、聚(甲基丙烯酸酯)基质以及混合模式树脂,所述混合模式树脂包括但不限于聚乙二胺树脂或丁基或苯基取代的聚(甲基丙烯酸酯)基质。疏水性相互作用柱色谱的市售来源包括但不限于HITRAP®柱、HIPREP®柱和HILOAD®柱(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)。

[0694] 简单地说,在装载之前,可使用本领域普通技术人员已知的标准缓冲液,如乙酸/氯化钠溶液或含有硫酸铵的HEPES来平衡HIC柱。硫酸铵可用作装载HIC柱的缓冲液。在装载松弛素多肽后,然后可使用标准缓冲液和条件来洗涤柱以去除不需要的物质,但将松弛素多肽留在HIC柱上。可用约3至约10个柱体积的标准缓冲液,如含有EDTA和浓度低于平衡缓冲液的硫酸铵的HEPES缓冲液,或乙酸/氯化钠缓冲液等缓冲液来洗脱松弛素多肽。也可使用例如使用磷酸钾梯度的降低的线性盐梯度来洗脱松弛素分子。然后,可例如通过过滤如透滤或超滤来浓缩洗脱液。可利用透滤来去除用于洗脱松弛素多肽的盐。

[0695] 其它纯化技术可对第一松弛素多肽混合物或其任何后续混合物执行使用例如凝胶过滤(GEL FILTRATION:PRINCIPLES AND METHODS(目录号18-1022-18,Amersham Biosciences,Piscataway,NJ),其以引用的方式并入本文)、羟基磷灰石色谱(合适的基质包括但不限于HA-Ultrogel、High Resolution(Calbiochem),CHT陶瓷羟基磷灰石(BioRad),Bio-Gel HTP羟基磷灰石(BioRad))、HPLC、膨胀床吸附、超滤、透滤、冻干等的又一分离步骤,以去除任何过量盐并且用合适的缓冲液来代替所述缓冲液以用于下一分离步骤或甚至最终药物产品的调配。

[0696] 可使用本领域普通技术人员已知的技术在本文描述的每个步骤中监测包括实质上纯化的松弛素多肽在内的松弛素多肽的产率。此类技术也可用于在最后分离步骤后评估实质上纯化的松弛素多肽的产率。例如,可使用数个具有多种烷基链长度的反相高压液相色谱柱如氰基RP-HPLC、C18RP-HPLC以及阳离子交换HPLC和凝胶过滤HPLC中的任一种来监测松弛素多肽的产率。

[0697] 在本发明的特定实施方案中,每个纯化步骤后松弛素的产率可以为每个纯化步骤的起始物质中的松弛素的至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、至少约99.9%,或至少约99.99%。

[0698] 可使用诸如SDS-PAGE的标准技术或通过使用Western印迹法和ELISA测定法测量松弛素多肽来测定纯度。例如,可针对从阴性对照酵母发酵和阳离子交换回收分离的蛋白质产生多克隆抗体。所述抗体也可用于探测污染性宿主细胞蛋白质的存在。

[0699] RP-HPLC材料Vydac C4(Vydac)由硅胶粒子组成,其表面带有C4烷基链。松弛素多肽与蛋白质杂质的分离是基于疏水性相互作用强度的差异。用稀三氟乙酸中的乙腈梯度进行洗脱。使用不锈钢柱(填充有2.8到3.2升Vydac C4硅胶)执行制备型HPLC。通过添加三氟乙酸来酸化羟基磷灰石Ultrogel洗脱物并且将其装载到Vydac C4柱上。使用稀三氟乙酸中的乙腈梯度进行洗涤和洗脱。收集级分并且立即用磷酸盐缓冲液中和。汇集在IPC限度内的松弛素多肽级分。

[0700] DEAE琼脂糖凝胶(Pharmacia)材料由与琼脂糖凝胶珠粒的表面共价结合的二乙基氨基乙基(DEAE)基团组成。通过离子性相互作用来介导松弛素多肽与DEAE基团的结合。乙腈和三氟乙酸无滞留地通过柱。在这些物质被洗掉之后,通过用低pH值的乙酸盐缓冲液洗涤柱来去除痕量杂质。然后用中性磷酸盐缓冲液洗涤柱并且用具有增加的离子强度的缓冲液洗脱松弛素多肽。用DEAE Sepharose fast flow填充柱。调节柱体积以确保松弛素多肽装载量在3-10mg松弛素多肽/毫升凝胶的范围内。用水和平衡缓冲液(磷酸钠/钾)洗涤柱。装载HPLC洗脱物的汇集级分并且用平衡缓冲液洗涤柱。然后用洗涤缓冲液(乙酸钠缓冲液)洗涤柱,接着用平衡缓冲液洗涤。随后,用洗脱缓冲液(氯化钠、磷酸钠/磷酸钾)从柱中洗脱松弛素多肽并根据主洗脱曲线(master elution profile)将其收集成单一级分。将DEAE琼脂糖凝胶柱的洗脱物调节至指定传导率。将所得药物无菌过滤到特富龙(Teflon)瓶中并贮存在-70℃下。

[0701] 可使用的另外的方法包括但不限于去除内毒素的步骤。内毒素为位于革兰氏阴性宿主细胞,例如大肠杆菌的外膜上的脂多糖(LPS)。本领域普通技术人员已知用于降低内毒素水平的方法,并且所述方法包括但不限于使用二氧化硅支撑物、玻璃粉或羟基磷灰石的纯化技术;反相色谱;亲和色谱;尺寸排阻色谱;阴离子交换色谱;疏水性相互作用色谱;这些方法的组合等。可能需要修改或另外的方法以从感兴趣的多肽中去除污染物如共迁移蛋白质。本领域普通技术人员已知用于测量内毒素水平的方法,并且所述方法包括但不限于鲎变形细胞裂解物(Limulus Amebocyte Lysate;LAL)测定。Endosafe™-PTS测定为利用预装载有LAL试剂、发色底物和对照标准内毒素的料筒以及手持式分光光度计的比色、单管系统。替代方法包括但不限于测量浊度并且使用96孔形式的动力学LAL方法。

[0702] 可使用多种方法和程序来评估包含一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素蛋白质的产率和纯度,所述方法和程序包括但不限于Bradford测定、SDS-PAGE、银染色的SDS-PAGE、考马斯(coomassie)染色的SDS-PAGE、质谱(包括但不限于MALDI-TOF)以及本领域普通技术人员已知的用于表征蛋白质的其它方法。

[0703] 另外的方法包括但不限于:与蛋白质染色法结合的SDS-PAGE、免疫印迹法、基质辅助激光解吸附/离子化质谱(MALDI-MS)、液相色谱/质谱、等电聚焦、分析型阴离子交换、色谱聚焦和圆二色谱。

[0704] 已开发出称作选择性压力掺入的活体内方法以使用野生型合成酶的杂乱性(promiscuity)。参见例如N.Budisa,C.Minks,S.Alefeld,W.Wenger,F.M. Dong,L.Moroder和R.Huber,FASEBJ.,13:41(1999)。使其中向细胞供应特定天然氨基酸的相关代谢途径关闭的营养缺陷型菌株在含有有限浓度的天然氨基酸的最低限度培养基中生长,同时抑制靶基因的转录。在静止生长期开始时,天然氨基酸被耗尽并且由非天然氨基酸类似物置换。对重组蛋白表达的诱导使得含有非天然类似物的蛋白质积聚。例如,已使用这种策略将邻氟苯丙氨酸、间氟苯丙氨酸和对氟苯丙氨酸掺入到蛋白质中,并且它们在UV光谱中显示两个可容易地鉴定的特征肩峰,参见例如C.Minks,R.Huber,L.Moroder和N.Budisa,Anal.Biochem.,284:29(2000);已使用三氟蛋氨酸来代替噬菌体T4溶菌酶中的蛋氨酸,从而通过¹⁹F NMR研究其与壳寡糖配体的相互作用,参见例如H.Duewel,E.Daub,V.Robinson和J.F.Honek,Biochemistry,36:3404(1997);并且已掺入三氟亮氨酸来代替亮氨酸,从而使亮氨酸拉链蛋白的热稳定性和化学稳定性增加。参见例如Y.Tang,G. Ghirlanda,

W.A.Petka, T.Nakajima, W.F.DeGrado和D.A.Tirrell, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 40:1494 (2001)。而且,将硒代蛋氨酸和碲代蛋氨酸掺入到各种重组蛋白中以促进X射线结晶学中的相溶解。参见例如W.A. Hendrickson, J.R.Horton和D.M.Lemaster, *EMBOJ.*, 9:1665 (1990); J.O. Boles, K.Lewinski, M.Kunkle, J.D.Odom, B.Dunlap, L.Lebiada和M.Hatada, *Nat.Struct.Biol.*, 1:283 (1994); N.Budisa, B.Steipe, P.Demange, C.Eckerskom, J.Kellermann和R.Huber, *Eur.J.Biochem.*, 230:788 (1995); 以及N.Budisa, W. Karnbrock, S.Steinbacher, A.Humm, L.Prade, T.Neuefeind, L.Moroder和R. Huber, *J.Mol.Biol.*, 270:616 (1997)。也已有效掺入具有烯或炔官能团的蛋氨酸类似物,从而允许通过化学方式对蛋白质进行另外的修饰。参见例如J.C. van Hest和D.A.Tirrell, *FEBSLett.*, 428:68 (1998); J.C..van Hest, K,L.Kiick 和D.A,Tirrell, *J.Am.Chem.Soc.* 122:1282 (2000); 以及K.L.Kiick和D.A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); 美国专利第6,586,207号; 美国专利公布第2002/0042097号, 其以引用的方式并入本文。

[0705] 这种方法的成功取决于氨酰基tRNA合成酶对非天然氨基酸类似物的识别,所述合成酶一般而言需要高选择性来确保蛋白质翻译的保真度。一种扩展这种方法的范围的方式在于放宽氨酰基tRNA合成酶的底物特异性,这已在有限数目的情况下实现。例如,在大肠杆菌苯丙氨酰基tRNA合成酶(PheRS) 中由Gly置换Ala²⁹⁴可增加底物结合袋的尺寸,并且导致对氯苯丙氨酸 (p-Cl-Phe) 使tRNAPhe酰化。参见M.Tbba, P.Kast和H.Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994)。带有这种突变PheRS的大肠杆菌菌株允许掺入对氯苯丙氨酸或对溴苯丙氨酸来代替苯丙氨酸。参见例如M.Ibba和H. Hennecke, *FEBSLett.*, 364:272 (1995); 以及N.Sharma, R.Furter, P.Kast和D. A.Tirrell, *FEBSLett.*, 467:37 (2000)。类似地,接近大肠杆菌酪氨酰基tRNA 合成酶的氨基酸结合位点的点突变Phe130Ser被证明允许氮杂酪氨酸比酪氨酸更有效地掺入。参见F.Hamano-Takaku, T.Iwama, S.Saito-Yano, K.Takaku, Y.Monden, M.Kitabatake, D.Soil和S.Nishimura, *J.Biol.Chem.*, 275:40324 (2000)。

[0706] 在活体内将非天然氨基酸掺入到蛋白质中的另一种策略是修饰具有校对机制的合成酶。这些合成酶无法区分并且因此活化在结构上与同源天然氨基酸类似的氨基酸。这种错误在单独位点上得到修正,这使来自tRNA的错误装配(mischarged)的氨基酸去酰化从而保持蛋白质翻译的保真度。如果合成酶失去校对活性,那么错误活化的结构类似物可避开编辑功能并且被掺入。目前已用缬氨酰基tRNA合成酶(ValRS)证实这种方法。参见V.Doring, H.D. Mootz, L.A.Nangle, T.L.Hendrickson, V.de Crecy-Lagard, P.Schimmel和P. Marliere, *Science*, 292:501 (2001)。ValRS可利用Cys、Thr或氨基丁酸(Abu) 使tRNAVal错误氨酰基化;随后,通过编辑结构域水解这些非同源氨基酸。在使大肠杆菌染色体随机诱变之后,选择在ValRS的编辑位点中具有突变的突变大肠杆菌菌株。这种编辑缺陷型ValRS错误地使tRNAVal装配有Cys。因为Abu与Cys在空间上类似(Cys的-SH基团由Abu中的-CH₃置换),所以当这种突变大肠杆菌菌株在存在Abu的情况下生长时,突变ValRS也将Abu掺入到蛋白质中。质谱分析显示,在天然蛋白质中的每个缬氨酸位置处约24%的缬氨酸被Abu置换。

[0707] 固相合成和半合成方法也已允许合成含有新颖氨基酸的许多蛋白质。例如,参见以下出版物和其中引用的参考文献,其如下:Crick, F.H.C., Barrett, L.Brenner,

S.Watts-Tobin,R.General nature of the genetic code for proteins. Nature,192: 1227-1232 (1961); Hofmann,K.,Bohn,H.Studies on polypeptides. XXXVI.The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment,J.Am Chem,88 (24):5914-5919 (1966);Kaiser, E.T.Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes,Acc Chem Res,22:47-54 (1989);Nakatsuka,T.,Sasaki,T.,Kaiser,E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin,J Am Chem Soc, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer,M.,Kent,S B H.Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides:backbone-engineered HIV protease, Science,256 (5054):221-225 (1992);Chaiken,I.M.Semisynthetic peptides and proteins,CRC Crit Rev Biochem,11 (3):255-301 (1981);Offord, R.E.Protein engineering by chemical means?Protein Eng.,1 (3):151-157 (1987);以及Jackson, D.Y.,Burnier,J.,Quan,C.,Stanley,M.,Tom,J.,Wells,J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues,Science,266 (5183):243 (1994)。

[0708] 已使用化学修饰在活体外将包括辅因子、自旋标记和寡核苷酸的多种非天然侧链引入到蛋白质中。参见例如Corey,D.R.,Schultz,P.G.Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease,Science,238 (4832): 1401-1403 (1987);Kaiser,E.T.,Lawrence D.S.,Rokita,S.E.The chemical modification of enzymatic specificity,Annu Rev Biochem,54:565-595 (1985); Kaiser,E.T., Lawrence,D.S.Chemical mutation of enzyme active sites,Science, 226 (4674):505-511 (1984);Neet,K.E.,Nanci A,Koshland,D.E.Properties of thiol-subtilisin, JBiol.Chem,243 (24):6392-6401 (1968);Polgar,L.et M.L. Bender.A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin.J.Am Chem Soc,88:3153-3154 (1966);以及Pollack,S.J., Nakayama,G.Schultz,P.G.Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, Science.242 (4881):1038-1040 (1988)。

[0709] 或者,采用以化学方式修饰的氨酰基tRNA的生物合成方法已用于将数种生物物理探针掺入到在活体外合成的蛋白质中。参见以下出版物和其中所引用的参考文献: Brunner,J.New Photolabeling and crosslinking methods, Annu.Rev Biochem,62: 483-514 (1993);以及Krieg,U.C.,Walter,P.,Hohnson, A.E.Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle,Proc.Natl.Acad.Sci, 83 (22):8604-8608 (1986)。

[0710] 先前已证明,可通过向利用含有所需琥珀无义突变的基因编程的蛋白质合成反应中添加以化学方式氨酰基化的抑制因子tRNA而在活体外将非天然氨基酸位点特异性地掺入到蛋白质中。使用这些途径,人们可使用特定氨基酸的营养缺陷型菌株,用密切结构同源物取代20种常见氨基酸中的许多氨基酸,例如用氟苯丙氨酸取代苯丙氨酸。参见例如Noren,C.J.,Anthony-Cahill, Griffith,M.C.,Schultz,P.G.A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins,Science,

244:182-188 (1989); M.W. Nowak 等, *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa 等, *FASEB J.* 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); 以及 Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995)。

[0711] 例如, 制备识别终止密码子 UAG 的抑制因子 tRNA 并且用非天然氨基酸以化学方式使其氨酰基化。使用常规定点诱变在蛋白质基因中的感兴趣位点处引入终止密码子 TAG。参见例如 Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16 (3):791-802 (1988)。当将酰基化抑制因子 tRNA 和突变基因组合到活体外转录/翻译系统中时, 非天然氨基酸响应于 UAG 密码子而被掺入, 这得到在指定位置处含有所述氨基酸的蛋白质。使用 [³H]-Phe 的实验以及使用 α -羟基酸的实验证实, 所需氨基酸仅在由 UAG 密码子指定的位置处被掺入并且这种氨基酸未在蛋白质中的任何其它位点处被掺入。参见例如 Noren 等, 同上文; Kobayashi 等, (2003) *Nature Structural Biology* 10 (6):425-432; 以及 Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255 (5041):197-200 (1992)。

[0712] 可采用包括但不限于化学或酶促氨酰基化的任何方法或技术利用所需氨基酸使 tRNA 氨酰基化。

[0713] 可通过氨酰基 tRNA 合成酶或通过包括但不限于核糖酶的其它酶分子来实现氨酰基化。术语“核糖酶”可与“催化性 RNA”互换。Cech 和同事 (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle 等, 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) 证实存在可充当催化剂的天然存在 RNA (核糖酶)。然而, 尽管仅证明这些天然 RNA 催化剂对核糖核酸底物具有裂解和剪接作用, 但关于核糖酶人工开发的新近发展已将催化谱系扩大到各种化学反应。研究已鉴定出可催化自身 (2') 3' 末端上的氨酰基 RNA 键的 RNA 分子 (Illangakere 等, 1995 *Science* 267:643-647), 以及可将氨基酸从一种 RNA 分子转移到另一种 RNA 分子的 RNA 分子 (Lohse 等, 1996, *Nature* 381:442-444)。

[0714] 美国专利申请公布 2003/0228593 (其以引用的方式并入本文) 描述了构建核糖酶的方法以及它们在利用天然编码和非天然编码氨基酸使 tRNA 氨酰基化中的用途。可使 tRNA 氨酰基化的包括但不限于核糖酶的酶分子的底物固定化形式可使得氨酰基化产物能被有效地亲和纯化。合适的底物的实例包括琼脂糖、琼脂糖凝胶和磁性珠粒。用于氨酰基化的核糖酶的底物固定化形式的制备和使用描述于 *Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084 以及美国专利申请公布 2003/0228593 中, 其以引用的方式并入本文。

[0715] 化学氨酰基化方法包括但不限于避免在氨酰基化过程中使用合成酶的由以下文献介绍的方法: Hecht 和同事 (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) 以及由 Schultz、

Chamberlin、Dougherty和其它人(Cornish, V.W.; Mendel, D.; Schultz, P.G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 621; Robertson, S.A.; Ellman, J.A.; Schultz, P.G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 2722; Noren, C.J.; Anthony-Cahill, S.J.; Griffith, M.C.; Schultz, P.G. *Science* 1989, 244, 182; Bain, J.D.; Glabe, C.G.; Dix, T.A.; Chamberlin, A.R. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8013; Bain, J.D.等, *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H.A.; Dougherty, D.A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti等 *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M.W.等 *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M.E.等 *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hoshida, T.等 *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), 所述文献以引用的方式并入本文。此类方法或其它化学氨酰基化方法可用于使tRNA分子氨酰基化。

[0716] 产生催化性RNA的方法可涉及产生单独的随机化核糖酶序列的池, 对所述池进行定向演化, 针对所需氨酰基化活性筛选所述池, 以及选择显示出所需氨酰基化活性的那些核糖酶的序列。

[0717] 核糖酶可包含促进酰化活性的基元和/或区, 如GGU基元和富含U的区。例如, 已报道富含U的区可促进氨基酸底物的识别, 并且GGU基元可与 tRNA的3'末端形成碱基对。GGU基元和富含U的区的组合同时促进氨基酸与tRNA的同时识别, 并且从而促进tRNA的3'末端的氨酰基化。

[0718] 可通过使用与tRNA^{Asn}cccg缀合的部分随机化r24mini进行活体外选择, 接着系统性工程改造在活性克隆中发现的一致序列来产生核糖酶。由这种方法获得的示例性核糖酶被称作“Fx3核糖酶”并且描述于美国公布申请第 2003/0228593号(其内容以引用的方式并入本文)中, 其充当合成各种装配有同源非天然氨基酸的氨酰基tRNA的通用催化剂。

[0719] 在底物上固定化可用于促成氨酰基化tRNA的有效亲和性纯化。合适的底物的实例包括但不限于琼脂糖、琼脂糖凝胶和磁性珠粒。可利用RNA的化学结构将核糖酶固定在树脂上, 例如, 可用高碘酸盐氧化RNA核糖上的 3'-顺式二醇以产生相应的二醛, 从而促进RNA在树脂上的固定化。可使用包括廉价酰肼树脂在内的各种类型的树脂, 其中还原性胺化使树脂与核糖酶之间的相互作用产生不可逆连接。可通过这项柱上氨酰基化技术显著促进氨酰基tRNA的合成。Kourouklis等, *Methods* 2005; 36: 239-4描述了一种基于柱的氨酰基化系统。

[0720] 可以多种方式实现氨酰基化tRNA的分离。一种合适的方法是用缓冲液从柱中洗脱氨酰基化tRNA, 所述缓冲液例如具有10mM EDTA的乙酸钠溶液、含有50mM N-(2-羟基乙基)哌嗪-N'-(3-丙烷磺酸)、12.5mM KCl (pH 7.0)、10mM EDTA的缓冲液, 或简单的经EDTA缓冲的水(pH 7.0)。

[0721] 可将氨酰基化tRNA添加到翻译反应中以便将使tRNA氨酰基化的氨基酸掺入到翻译反应所产生的多肽中的所选位置中。可使用本发明的氨酰基化 tRNA的翻译系统的实例包括但不限于细胞裂解物。细胞裂解物提供由所输入的mRNA活体外翻译多肽所必需的反应组分。此类反应组分的实例包括但不限于核糖体蛋白、rRNA、氨基酸、tRNA、GTP、ATP、翻译起始和延伸因子以及翻译相关的另外的因子。另外, 翻译系统可为分批翻译或间隔翻译(compartmentalized translation)。分批翻译系统将反应组分组合到单一隔室中, 而间隔翻译系统将翻译反应组分与可抑制翻译效率的反应产物分隔开。这些翻译系统可商购获得。

[0722] 进一步地,可使用偶合转录/翻译系统。偶合转录/翻译系统允许将所输入的DNA转录为相应mRNA,而所述mRNA继而由反应组分进行翻译。可商购获得的偶合转录/翻译的实例为Rapid Translation System(RTS,Roche Inc.)。所述系统包括含有大肠杆菌裂解物的混合物以提供诸如核糖体和翻译因子的翻译组分。另外,包括RNA聚合酶以将所输入DNA转录为mRNA 模板用于翻译。RTS可经由在包括供应/消耗隔室和转录/翻译隔室在内的反应隔室之间插入的膜来分隔反应组分。

[0723] 可由包括但不限于转移酶、聚合酶、催化抗体、多功能蛋白质等的其它试剂进行tRNA的氨酰基化。

[0724] Stephan在Scientist 2005年10月10日;第30-33页中描述了将非天然编码氨基酸掺入到蛋白质中的另外的方法。Lu等在Mol Cell.2001年10月;8(4):759-69中描述了一种以化学方式使蛋白质与含有非天然氨基酸的合成肽化学连接(经表达的蛋白质连接)的方法。

[0725] 也已使用微注射技术将非天然氨基酸掺入到蛋白质中。参见例如M.W. Nowak, P.C.Kearney, J.R.Sampson, M.E.Saks, C.G.Labarca, S.K. Silverman, W.G.Zhong, J.Thorson, J.N.Abelson, N.Davidson, P.G.Schultz, D. A.Dougherty和H.A.Lester, Science, 268:439 (1995);以及D.A.Dougherty, Curr.Opin.Chem.Biol., 4:645 (2000)。将爪蟾卵母细胞(Xenopus oocyte)与活体外制得的以下两种RNA物质共同注射:在感兴趣的氨基酸位置处具有UAG终止密码子的编码靶蛋白的mRNA,和利用所需非天然氨基酸氨酰基化的琥珀抑制因子tRNA。然后,卵母细胞的翻译机构将非天然氨基酸插入在由UAG指定的位置处。这种方法已允许一般不适用于活体外表达系统的整体膜蛋白的活体内结构-功能研究。实例包括将荧光氨基酸掺入到速激肽神经激肽-2受体中通过荧光共振能量转移来测量距离,参见例如G. Turcatti, K.Nemeth, M,D.Edgerton, U.Meseth, F.Talabot, M.Peitsch, J. Knowles, H.Vogel和A.Chollet, J.Biol.Chem., 271:19991 (1996);掺入生物素化氨基酸以鉴定离子通道中表面暴露的残基,参见例如J.P.Gallivan, H.A. Lester和D.A.Dougherty, Chem.Biol., 4:739 (1997);使用笼化的酪氨酸类似物实时监测离子通道中的构象变化,参见例如J.C.Miller, S.K.Silverman, P. M.England, D.A.Dougherty和H.A.Lester, Neuron, 20:619 (1998);以及使用 α 羟基氨基酸改变用于探究其门控机制的离子通道主链。参见例如P.M. England, Y.Zhang, D.A.Dougherty和H.A.Lester, Cell, 96:89 (1999);以及T. Lu, A.Y.Ting, J.Mainland, L.Y.Jan, P.G.Schultz和J.Yang, Nat.Neurosci., 4:239 (2001)。

[0726] 在活体内直接将非天然氨基酸掺入到蛋白质中的能力提供多种优点,其包括但不限于突变蛋白的高产率、技术简易性、在细胞中或可能在活生物体中研究突变蛋白的可能性以及这些突变蛋白在治疗性治疗和诊断应用中的用途。将具有各种尺寸、酸度、亲核性、疏水性及其它性质的非天然氨基酸引入到蛋白质中的能力可极大地扩展我们理性并系统性地操纵蛋白质结构的能力,从而探究蛋白质功能并且产生具有新颖性质的新蛋白质或生物体。

[0727] 在位点特异性地掺入para-F-Phe的一次尝试中,将酵母琥珀抑制因子tRNA^{Phe}CUA/苯丙氨酰基tRNA合成酶对用于抗p-F-Phe的Phe营养缺陷型大肠杆菌菌株中。参见例如R.Furter, ProteinSci., 7:419 (1998)。

[0728] 使用不含细胞的(活体外)翻译系统获得本发明松弛素多核苷酸的表达也为是可能的。翻译系统可为细胞性或不含细胞的翻译系统,并且可为原核或真核翻译系统。细胞翻译系统包括但不限于其中所需核酸序列可被转录为 mRNA并且所述mRNA可被翻译的全细胞制备品,例如渗透细胞或细胞培养物。不含细胞的翻译系统可商购获得,并且许多不同的类型和系统是熟知的。不含细胞的系统的实例包括但不限于原核细胞裂解物,如大肠杆菌裂解物;以及真核细胞裂解物,如麦芽提取物、昆虫细胞裂解物、兔网织红细胞裂解物、兔卵母细胞裂解物和人细胞裂解物。当对所得蛋白质加以糖基化、磷酸化或以其它方式修饰时,可优选真核细胞提取物或裂解物,这是因为许多此类修饰只可能在真核系统中发生。这些提取物和裂解物中的一些可商购获得(Promega;Madison,Wis.;Stratagene;La Jolla, Calif.;Amersham;Arlington Heights, Ill.;GIBCO/BRL;Grand Island,N.Y.)。也可用膜提取物如含有微粒体膜的犬胰腺提取物,其可用于翻译分泌蛋白。在可包括mRNA作为模板(活体外翻译)或包括DNA作为模板(组合型活体外转录和翻译)的这些系统中,由核糖体指导活体外合成。已进行相当多的尝试来开发不含细胞的蛋白质表达系统。参见例如Kim, D.M.和J.R.Swartz,Biotechnology and Bioengineering,74:309-316(2001);Kim,D.M.和J.R.Swartz,Biotechnology Letters,22,1537-1542,(2000);Kim,D.M.,和J.R.Swartz,Biotechnology Progress,16,385-390,(2000);Kim,D.M.,和J.R.Swartz,Biotechnology and Bioengineering,66,180-188,(1999);以及Patnaik,R.和J.R.Swartz,Biotechniques 24,862-868,(1998);美国专利第6,337,191号;美国专利公布第2002/0081660号;WO 00/55353;WO 90/05785,其以引用的方式并入本文。另一种可用于表达包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽的途径包括 mRNA-肽融合技术。参见例如R.Roberts和J.Szostak,Proc.Natl Acad.Sci. (USA) 94:12297-12302(1997);A.Frankel等,Chemistry&Biology 10: 1043-1050(2003)。在这种途径中,在核糖体上将与嘌呤霉素(puromycin)连接的mRNA模板翻译为肽。如果已对一种或多种tRNA分子加以修饰,那么也可将非天然氨基酸掺入到肽中。在已读取最后一个mRNA密码子之后,嘌呤霉素捕获肽的C端。如果发现所得mRNA-肽缀合物在活体外测定中具有引人关注的性质,那么容易由mRNA序列揭示其特性。用这种方式,可筛选包含一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素多肽的文库,以鉴定具有所需性质的多肽。最近,已报道利用经纯化组分的活体外核糖体翻译,其允许合成被非天然编码氨基酸取代的肽。参见例如A.Forster等,Proc.Natl Acad.Sci. (USA) 100:6353(2003)。

[0729] 也可使用重构翻译系统。已成功地使用纯化翻译因子的混合物以及裂解物或补充有纯化翻译因子如起始因子-1(IF-1)、IF-2、IF-3(α 或 β)、延伸因子 T(EF-Tu)或终止因子的裂解物的组合将mRNA翻译为蛋白质。不含细胞的系统也可为偶合转录/翻译系统,其中如Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编辑,Wiley InterScience,1993)(其以引用的方式特别并入本文)中所述,DNA被引入到所述系统中,被转录成mRNA并且所述mRNA被翻译。在真核转录系统中转录的RNA可以为异核RNA(hnRNA)或5'端戴帽(7-甲基鸟苷)和3'端加聚腺苷酸尾的成熟mRNA的形式,其在某些翻译系统中可为优点。例如,在网织红细胞裂解物系统中以高效率翻译戴帽的mRNA。

[0730] 与松弛素多肽偶联的大分子聚合物

[0731] 可使用本文描述的组合物、方法、技术和策略来实现对本文描述的非天然氨基酸

多肽的各种修饰。这些修饰包括将另外的官能团掺入到多肽的非天然氨基酸组分上,所述官能团包括但不限于标记、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和性标记、光亲和性标记、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖类、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记、荧光团、含金属的部分、放射性部分、新颖官能团、与其它分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化部分、光化辐射可激发的部分、可光致异构化部分、生物素、生物素衍生物、生物素类似物、掺有重原子的部分、可化学裂解的基团、可光裂解的基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性部分、经同位素标记的部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、插入基团、发色团、能量转移剂、生物活性剂、可检测标记、小分子、量子点、纳米传递素、放射性核苷酸、放射性传递素、中子俘获剂,或上述物质的任何组合,或任何其它所需化合物或物质。作为本文描述的组合物、方法、技术和策略的说明性、非限制性实例,以下描述将集中在将大分子聚合物添加到非天然氨基酸多肽上,同时应理解,针对此描述的组合物、方法、技术和策略也适用于(必要时适当修改,并且本领域技术人员可用本文中的公开内容进行所述修改)添加其它官能团,所述其它官能团包括但不限于上文列出的官能团。

[0732] 多种大分子聚合物和其它分子可与本发明松弛素多肽连接以调节松弛素多肽的生物性质,和/或给松弛素分子提供新颖的生物性质。这些大分子聚合物可经由天然编码氨基酸、经由非天然编码氨基酸,或者天然或非天然氨基酸的任何官能取代基,或者添加到天然或非天然氨基酸中的任何取代基或官能团与松弛素多肽连接。聚合物的分子量可具有宽范围,包括但不限于介于约100Da与约100,000Da或100,000Da以上之间。聚合物的分子量可介于约100Da与约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000 Da、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、800 Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da,和100Da。在一些实施方案中,聚合物的分子量介于约100Da与约50,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量介于约100Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量介于约1,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量介于约5,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量介于约10,000Da与约40,000Da之间。

[0733] 本发明提供了实质上均质的聚合物:蛋白质缀合物的制备品。如本文所使用的“实质上均质”意思是观察到聚合物:蛋白质缀合物分子大于总蛋白质的一半。所述聚合物:蛋白质缀合物具有生物活性,并且本文中提供的本发明“实质上均质”的聚乙二醇化松弛素多肽制备品是这样的制备品,其足够均质以致显示均质制备品的优点,例如易于在临床应用中预测各批次之间的药物动力学。

[0734] 也可选择制备聚合物:蛋白质缀合物分子的混合物,并且本文提供的优点在于可选择包括在所述混合物中的单一聚合物:蛋白质缀合物的比例。因此,需要时,可制备各种蛋白质与各种数目的所连接的聚合物部分(即二、三、四等)的混合物,并且将所述缀合物与使用本发明方法制备的单一聚合物:蛋白质缀合物组合,并获得具有预定的单一聚合物:

蛋白质缀合物比例的混合物。

[0735] 所选聚合物可为水溶性的,使得它所连接的蛋白质在水性环境如生理环境中不沉淀。聚合物可为支化或未支化的。对于最终产品制备品的治疗性应用来说,聚合物将为药学上可接受的。

[0736] 聚合物的实例包括但不限于聚烷基醚及其烷氧基封端的类似物(例如聚氧乙二醇、聚氧乙二醇/丙二醇及其甲氧基或乙氧基封端的类似物,尤其聚氧乙二醇,后者也被称作聚乙二醇或PEG);聚乙烯吡咯烷酮;聚乙烯基烷基醚;聚噁唑啉、聚烷基噁唑啉和聚羟基烷基噁唑啉;聚丙烯酰胺、聚烷基丙烯酸酰胺和聚羟基烷基丙烯酸酰胺(例如聚羟基丙基甲基丙烯酸酰胺及其衍生物);聚羟基烷基丙烯酸酯;聚唾液酸及其类似物;亲水性肽序列;聚糖及其衍生物,其包括葡聚糖和葡聚糖衍生物,例如羧甲基葡聚糖、硫酸葡聚糖、氨基葡聚糖;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素、羟基烷基纤维素;几丁质及其衍生物,例如壳聚糖、琥珀酰基壳聚糖、羧甲基几丁质、羧甲基壳聚糖;透明质酸及其衍生物;淀粉;海藻酸盐;硫酸软骨素;白蛋白;支链淀粉和羧甲基支链淀粉;聚氨基酸及其衍生物,例如聚谷氨酸、聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚天冬酰胺;马来酸酐共聚物,如苯乙烯马来酸酐共聚物、二乙烯基乙醚马来酸酐共聚物;聚乙烯醇;它们的共聚物;它们的三聚物;它们的混合物;以及前述物质的衍生物。

[0737] 聚乙二醇分子与蛋白质分子的比例将改变,它们在反应混合物中的浓度也将改变。一般而言,可通过所选聚乙二醇的分子量和可提供的可用反应性基团的数目来确定最佳比率(就存在最小量的过量的未反应蛋白质或聚合物的反应的效率来说)。当涉及分子量时,通常聚合物的分子量越高,可与蛋白质连接的聚合物分子的数目就越少。类似地,当优化这些参数时,应将聚合物的支化考虑在内。一般地,分子量越高(或支链越多),聚合物:蛋白质比率就越高。

[0738] 如本文所使用,并且当考虑PEG:松弛素多肽缀合物时,术语“治疗有效量”是指使患者得到所需益处的量。所述量将随个体而变化并且将视许多因素而定,包括患者的整体身体状况和待治疗病状的潜在病因。用于治疗松弛素多肽的量提供可接受的变化速率并且将所需反应维持在有益水平上。本领域普通技术人员使用可公开获得的材料和程序可容易地确定本发明组合物的治疗有效量。

[0739] 水溶性聚合物可为任何结构形式,包括但不限于线性、分叉或支化形式。水溶性聚合物通常为聚(亚烷基二醇),如聚(乙二醇)(PEG),但也可使用其它水溶性聚合物。举例来说,使用PEG来描述本发明的某些实施方案。

[0740] PEG是熟知的水溶性聚合物,其可商购获得或可根据本领域普通技术人员已知的方法(Sandler和Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, 第3卷, 第138-161页)通过乙二醇的开环聚合来制备。术语“PEG”广泛用于涵盖任何聚乙二醇分子而不用考虑PEG的尺寸或其末端的修饰,并且可由下式表示为与松弛素多肽连接:

[0741] $\text{XO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Y}$

[0742] 其中 n 为2至10,000并且 X 为H或末端修饰,其包括但不限于 C_{1-4} 烷基、保护基或末端官能团。

[0743] 在一些情况下,本发明中所用的PEG在一端用羟基或甲氧基封端,即 X 为H或 CH_3 (“甲氧基PEG”)。或者,PEG可以用反应性基团封端,从而形成双官能聚合物。典型反应性基

团可包括通常用于与20种常见氨基酸中所见的官能团反应的反应性基团(包括但不限于马来酰亚胺基、活化碳酸酯(包括但不限于对硝基苯酯)、活化酯(包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯酯)和醛),以及对20种常见氨基酸呈惰性、但与非天然编码氨基酸中存在的互补官能团特异性反应的官能团(包括但不限于叠氮基、炔基)。应注意,在上式中由Y表示的PEG的另一端将与松弛素多肽直接连接或经由天然存在氨基酸或非天然编码氨基酸间接地与松弛素多肽连接。举例来说,Y可为与多肽的胺基(包括但不限于赖氨酸的 ϵ 胺或N端)连接的酰胺、氨基甲酸酯或尿素键。或者,Y可为与硫醇基团(包括但不限于半胱氨酸的硫醇基团)连接的马来酰亚胺键。或者,Y可为与经由20种常见氨基酸通常不可接近的残基连接的键。例如,PEG上的叠氮基可与松弛素多肽上的炔基反应从而形成休斯根[3+2]环加成产物。或者,PEG上的炔基可与非天然编码氨基酸中存在的叠氮基反应从而形成类似产物。在一些实施方案中,强亲核试剂(包括但不限于胂、酰胂、羟胺、氨基脒)可与非天然编码氨基酸中存在的醛或酮基反应从而形成胂、胂或缩氨基脒,在一些情况下,适当时可适当通过用适当还原剂处理而进一步还原胂、胂或缩氨基脒。或者,强亲核试剂可经由非天然编码氨基酸而被掺入到松弛素多肽中并且可用于优先与水溶性聚合物中存在的酮或醛基反应。

[0744] 可按照实际需要使用任何分子质量的PEG,所述分子质量视需要包括但不限于约100道尔顿(Da)至100,000Da或100,000Da以上(包括但不限于有时为0.1-50kDa或10-40kDa)。PEG的分子量可具有宽范围,包括但不限于介于约100Da与约100,000Da或100,000Da以上之间。PEG可介于约100Da与约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da,和100Da。在一些实施方案中,PEG介于约100Da与约50,000Da之间。在一些实施方案中,PEG介于约100Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG介于约1,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG介于约5,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG介于约10,000Da与约40,000Da之间。也可使用支链PEG,其包括但不限于每个链具有在1-100kDa(包括但不限于1-50kDa或5-20kDa)范围内的MW的PEG分子。支链PEG的每个链的分子量可以为,包括但不限于介于约1,000Da与约100,000Da或100,000Da以上之间。支链PEG的每个链的分子量可介于约1,000Da与约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da,和1,000Da。在一些实施方案中,支链PEG的每个链的分子量介于约1,000Da与约50,000Da之间。在一些实施方案中,支链PEG的每个链的分子量介于约1,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,支链PEG的每个链的分子量介于约5,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,支链PEG的每个链的分子量介于约5,000Da与约20,000Da之间。多种PEG分子描述于,包括但不限于Shearwater Polymers, Inc.目录、Nektar Therapeutics目录中,所述目录以引用的方式并入本文。

[0745] 一般地,PEG分子的至少一个末端可用于与非天然编码氨基酸反应。例如,可使用

具有与氨基酸侧链反应的炔基和叠氮部分的PEG衍生物来使PEG与如本文描述的非天然编码氨基酸连接。如果非天然编码氨基酸包含叠氮基,那么PEG通常将含有炔基部分以实现[3+2]环加成产物的形成,或含有膦基的活化PEG物质(即酯、碳酸酯)以实现酰胺键的形成。或者,如果非天然编码氨基酸包含炔,那么PEG通常将含有叠氮部分以实现[3+2]休斯根环加成产物的形成。如果非天然编码氨基酸包含羰基,那么PEG通常将包含有效亲核试剂(包括但不限于酰肼、肼、羟胺或氨基脒官能团)以便分别实现相应脎、肟和缩氨基脒键的形成。在其它替代方案中,可使用上述反应性基团的相反取向,即可使非天然编码氨基酸中的叠氮部分与含有炔的PEG衍生物反应。

[0746] 在一些实施方案中,具有PEG衍生物的松弛素多肽变异体含有可与非天然编码氨基酸侧链上存在的化学官能团反应的化学官能团。

[0747] 在一些实施方案中,本发明提供了含叠氮基和乙炔的聚合物衍生物,其包含具有约800Da至约100,000Da的平均分子量的水溶性聚合物主链。水溶性聚合物的聚合物主链可为聚(乙二醇)。然而,应理解,包括但不限于聚(乙二醇)和其它相关聚合物(包括聚(葡聚糖)和聚(丙二醇))的多种水溶性聚合物也适用于实施本发明,并且术语PEG或聚(乙二醇)的使用旨在涵盖并且包括所有此类分子。术语PEG包括但不限于呈任何形式的聚(乙二醇),包括双官能PEG、多臂PEG、衍生化PEG、分叉PEG、支化PEG、侧接PEG(即具有一个或多个侧接到聚合物主链上的官能团的PEG或相关聚合物)或具有可降解键的PEG。

[0748] PEG通常为透明、无色、无味的,可溶于水中,对热稳定,对许多化学试剂呈惰性,不水解或变质,并且一般无毒。聚(乙二醇)被认为是生物相容性的,也就是说PEG能够与活组织或生物体共存而不引起危害。更具体来说,PEG实质上为非免疫原性的,也就是说PEG不倾向于在身体内产生免疫反应。当与身体内具有一些所需功能的分子如生物活性剂连接时,PEG倾向于掩蔽所述试剂并且可减少或消除任何免疫反应,使得生物体可耐受所述试剂的存在。PEG缀合物倾向于不产生实质免疫反应或引起凝血或其它不需要的作用。具有式 $\text{--CH}_2\text{CH}_2\text{O--}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{--CH}_2\text{CH}_2\text{--}$ (其中n为约3至约4000,通常约20至约2000)的PEG适用于本发明中。在本发明的一些实施方案中,具有约800Da至约100,000Da的分子量的PEG尤其可用作聚合物主链。PEG的分子量可具有宽范围,包括但不限于介于约100Da与约100,000 Da或100,000Da以上之间。PEG的分子量可介于约100Da与约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000 Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000 Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000 Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500 Da、400Da、300Da、200Da,和100Da。在一些实施方案中,PEG的分子量介于约100Da与约50,000Da之间。在一些实施方案中,PEG的分子量介于约100Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG的分子量介于约1,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG的分子量介于约5,000 Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,PEG的分子量介于约10,000Da与约40,000Da之间。

[0749] 聚合物主链可为线性或支化的。支化聚合物主链在本领域中一般是已知的。通常,支化聚合物具有一个中心分支核心部分和多个与中心分支核心连接的线性聚合物链。PEG通常以支化形式使用,所述支化形式可通过将氧化乙烯添加到各种多元醇,如甘油、甘油寡聚物、季戊四醇和山梨糖醇上来制备。中心分支部分也可源自数种氨基酸,如赖氨酸。支化

聚(乙二醇)可以一般形式如 $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ 表示,其中R源自诸如甘油、甘油寡聚物或季戊四醇的核心部分,并且m表示臂的数目。多臂PEG分子,如在美国专利第 5,932,462号、第5,643,575号、第5,229,490号、第4,289,872号、美国专利申请2003/0143596、W0 96/21469,以及W0 93/21259中描述的多臂PEG 分子也可用作聚合物主链,所述文献中的每一篇均以引用的方式完整地并入本文。

[0750] 支化PEG也可为由 $\text{PEG}(-\text{YCHZ}_2)_n$ 表示的分叉PEG形式,其中Y为连接基团并且Z为通过规定长度的原子链与CH连接的活化末端基团。

[0751] 又一种支化形式,侧接PEG沿PEG主链而不是在PEG链的末端处具有诸如羧基的反应性基团。

[0752] 除这些PEG形式之外,也可制备主链中具有弱键或可降解键的聚合物。例如,可制备聚合物主链中具有经受水解作用的酯键的PEG。如下文所示,这一水解作用使聚合物裂解为具有较低分子量的片段:

[0753] $-\text{PEG}-\text{CO}_2-\text{PEG}-+\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{PEG}-\text{CO}_2\text{H}+\text{HO}-\text{PEG}-$

[0754] 本领域普通技术人员应理解,术语聚(乙二醇)或PEG表示或包括本领域中已知的所有形式,其包括但不限于在本文中所公开的形式。

[0755] 许多其它聚合物也适用于本发明中。在一些实施方案中,具有2至约300 个末端的水溶性聚合物主链尤其可用于本发明中。合适的聚合物的实例包括但不限于其它聚(亚烷基二醇),如聚(丙二醇) (“PPG”)、其共聚物(包括但不限于乙二醇与丙二醇的共聚物)、其三聚物、其混合物等。尽管聚合物主链的每个链的分子量可改变,但它通常在约800Da至约100,000Da、通常约 6,000Da至约80,000Da的范围内。聚合物主链的每个链的分子量可介于约 100Da与约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000 Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000 Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000 Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da,和100Da。在一些实施方案中,聚合物主链的每个链的分子量介于约100Da与约50,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物主链的每个链的分子量介于约100Da与约40,000 Da之间。在一些实施方案中,聚合物主链的每个链的分子量介于约1,000Da 与约40,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物主链的每个链的分子量介于约5,000Da与约40,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物主链的每个链的分子量介于约10,000Da与约40,000Da之间。

[0756] 本领域普通技术人员应认识到,实质上水溶性主链的前述清单决非详尽并且仅具有说明性,具有上述性质的所有聚合物材料都被考虑为适用于本发明中。

[0757] 在本发明的一些实施方案中,聚合物衍生物为“多官能的”,意思是聚合物主链具有至少两个经官能团官能化或活化的末端并且可能具有多达约300 个所述末端。多官能聚合物衍生物包括但不限于具有两个末端的线性聚合物,每个末端与可相同或不同的官能团键合。

[0758] 在一个实施方案中,聚合物衍生物具有以下结构:

[0759] $\text{X}-\text{A}-\text{POLY}-\text{B}-\text{N}=\text{N}=\text{N}$

[0760] 其中:

[0761] N=N=N为叠氮部分；

[0762] B为连接部分，其可存在或不存在；

[0763] POLY为水溶性非抗原聚合物；

[0764] A为连接部分，其可存在或不存在并且其可与B相同或不同；并且

[0765] X为第二官能团。

[0766] A和B的连接部分的实例包括但不限于含有多达18个并且可含有1-10个碳原子的多官能化烷基。烷基链中可包括诸如氮、氧或硫的杂原子。烷基链也可在杂原子处支化。A和B的连接部分的其它实例包括但不限于含有多达10个并且可含有5-6个碳原子的多官能化芳基。芳基的一个或多个碳原子可被氮、氧或硫原子取代。合适的连接基团的其它实例包括美国专利第5,932,462号、第5,643,575号，以及美国专利申请公布2003/0143596中所描述的连接基团，所述文献中的每一篇均以引用的方式并入本文。本领域普通技术人员应认识到，连接部分的前述清单决非详尽并且仅具有说明性，具有上述性质的所有连接部分都被考虑为适用于本发明中。

[0767] 适合用作X的官能团的实例包括但不限于羟基、经保护羟基、烷氧基、活性酯(如N-羟基琥珀酰亚胺基酯和1-苯并三唑基酯)、活性碳酸酯(如碳酸N-羟基琥珀酰亚胺基酯和碳酸1-苯并三唑基酯)、乙缩醛、醛、水合醛、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨基、经保护胺、酰肼、经保护酰肼、经保护硫醇、羧酸、经保护羧酸、异氰酸酯、异硫代氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘代乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、三氟乙磺酸酯、烯炔、酮和叠氮化物。本领域普通技术人员应理解，所选X部分应与叠氮基相容以使得不与叠氮基发生反应。含叠氮基的聚合物衍生物可为同双官能的，意思是第二官能团(即X)也是叠氮部分；或为异双官能的，意思是第二官能团为不同的官能团。

[0768] 术语“经保护”是指存在防止化学反应性官能团在某些反应条件下发生反应的保护基或保护部分。保护基应视所保护的化学反应性基团的类型而改变。例如，如果化学反应性基团是胺或酰肼，那么保护基可选自叔丁氧羰基(t-Boc)和9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)的组。如果化学反应性基团为硫醇，那么保护基可为邻吡啶基二硫化物。如果化学反应性基团为羧酸(如丁酸或丙酸)或羟基，那么保护基可为苄基或诸如甲基、乙基或叔丁基的烷基。本领域中已知的其它保护基也可用于本发明中。

[0769] 文献中末端官能团的具体实例包括但不限于碳酸N-琥珀酰亚胺基酯(参见例如美国专利第5,281,698号、第5,468,478号)、胺(参见例如Buckmann等, Makromol.Chem.182:1379(1981), Zalipsky等, Eur. Polym. J. 19:1177(1983))、酰肼(参见例如Andresz等, Makromol.Chem.179:301(1978))、丙酸琥珀酰亚胺基酯和丁酸琥珀酰亚胺基酯(参见例如Olson等, Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, 第170-181页, Harris和Zalipsky编, ACS, Washington, D.C., 1997; 还参见美国专利第5,672,662号)、琥珀酸琥珀酰亚胺基酯(参见例如Abuchowski等, Cancer Biochem. Biophys. 7:175(1984)以及Joppich等, Makromol.Chem.180:1381(1979))、琥珀酰亚胺基酯(参见例如美国专利第4,670,417号)、碳酸苯并三唑酯(参见例如美国专利第5,650,234号)、缩水甘油醚(参见例如Pitha等, Eur. J. Biochem. 94:11(1979), Elling等, Biotech. Appl. Biochem. 13:354(1991))、氧羰基咪唑(参见例如Beauchamp等, Anal. Biochem. 131:25(1983), Tondelli等,

J. Controlled Release 1:251 (1985))、碳酸对硝基苯酯(参见例如Veronese等, Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985); 以及Sartore等, Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991))、醛(参见例如Harris等, J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984); 美国专利第5, 824, 784号、美国专利第5, 252, 714号)、马来酰亚胺(参见例如Goodson等, Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani等, Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984), 以及Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992))、邻吡啶基二硫化物(参见例如Woghiren等, Bioconj. Chem. 4:314 (1993))、丙烯醇(参见例如Sawhney等, Macromolecules, 26:581 (1993))、乙烯基砷(参见例如美国专利第5, 900, 461号)。所有上述参考文献和专利都是以引用的方式并入本文。

[0770] 在本发明的某些实施方案中, 本发明的聚合物衍生物包含具有以下结构的聚合物主链:

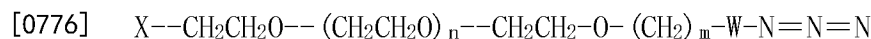


[0772] 其中:

[0773] X为如上所述的官能团; 并且

[0774] n为约20至约4000。

[0775] 在另一个实施方案中, 本发明的聚合物衍生物包含具有以下结构的聚合物主链:



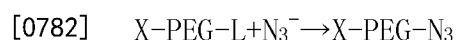
[0777] 其中:

[0778] W为包含1-10个碳原子的脂肪族或芳香族连接部分;

[0779] n为约20至约4000; 并且

[0780] X为如上所述的官能团, m介于1与10之间。

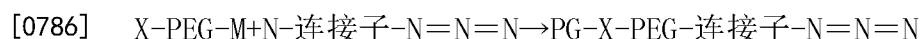
[0781] 可通过本领域中已知和/或本文中所公开的多种方法来制备本发明的含叠氮基的PEG衍生物。在下文示出的一种方法中, 具有约800Da至约100,000 Da的平均分子量的水溶性聚合物主链(所述聚合物主链具有与第一官能团键合的第一末端和与合适的离去基团键合的第二末端)与叠氮基阴离子(其可与许多合适的包括钠、钾、叔丁基铵等的抗衡离子中的任一种配对)反应。离去基团经受亲核置换并且被叠氮部分置换, 从而得到所需的含叠氮基的PEG聚合物。



[0783] 如所示出的, 适用于本发明的聚合物主链具有式X-PEG-L, 其中PEG为聚(乙二醇)并且X为不与叠氮基反应的官能团, 并且L为合适的离去基团。合适的官能团的实例包括但不限于羟基、经保护羟基、缩醛、烯基、胺、氨基、经保护胺、经保护酰肼、经保护硫醇、羧酸、经保护羧酸、马来酰亚胺、二硫代吡啶和乙烯基吡啶以及酮。合适的离去基团的实例包括但不限于氯离子、溴离子、碘离子、甲磺酸根、三氟乙磺酸根和甲苯磺酸根。

[0784] 在本发明的含叠氮基的聚合物衍生物的另一种制备方法中, 使具有叠氮官能团的连接剂与具有约800Da至约100,000Da的平均分子量的水溶性聚合物主链接触, 其中连接剂具有将与PEG聚合物上的化学官能团选择性反应的化学官能团, 以形成含叠氮基的聚合物衍生物产物, 其中叠氮基是通过连接基团与聚合物主链分隔开。

[0785] 示例性反应方案在下面示出:



[0787] 其中:

[0788] PEG为聚(乙二醇)并且X为诸如烷氧基的封端基团或如上所述的官能团;并且

[0789] M为不与叠氮官能团反应、但将与N官能团有效且选择性反应的官能团。

[0790] 合适的官能团的实例包括但不限于:如果N为胺,那么M为羧酸、碳酸酯或活性酯;如果N为酰肼或氨基部分,那么M为酮;如果N为亲核基团,那么M为离去基团。

[0791] 可用已知方法实现粗产物的纯化,所述已知方法包括但不限于沉淀产物,必要时接着进行色谱分离。

[0792] 下文示出在PEG二胺的情况下的更具体的实例,其中一个胺被诸如叔丁基-Boc的保护基部分保护,并且所得单保护的PEG二胺与具有叠氮官能团的连接部分反应:

[0793] $\text{BocHN-PEG-NH}_2 + \text{HO}_2\text{C-(CH}_2)_3\text{-N=N=N}$

[0794] 在这种情况下,可使用多种活化剂如亚硫酸氯或碳化二亚胺试剂以及N-羟基琥珀酰亚胺或N-羟基苯并三唑使胺基与羧酸基团偶联,从而在单胺 PEG衍生物与具有叠氮基的连接子部分之间产生酰胺键。在成功形成酰胺键之后,所得经N-叔丁基-Boc-保护的含叠氮基的衍生物可直接用于修饰生物活性分子,或者可对它进一步加工以安装其它有用的官能团。举例来说,可通过用强酸处理使N-t-Boc基团水解从而产生 ω -氨基-PEG-叠氮化物。可使用所得胺作为合成把手(synthetic handle)来安装其它有用的官能团如马来酰亚胺基团、活化二硫化物、活化酯等以产生有价值的异双官能试剂。

[0795] 当需要使不同分子与聚合物的每个末端连接时,异双官能衍生物尤其有用。例如, ω -N-氨基-N-叠氮基PEG将允许具有活性亲电子基团如醛、酮、活化酯基、活化碳酸酯基等的分子与PEG的一个末端连接,并且将允许具有乙炔基团的分子与PEG的另一个末端连接。

[0796] 在本发明的另一个实施方案中,聚合物衍生物具有以下结构:

[0797] $\text{X-A-POLY-B-C}\equiv\text{C-R}$

[0798] 其中:

[0799] R可为H或烷基、烯基、烷氧基,或芳基或经取代芳基;

[0800] B为连接部分,其可存在或不存在;

[0801] POLY为水溶性非抗原性聚合物;

[0802] A为连接部分,其可存在或不存在并且其可与B相同或不同;并且

[0803] X为第二官能团。

[0804] A和B的连接部分的实例包括但不限于含有多达18个并且可含有1-10个碳原子的多官能烷基。烷基链中可包括诸如氮、氧或硫的杂原子。烷基链也可在杂原子处支化。A和B的连接部分的其它实例包括但不限于含有多达10个并且可含有5-6个碳原子的多官能芳基。芳基的一个或多个碳原子可被氮、氧或硫原子取代。合适的连接基团的其它实例包括美国专利第5,932,462号和第5,643,575号以及美国专利申请公布2003/0143596中所描述的连接基团,所述文献中的每一篇均以引用的方式并入本文。本领域普通技术人员应认识到,连接部分的前述清单决非详尽并且仅具有说明性,具有上述性质的多种连接部分被考虑为可用于本发明中。

[0805] 适合用作X的官能团的实例包括羟基、经保护羟基、烷氧基、活性酯(如N-羟基琥珀酰亚胺基酯和1-苯并三唑基酯)、活性碳酸酯(如碳酸N-羟基琥珀酰亚胺基酯和碳酸1-苯并三唑基酯)、乙缩醛、醛、水合醛、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨

氧基、经保护胺、酰肼、经保护酰肼、经保护硫醇、羧酸、经保护羧酸、异氰酸酯、异硫代氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘代乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯和三氟乙磺酸酯、烯烃、酮以及乙炔。应理解,所选X部分应与乙炔基相容以使得不与乙炔基发生反应。含乙炔的聚合物衍生物可为同双官能的,意思是第二官能团(即X)也是乙炔部分,或异双官能的,意思是第二官能团是不同的官能团。

[0806] 在本发明的另一个实施方案中,聚合物衍生物包含具有以下结构的聚合物主链:

[0807] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

[0808] 其中:

[0809] X为如上所述的官能团;

[0810] n为约20至约4000;并且

[0811] m介于1与10之间。

[0812] 每个异双官能PEG聚合物的具体实例在下面示出。

[0813] 可使用本领域普通技术人员已知和/或本文中所公开的方法来制备本发明的含乙炔的PEG衍生物。在一种方法中,使具有约800Da至约100,000Da 的平均分子量的水溶性聚合物主链(所述聚合物主链具有与第一官能团键合的第一末端和与合适的亲核基团键合的第二末端)与既具有乙炔官能团,又具有适合于与PEG上的亲核基团反应的离去基团的化合物反应。当具有亲核部分的PEG聚合物与具有离去基团的分子组合时,离去基团经受亲核置换并且被亲核部分置换,从而得到所需含乙炔的聚合物。

[0814] $X-PEG-Nu+L-A-C\rightarrow X-PEG-Nu-A-C\equiv CR'$

[0815] 如所示出的,用于反应中的优选聚合物主链具有式X-PEG-Nu,其中PEG 为聚(乙二醇),Nu为亲核部分并且X为不与Nu、L或乙炔官能团反应的官能团。

[0816] Nu的实例包括但不限于主要经由SN2型机制反应的胺、烷氧基、芳氧基、巯基、亚氨基、羧酸酯基、酰肼基、氨基。Nu基团的另外的实例包括主要经由亲核加成反应来反应的官能团。L基团的实例包括氯离子、溴离子、碘离子、甲磺酸根、三氟乙磺酸根和甲苯磺酸根和预期进行亲核置换的其它基团,以及酮、醛、硫代酯、烯烃、 α - β 不饱和羰基、碳酸酯基和预期进行亲核试剂加成的其它亲电子基团。

[0817] 在本发明的另一个实施方案中,A为具有1-10个碳原子的脂肪族连接子或具有6-14个碳原子的经取代芳环。X为不与叠氮基反应的官能团,并且L为合适的离去基团。

[0818] 在本发明的含乙炔的聚合物衍生物的另一种制备方法中,使具有约800 Da至约100,000Da的平均分子量、在一个末端上具有经保护官能团或封端剂并且在另一个末端上具有合适的离去基团的PEG聚合物与乙炔阴离子接触。

[0819] 示例性反应方案在下面示出:

[0820] $X-PEG-L+C\equiv CR'\rightarrow X-PEG-C\equiv CR'$

[0821] 其中:

[0822] PEG为聚(乙二醇)并且X为诸如烷氧基的封端基团或如上所述的官能团;并且

[0823] R' 为H、烷基、烷氧基、芳基或芳氧基或经取代烷基、烷氧基、芳基或芳氧基。

[0824] 在上文实例中,当与足够浓度的乙炔阴离子接触时,离去基团L应当具有足以进行SN2型置换反应的反应性。本领域普通技术人员已知由乙炔阴离子实现离去基团的SN2置换所需的反应条件。

[0825] 通常可用本领域中已知的方法来实现粗产物的纯化,所述方法包括但不限于沉淀产物,必要时接着进行色谱分离。

[0826] 水溶性聚合物可与本发明松弛素多肽连接。水溶性聚合物可经由掺入在松弛素多肽中的非天然编码氨基酸,或非天然编码氨基酸或天然编码氨基酸的任何官能团或取代基,或添加到非天然编码氨基酸或天然编码氨基酸中的任何官能团或取代基连接。或者,水溶性聚合物是经由天然存在氨基酸(包括但不限于半胱氨酸、赖氨酸或N端残基的胺基)与掺有非天然编码氨基酸的松弛素多肽连接。在一些情况下,本发明松弛素多肽包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种非天然氨基酸,其中一种或多种非天然编码氨基酸与一种(多种)水溶性聚合物(包括但不限于PEG和/或寡糖)连接。在一些情况下,本发明松弛素多肽进一步包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种与水溶性聚合物连接的天然编码氨基酸。在一些情况下,本发明松弛素多肽包含一种或多种与水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸,以及一种或多种与水溶性聚合物连接的天然存在氨基酸。在一些实施方案中,相对于未缀合形式,本发明中所使用的水溶性聚合物增加松弛素多肽的血清半衰期。

[0827] 可调节与本发明松弛素多肽连接的水溶性聚合物的数目(即聚乙二醇化或糖基化程度)以提供改变(包括但不限于增加或降低)的药理学、药物动力学或药效特征,如活体内半衰期。在一些实施方案中,松弛素的半衰期与未经修饰多肽相比增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、增加到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倍或至少约100倍。

[0828] 含有强亲核基团(即酰肼、肼、羟胺或氨基脒)的PEG衍生物

[0829] 在本发明的一个实施方案中,用含有直接与PEG主链连接的末端肼、羟胺、酰肼或氨基脒部分的PEG衍生物修饰包含含羰基的非天然编码氨基酸的松弛素多肽。

[0830] 在一些实施方案中,羟胺末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0831] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0832] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000(即平均分子量介于5-40kDa之间)。

[0833] 在一些实施方案中,含肼或含酰肼的PEG衍生物将具有以下结构:

[0834] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0835] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000 并且X任选地为可存在或不存在的羰基(C=O)。

[0836] 在一些实施方案中,含氨基脒的PEG衍生物将具有以下结构:

[0837] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0838] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000。

[0839] 在本发明的另一个实施方案中,用含有借助于酰胺键与PEG主链连接的末端羟胺、酰肼、肼或氨基脒部分的PEG衍生物修饰包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽。

[0840] 在一些实施方案中,羟胺末端PEG衍生物具有以下结构:

[0841] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0842] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000(即平均分子量介于5-40kDa之间)。

[0843] 在一些实施方案中,含肼或含酰肼的PEG衍生物具有以下结构:

[0844] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$

[0845] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10,n为100-1,000 并且X任选地为可存在或不存在的羰基($\text{C}=\text{O}$)。

[0846] 在一些实施方案中,含氨基脲的PEG衍生物具有以下结构:

[0847] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$

[0848] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000。

[0849] 在本发明的另一个实施方案中,用含有末端肼、羟胺、酰肼或氨基脲部分支化的PEG衍生物修饰包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽,其中支化PEG 的每个链具有在10-40kDa范围内并且可为5-20kDa的MW。

[0850] 在本发明的另一个实施方案中,用具有支化结构的PEG衍生物修饰包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽。举例来说,在一些实施方案中,肼或酰肼末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0851] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$

[0852] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000,并且X任选地为可存在或不存在的羰基($\text{C}=\text{O}$)。

[0853] 在一些实施方案中,含有氨基脲基团的PEG衍生物将具有以下结构:

[0854] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$

[0855] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),X任选地为NH、O、S、 $\text{C}(\text{O})$ 或不存在,m为2-10并且n为100-1,000。

[0856] 在一些实施方案中,含有羟胺基团的PEG衍生物将具有以下结构:

[0857] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_2\text{CH}-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$

[0858] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),X任选地为NH、O、S、 $\text{C}(\text{O})$ 或不存在,m为2-10并且n为100-1,000。

[0859] 一种(多种)水溶性聚合物与松弛素多肽连接的程度和位点可调节松弛素多肽与松弛素多肽受体的结合。在一些实施方案中,布置各键,使得松弛素多肽以通过平衡结合测定,如Spencer等,J.Biol.Chem.,263:7862-7867 (1988)中所描述的平衡结合测定所测量的约400nM或400nM以下的Kd、以150nM或150nM以下的Kd并且在一些情况下以100nM或100nM以下的Kd与松弛素多肽受体结合。

[0860] 用于聚合物活化以及肽缀合的方法和化学描述于文献中并且在本领域中是已知的。聚合物活化的常用方法包括但不限于用溴化氰、高碘酸盐、戊二醛、双环氧化物、表氯醇(epichlorohydrin)、二乙烯基砜、碳化二亚胺、磺酰卤、三氯三嗪等活化官能团。(参见R.F.Taylor,(1991),PROTEIN IMMOBILISATION.FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS,Marcel Dekker, N.Y.;S.S.Wong,(1992),CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING,CRC Press,Boca Raton;G.T,Hermanson等,(1993),IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES,Academic Press,N.Y.;Dunn,R.L.等编,POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,ACS Symposium Series,第469卷,American Chemical Society,Washington, D.C.1991)。

[0861] 可获得关于PEG的官能化和缀合的若干评论和专论。参见例如Harris,

Macromol.Chem.Phys.C25:325-373(1985);Scouten,Methods in Enzymology 135:30-65(1987);Wong等,Enzyme Microb.Technol.14:866-874(1992);Delgado等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304(1992);Zalipsky,Bioconjugate Chem.6:150-165(1995)。

[0862] 活化聚合物的方法也可见于WO 94/17039、美国专利第5,324,844号、WO 94/18247、WO 94/04193、美国专利第5,219,564号、美国专利第5,122,614号、WO 90/13540、美国专利第5,281,698号和WO 93/15189中,并且使活化聚合物与酶缀合的方法可见于以下对应不同酶的参考文献中,所述酶包括但不限于凝血因子VIII(WO 94/15625)、血红蛋白(WO 94/09027)、载氧分子(美国专利第4,412,989号)、核糖核酸酶和超氧化物歧化酶(Veronese等,App.Biochem.Biotech.11:141-52(1985))。所引用的所有参考文献和专利都以引用的方式并入本文。

[0863] 通过任何方便的方法使含有非天然编码氨基酸,如对叠氮基-L-苯丙氨酸的松弛素多肽聚乙二醇化(即添加任何水溶性聚合物)。例如,用经炔封端的mPEG衍生物使松弛素多肽聚乙二醇化。简单地说,在室温下在搅拌下向含对叠氮基-L-Phe的松弛素多肽的水溶液中添加过量固体 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH。通常,用pKa接近进行反应的pH值(一般为约pH 4-10)的缓冲液缓冲水溶液。举例来说,适于在PH 7.5下聚乙二醇化的缓冲液的实例包括但不限于HEPES、磷酸盐、硼酸盐、TRIS-HCl、EPPS 和TES。必要时,连续监测并调节pH值。通常使反应持续进行约1-48小时。

[0864] 随后,使反应产物经受疏水性相互作用色谱,从而使聚乙二醇化松弛素多肽变异体与游离mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH以及当在分子的两端使未阻断PEG活化从而使松弛素多肽变异体分子交联时可形成的聚乙二醇化松弛素多肽的任何高分子量复合物分离开来。疏水性相互作用色谱期间的条件应使得游离mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH流过柱,而任何交联的聚乙二醇化松弛素多肽变异体复合物则在实现所需形式后洗脱出来,所需形式含有一种与一个或多个PEG基团缀合的松弛素多肽变异体分子。合适的条件视交联复合物相对于所需缀合物的相对大小而改变,并且易于由本领域普通技术人员确定。通过超滤来浓缩含有所需缀合物的洗脱液并且通过透滤使其脱盐。

[0865] 必要时,可用本领域普通技术人员已知的一种或多种程序进一步纯化获自疏水性色谱的聚乙二醇化松弛素多肽,所述程序包括但不限于亲和色谱、阴离子或阳离子交换色谱(使用包括但不限于DEAE琼脂糖凝胶)、硅胶色谱、反相HPLC、凝胶过滤(使用包括但不限于SEPHADEX G-75)、疏水性相互作用色谱、尺寸排阻色谱、金属螯合物色谱、超滤/透滤、乙醇沉淀、硫酸铵沉淀、色谱聚焦、置换色谱、电泳程序(包括但不限于制备型等电聚焦)、差异溶解度(包括但不限于硫酸铵沉淀),或萃取。可通过与球状蛋白质标准物(Preneta,AZ,PROTEIN PURIFICATION METHODS,APRACTICAL APPROACH(Harris和Angal编)IRL Press 1989,293-306)进行比较由GPC 来估算表观分子量。可通过蛋白水解降解(包括但不限于胰蛋白酶裂解),接着质谱分析来评估松弛素-PEG缀合物的纯度。Pepinsky RB.等,J,Pharmacol. &Exp.Ther.297(3):1059-66(2001)。

[0866] 与本发明松弛素多肽的氨基酸连接的水溶性聚合物可进一步不受限制地加以衍生或取代。

[0867] 含叠氮基的PEG衍生物

[0868] 在本发明的另一个实施方案中,用含有叠氮部分的PEG衍生物修饰松弛素多肽,所述叠氮部分将与非天然编码氨基酸侧链上存在的炔基部分反应。一般而言,PEG衍生物将具有在1-100kDa范围内并且在一些实施方案中在10-40kDa范围内的平均分子量。

[0869] 在一些实施方案中,叠氮基末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0870] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{N}_3$

[0871] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000(即平均分子量介于5-40kDa之间)。

[0872] 在另一个实施方案中,叠氮基末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0873] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_p-\text{N}_3$

[0874] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10,p为2-10并且n为100-1,000(即平均分子量介于5-40kDa之间)。

[0875] 在本发明的另一个实施方案中,用含有末端叠氮部分的支化PEG衍生物修饰包含含炔的氨基酸的松弛素多肽,其中支化PEG的每个链均具有在10-40kDa范围内并且可为5-20kDa的MW。举例来说,在一些实施方案中,叠氮基末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0876] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}(\text{CH}_2)_m-\text{X}-(\text{CH}_2)_p-\text{N}_3$

[0877] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10,p为2-10,并且n为100-1,000,并且X任选地为O、N、S或羰基($\text{C}=\text{O}$),在每种情况下,X均可存在或不存在。

[0878] 含炔的PEG衍生物

[0879] 在本发明的另一个实施方案中,用含有炔基部分的PEG衍生物修饰松弛素多肽,所述炔基部分将与非天然编码氨基酸侧链上存在的叠氮部分反应。

[0880] 在一些实施方案中,炔末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0881] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{CH}$

[0882] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10并且n为100-1,000(即平均分子量介于5-40kDa之间)。

[0883] 在本发明的另一个实施方案中,用含有借助于酰胺键与PEG主链连接的末端叠氮部分或末端炔基部分的PEG衍生物修饰包含含炔的非天然编码氨基酸的松弛素多肽。

[0884] 在一些实施方案中,炔末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0885] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_p-\text{C}\equiv\text{CH}$

[0886] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10,p为2-10并且n为100-1,000。

[0887] 在本发明的另一个实施方案中,用含有末端炔基部分的支化PEG衍生物修饰包含含叠氮基的氨基酸的松弛素多肽,其中支化PEG的每个链均具有在10-40kDa范围内并且可为5-20kDa的MW。举例来说,在一些实施方案中,炔末端PEG衍生物将具有以下结构:

[0888] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}(\text{CH}_2)_m-\text{X}-(\text{CH}_2)_p-\text{C}\equiv\text{CH}$

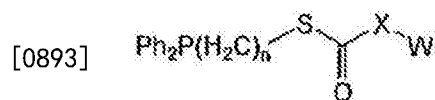
[0889] 其中R为简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m为2-10,p为2-10,并且n为100-1,000,并且X任选地为O、N、S或羰基($\text{C}=\text{O}$)或不存在。

[0890] 含磷的PEG衍生物

[0891] 在本发明的另一个实施方案中,用含有活化官能团(包括但不限于酯基、碳酸酯基)的PEG衍生物修饰松弛素多肽,所述官能团进一步包含将与非天然编码氨基酸侧链上存在的叠氮部分反应的芳基磷基团。一般而言,PEG衍生物将具有在1-100kDa范围内,并且在

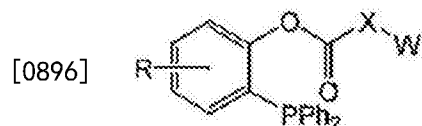
一些实施方案中在10-40kDa范围内的平均分子量。

[0892] 在一些实施方案中,PEG衍生物将具有以下结构:



[0894] 其中n为1-10;X可为O、N、S或不存在,Ph为苯基,并且W为水溶性聚合物。

[0895] 在一些实施方案中,PEG衍生物将具有以下结构:



[0897] 其中X可为O、N、S或不存在,Ph为苯基,W为水溶性聚合物并且R 可为H、烷基、芳基、经取代烷基和经取代芳基。示例性R基团包括但不限于-CH₂、-C(CH₃)₃、-OR'、-NR' R''、-SR'、-卤素、-C(O) R'、-CONR' R''、-S(O)₂ R'、-S(O)₂ NR' R''、-CN和-NO₂。R'、R''、R''' ,和R'''各自独立地指代氢、经取代或未经取代的杂烷基、经取代或未经取代的芳基(包括但不限于被1-3 个卤素取代的芳基)、经取代或未经取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基,或芳基烷基。例如,当本发明化合物包括一个以上R基团时,所述R基团中的每一个均独立地加以选择,而当存在R'、R''、R''' ,和R'''基团中的一个以上基团时,这些基团同样是各自独立地加以选择。当R' 和R'' 与同一氮原子连接时,它们可与氮原子组合形成5元、6元或7元环。例如,-NR' R''意在包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据对取代基的上述论述,本领域技术人员应理解,术语“烷基”意在包括包含与除氢基以外的基团结合的碳原子的基团,例如卤代烷基(包括但不限于-CF₃和-CH₂CF₃)和酰基(包括但不限于-C(O) CH₃、-C(O) CF₃、-C(O) CH₂OCH₃等)。

[0898] 其它PEG衍生物和一般聚乙二醇化技术

[0899] 可与松弛素多肽连接的其它示例性PEG分子以及聚乙二醇化方法包括但不限于以下文献中所描述的那些,例如:美国专利公布第2004/0001838 号;第2002/0052009号;第2003/0162949号;第2004/0013637号;第 2003/0228274号;第2003/0220447号;第2003/0158333号;第2003/0143596 号;第2003/0114647号;第2003/0105275号;第2003/0105224号;第 2003/0023023号;第2002/0156047号;第2002/0099133号;第2002/0086939 号;第2002/0082345号;第2002/0072573号;第2002/0052430号;第 2002/0040076号;第2002/0037949号;第2002/0002250号;第2001/0056171 号;第2001/0044526号;第2001/0021763号;美国专利第6,646,110号;第 5,824,778号;第5,476,653号;第5,219,564号;第5,629,384号;第5,736,625 号;第4,902,502号;第5,281,698号;第5,122,614号;第5,473,034号;第 5,516,673号;第5,382,657号;第6,552,167号;第6,610,281号;第6,515,100 号;第6,461,603号;第6,436,386号;第6,214,966号;第5,990,237号;第 5,900,461号;第5,739,208号;第5,672,662号;第5,446,090号;第5,808,096 号;第5,612,460号;第5,324,844号;第5,252,714号;第6,420,339号;第 6,201,072号;第6,451,346号;第6,306,821号;第5,559,213号;第5,747,646 号;第5,834,594号;第5,849,860号;第5,980,948号;第6,004,573号;第 6,129,912;WO 97/32607、EP 229,108、EP 402,378、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/14758、WO 94/17039、W094/18247、WO 94/28024、WO 95/00162、WO 95/11924、WO 95/13090、WO 95/33490、WO 96/00080、WO 97/18832、WO 98/41562、WO 98/48837、W099/32134、WO 99/32139、WO 99/32140、WO 96/40791、WO 98/32466、WO 95/06058、EP 439 508、WO 97/

03106、WO 96/21469、WO 95/13312、EP 921 131、WO 98/05363、EP 809 996、WO 96/41813、WO 96/07670、EP 605 963、EP 510 356、EP 400 472、EP 183 503和EP 154 316,其以引用的方式并入本文。本文描述的任一种PEG 分子都可以包括但不限于单链、支链、多臂链、单官能、双官能、多官能或其任何组合的任何形式使用。

[0900] 另外的聚合物和PEG衍生物(包括但不限于羟胺(氨氧基)PEG衍生物)描述于以下专利申请中,所述的所有专利申请都以引用的方式完整地并入本文:美国专利公布第2006/0194256号;美国专利公布第2006/0217532 号;美国专利公布第2006/0217289号;美国临时专利第60/755,338号;美国临时专利第60/755,711号;美国临时专利第60/755,018号;国际专利申请第PCT/US06/49397号;WO 2006/069246;美国临时专利第60/743,041号;美国临时专利第60/743,040号;国际专利申请第PCT/US06/47822号;美国临时专利第60/882,819号;美国临时专利第60/882,500号;以及美国临时专利第60/870,594号。

[0901] 异源Fc融合蛋白

[0902] 上述松弛素化合物可直接或经由肽连接子与免疫球蛋白的Fc部分融合。免疫球蛋白是含有通过二硫键合在一起的多肽链的分子,并通常具有两个轻链和两个重链。在每个链中,一个结构域(V)具有取决于分子的抗体特异性的可变氨基酸序列。其它结构域(C)具有为相同类别的分子所共有的相当恒定的序列。

[0903] 如本文所使用的免疫球蛋白的Fc部分具有免疫学领域中通常赋予这一术语的含义。具体来说,这一术语是指通过从抗体中去除两个抗原结合区(Fab片段)所获得的抗体片段。一种去除Fab片段的方法是用木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白。因此,Fc部分是由来自两个重链的尺寸近似相等的恒定区片段形成,所述片段通过非共价相互作用和二硫键缔合。Fc部分可包括铰链区并且延伸穿过抗体的CH2和CH3结构域到达C端。人和小鼠免疫球蛋白的代表性铰链区可见于Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C.A.K. 编, W.H. Freeman and Co., 1992中,其教导以引用的方式并入本文。Fc部分可进一步包括一个或多个糖基化位点。本领域中熟知许多含有铰链区、CH2和CH3结构域以及一个N-糖基化位点的代表性Fc蛋白的氨基酸序列。

[0904] 存在五种类型的具有不同效应功能和药物动力学性质的人免疫球蛋白 Fc区: IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。IgG是血清中最丰富的免疫球蛋白。IgG 还具有任何免疫球蛋白中最长的血清半衰期(23天)。不同于其它免疫球蛋白,IgG在与Fc受体结合后可有效地再循环。存在四个IgG亚类G1、G2、G3和G4,其中的每个亚类均具有不同的效应功能。G1、G2和G3可结合C1q并固定补体,而G4则不能。虽然G3能够比G1有效地结合C1q,但 G1在介导补体导向的细胞裂解中更有效。G2以极低效率固定补体。IgG中的C1q结合位点位于CH2结构域的羧基端区。

[0905] 所有IgG亚类都能够与Fc受体(CD16、CD32、CD64)结合,其中G1 和G3比G2和G4有效。IgG的Fc受体结合区是由位于CH2结构域的铰链区和羧基端区中的残基形成。

[0906] IgA可以单体形式和通过J-链结合在一起的二聚物形式存在。IgA是血清中第二丰富的Ig,但其半衰期仅为6天。IgA具有三种效应功能。它与巨噬细胞和嗜酸性粒细胞上的IgA特异性受体结合,所述受体分别驱动吞噬作用和脱粒作用。它也可经由未知的替代途径固定补体。

[0907] IgM表达为通过J-链结合在一起的五聚物或六聚物。IgM具有5天的血清半衰期。它

经由位于其CH3结构域中的结合位点与C1q微弱地结合。IgD 具有3天的血清半衰期。尚不清楚哪些效应功能可归因于这种Ig。IgE是单体Ig并且具有2.5天的血清半衰期。IgE与驱动脱粒作用并且引起促发炎症剂释放的两种Fc受体结合。

[0908] 取决于所需的活体内效应,本发明异源融合蛋白可含有上述同种型中的任一种,或者可含有其中补体和/或Fc受体结合功能已改变的突变Fc区。因此,本发明异源融合蛋白可含有与干扰素 β 化合物融合的免疫球蛋白的整个 Fc部分、免疫球蛋白的Fc部分的片段或其类似物。

[0909] 本发明融合蛋白可由单链蛋白质组成或呈多链多肽形式。可产生两种或更多种Fc融合蛋白,使得它们通过在Fc区之间天然形成的二硫键相互作用。这些多聚物就干扰素 β 化合物来说可为同源的,或者它们可含有不同的在融合蛋白的Fc部分的N端处融合的干扰素 β 化合物。

[0910] 不管融合蛋白的最终结构如何,Fc或Fc样区可用于延长在N端处融合的干扰素 β 化合物的活体内血浆半衰期。此外,融合蛋白化合物的干扰素 β 组分应保持干扰素 β 的至少一种生物活性。可使用本文描述或本领域中已知的比较融合蛋白的半衰期与单独干扰素 β 化合物的半衰期的方法证明治疗或循环半衰期的增加。生物活性可用本领域已知的活体外和活体内方法确定。

[0911] 因为由蛋白水解所产生的IgG的Fc区具有与完整IgG分子相同的活体内半衰期并且Fab片段快速降解,所以用于延长半衰期的相关序列被认为驻留在CH2和/或CH3结构域中。进一步地,文献中已显示不结合高亲和性Fc受体或C1q的IgG变异体的分解代谢率与亲本野生型抗体的清除率很难区分,表明分解代谢位点不同于参与Fc受体或C1q结合的位点。[Wawrzynczak等,(1992) *Molecular Immunology* 29:221]。使用鼠类IgG1Fc 区的定点诱变研究揭示,控制分解代谢率的IgG1Fc区的位点位于CH2-CH3 结构域域的界面处。可在分解代谢位点处修饰Fc区以优化融合蛋白的半衰期。用于本发明融合蛋白的Fc区可源自IgG1或IgG4Fc区,并且可含有CH2 和CH3区(包括铰链区)。

[0912] 异源白蛋白融合蛋白

[0913] 本文描述的松弛素可直接或经由肽连接子、水溶性聚合物或前药连接子与白蛋白或其类似物、片段或衍生物融合。作为本发明融合蛋白的一部分的白蛋白一般可源自从包括人的任何物种克隆的白蛋白。人血清白蛋白(HSA) 由具有585种氨基酸的单个非糖基化多肽链组成,化学式分子量为66,500。已知人HSA的氨基酸序列[参见Meloun等(1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens等,(1975) *Fed.Proc.* 34:591;Lawn等(1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114;Minghetti等(1986) *J.Biol.Chem.* 261:6747,其中的每一篇文献均以引用的方式并入本文]。已描述白蛋白的多种多形变异体以及类似物和片段。[参见Weitkamp等,(1973) *Ann.Hum.Genet.* 37:219]。例如,在EP 322,094中,各种较短形式的HSA。已公开这些HSA片段中的一些,包括 HSA (1-373)、HSA (1-388)、HSA (1-389)、HSA (1-369) 和HSA (1-419) 以及 1-369与1-419之间的片段。EP 399,666公开了白蛋白片段,其包括HSA (1-177) 和HSA (1-200) 以及HSA (1-177) 与HSA (1-200) 之间的片段。

[0914] 应理解,本发明异源融合蛋白包括与任何白蛋白偶联的松弛素化合物,其包括片段、类似物和衍生物,其中此种融合蛋白具有生物活性并且其血浆半衰期比单独松弛素化合物长。因此,融合蛋白的白蛋白部分未必具有与天然人白蛋白相等的血浆半衰期。片段、

类似物和衍生物是已知的或者可产生片段、类似物和衍生物,其具有较长半衰期或者具有介于天然人白蛋白的半衰期与相关松弛素化合物的半衰期之间的半衰期。

[0915] 本发明异源融合蛋白涵盖在融合蛋白的松弛素化合物和/或Fc或白蛋白部分中具有保守性氨基酸取代的蛋白质。“保守性取代”是将氨基酸用另一种带相同净电荷并且具有大致相同的尺寸和形状的氨基酸置换。当具有脂肪族或经取代脂肪族氨基酸侧链的氨基酸的侧链中的碳和杂原子总数相差不超过约4时,所述氨基酸具有大致相同的尺寸。当它们的侧链中的分支数相差不超过1时,它们具有大致相同的形状。侧链中具有苯基或经取代苯基的氨基酸被视为具有大致相同的尺寸和形状。除非本文另外特别提供,否则保守性取代优选利用天然存在氨基酸进行。

[0916] 野生型白蛋白和免疫球蛋白可从多种来源获得。例如,这些蛋白质可从 cDNA文库获得,该文库可从以可检测水平表达感兴趣mRNA的组织或细胞制备。可利用使用所公布DNA或蛋白质序列针对感兴趣特定蛋白质设计的探针筛选文库。例如,以下文献中描述了免疫球蛋白轻链或重链恒定区: Adams等(1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet等(1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby等(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027-6031; Rice 等(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner等(1982) *Nature* 298:286-288; 以及Morrison等(1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256。一些公开白蛋白和DNA序列的参考文献包括Meloun等(1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens等(1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn等(1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; 以及Minghetti等(1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747。

[0917] 本发明异源融合蛋白的表征

[0918] 存在许多表征本发明融合蛋白的方法。其中的一些方法包括但不限于与蛋白质染色法结合的SDS-PAGE或使用抗IgG或抗HSA抗体的免疫印迹法。其它方法例如包括基质辅助激光解吸附/离子化质谱(MALDI-MS)、液相色谱 /质谱、等电聚焦、分析型阴离子交换、色谱聚焦和圆二色谱。

[0919] 增强对血清白蛋白的亲水性

[0920] 也可使各种分子与本发明松弛素多肽融合以调节松弛素多肽在血清中的半衰期。在一些实施方案中,使分子与本发明松弛素多肽连接或融合以增强对动物中的内源血清白蛋白的亲水性。

[0921] 例如,在一些情况下,制备松弛素多肽与白蛋白结合序列的重组融合体。示例性白蛋白结合序列包括但不限于来自链球菌(streptococcal)蛋白G的白蛋白结合结构域(参见例如Makrides等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996); 以及Sjolander等, *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)), 或白蛋白结合肽,如在例如Dennis等, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) 中所描述的白蛋白结合肽。

[0922] 在其它实施方案中,用脂肪酸使本发明松弛素多肽酰化。在一些情况下,脂肪酸促进与血清白蛋白的结合。参见例如Kurtzhals等, *Biochem. J.* 312:725-731 (1995)。

[0923] 在其它实施方案中,本发明松弛素多肽是直接与血清白蛋白(包括但不限于人血清白蛋白)融合。本领域技术人员应认识到,也可使多种其它分子与本发明的松弛素连接以调节与血清白蛋白或其它血清组分的结合。

[0924] 松弛素多肽的糖基化

[0925] 本发明包括掺有一种或多种带有糖残基的非天然编码氨基酸的松弛素多肽。糖残基可为天然残基(包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺)或非天然残基(包括但不限于3-氟半乳糖)。糖可通过N或O-连接的糖苷键(包括但不限于N-乙酰基半乳糖-L-丝氨酸)或非天然键(包括但不限于脞或相应C或 S-连接的糖苷)与非天然编码氨基酸连接。

[0926] 可在活体内或活体外将糖(包括但不限于糖基)部分添加到松弛素多肽中。在本发明的一些实施方案中,用由氨基衍生的糖修饰包含含羰基的非天然编码氨基酸的松弛素多肽,从而产生经由脞键连接的相应糖基化多肽。在糖与非天然编码氨基酸连接后,可通过用糖基转移酶和其它酶处理来对所述糖进行进一步加工从而产生结合于松弛素多肽的寡糖。参见例如H.Liu 等,J.Am.Chem.Soc.125:1702-1703(2003)。

[0927] 在本发明的一些实施方案中,直接用以氨基衍生物形式制备的具有规定结构的聚糖修饰包含含羰基的非天然编码氨基酸的松弛素多肽。本领域普通技术人员应认识到,可使用包括叠氮基、炔、酰肼、肼和氨基脲在内的其它官能团使糖与非天然编码氨基酸连接。

[0928] 在本发明的一些实施方案中,然后可通过(包括但不限于)休斯根[3+2] 环加成反应,分别用(包括但不限于)炔基或叠氮基衍生物修饰包含含叠氮基或炔基的非天然编码氨基酸的松弛素多肽。这种方法允许以极高选择性修饰蛋白质。

[0929] 松弛素二聚物和多聚物

[0930] 本发明还提供了松弛素和松弛素类似物组合,例如同源二聚物、异源二聚物、同源多聚物,或异源多聚物(即三聚物、四聚物等),其中含有一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素与另一种松弛素或其松弛素变异体或非松弛素或其松弛素变异体的任何其它多肽结合,要么直接与所述多肽主链结合,要么经由连接子与所述多肽主链结合。由于与单体相比分子量增加,所以松弛素二聚物或多聚物缀合物可展现新颖或所需性质,包括但不限于相对于单体松弛素展现不同的药理学、药物动力学、药效学性质、受调节的治疗半衰期或受调节的血浆半衰期。单体松弛素类似物的实例参见,例如1992 年11月17日颁布的Balschmidt,P.等,美国专利第5,164,366号;1997年4 月8日颁布的Brange,J.等,美国专利第5,618,913号;1996年5月7日颁布的Chance,R.E.等,美国专利第5,514,646号;以及Ertl,J.等,EP0公布第 885,961号,1998年12月23日。本发明的一些实施方案提供了含有一个或多个非天然编码氨基酸残基的单体松弛素类似物,并且在一些实施方案中,这些松弛素类似物包括其中位置B28为Asp、Lys、Ile、Leu、Val或Ala并且位置B29处的氨基酸残基为Lys或Pro的单体松弛素类似物;具有 Lys (B28) Pro (B29)的单体松弛素类似物-人松弛素;单体松弛素类似物Asp (B28)-人松弛素;以及单体松弛素类似物Lys (B3) Ile (B28)-人松弛素。在一些实施方案中,本发明松弛素二聚物将调节松弛素受体的信号转导。在其它实施方案中,本发明松弛素二聚物或多聚物将充当松弛素受体的拮抗剂、激动剂或调节剂。

[0931] 在一些实施方案中,在含有松弛素的二聚物或多聚物中存在的一种或多种松弛素分子包含与水溶性聚合物连接的非天然编码氨基酸。

[0932] 在一些实施方案中,松弛素多肽是(包括但不限于)经由Asn-Lys酰胺键或Cys-Cys二硫键直接连接。在一些实施方案中,松弛素多肽和/或所连接的非松弛素分子将包含不同的非天然编码氨基酸以促进二聚化,其包括但不限于第一松弛素多肽的一种非天然编码氨基酸中的炔基与第二分子的第二非天然编码氨基酸中的叠氮基将经由休斯根[3+2]环加成

缀合。或者,包含含酮的非天然编码氨基酸的松弛素和/或所连接的非松弛素分子可与包含含羟胺的非天然编码氨基酸的第二多肽缀合,并且所述多肽是经由相应肟的形成来进行反应。

[0933] 或者,两种松弛素多肽和/或所连接的非松弛素分子是经由连接子连接。可使用任何异型双官能连接子或同型双官能连接子来连接两种分子和/或所连接的非松弛素分子,所述两种分子和/或所连接的非松弛素分子可具有相同或不同的一级序列。在一些情况下,用于将松弛素和/或所连接的非松弛素分子连接在一起的连接子可为双官能PEG试剂。所述连接子可具有各种分子量或分子长度。可使用较大或较小分子量的连接子在松弛素与所连接实体之间或在松弛素与其受体之间或在所连接实体与其结合搭配物(如果存在的话)之间提供所需空间关系或构象。也可使用具有较长或较短分子长度的连接子在松弛素与所连接实体之间或在所连接实体与其结合搭配物(如果存在的话)之间提供所需空间或柔性。

[0934] 在一些实施方案中,本发明提供了具有哑铃结构的水溶性双官能连接子,所述哑铃结构包括:a)在聚合物主链的至少一个第一末端上的叠氮基、炔、肼、酰肼、羟胺或含羰基的部分;以及b)至少一个在聚合物主链的第二末端上的第二官能团。第二官能团可与第一官能团相同或不同。在一些实施方案中,第二官能团不与第一官能团反应。在一些实施方案中,本发明提供了包含支化分子结构的至少一个臂的水溶性化合物。例如,支化分子结构可为树枝状。

[0935] 在一些实施方案中,本发明提供了通过与水溶性活化聚合物反应而形成的包含一种或多种松弛素多肽的多聚物,所述水溶性活化聚合物具有以下结构:

[0936] $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$

[0937] 其中n为约5至3,000,m为2-10,X可为叠氮基、炔、肼、酰肼、氨基、羟胺、乙酰基,或含羰基的部分,并且R为可与X相同或不同的封端基团、官能团或离去基团。R可为例如选自以下组成的组的官能团:羟基、经保护羟基、烷氧基、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、1-苯并三唑基酯、碳酸 N-羟基琥珀酰亚胺基酯、碳酸1-苯并三唑基酯、乙缩醛、醛、水合醛、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨基、经保护胺、酰肼、经保护酰肼、经保护硫醇、羧酸、经保护羧酸、异氰酸酯、异硫代氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘代乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯和三氟乙磺酸酯、烯炔以及酮。

[0938] 松弛素多肽活性和松弛素多肽对松弛素受体的亲和性的测量

[0939] 可使用标准或已知活体外或活体内测定确定松弛素多肽活性。可用本领域中已知的合适方法分析松弛素多肽的生物活性。如Meager, J. Immunol. Meth., 261:21-36 (2002) 中所描述,此类测定包括但不限于干扰素应答基因的激活、受体结合测定、抗病毒活性测定、细胞病变效应抑制测定 (Familletti 等, Meth. Enzymol. 78:387-394)、抗增殖测定 (Aebersold和Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582)、免疫调节测定 (美国专利第4,914,033号、第4,753,795 号) 和监测MHC分子诱发的测定 (例如Hokland等, Meth. Enzymol. 119:688-693)。

[0940] 3T3-1脂肪细胞中的葡萄糖摄取可使用以下方法评估。从美国典型菌种保藏中心(ATCC, Rockville, Md.) 获得3T3-L1细胞。将细胞培养在含有含10% 富铁胎牛血清的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 的生长培养基 (growth

medium, GM) 中。对于标准脂肪细胞分化来说,在细胞达到汇合(称为第0天)后第2天,使细胞暴露在含有10%胎牛血清、10 μ g/ml松弛素、1 μ M地塞米松(dexamethasone)和0.5 μ M异丁基甲基黄嘌呤的分化培养基(differentiation medium, DM)中48小时。随后将细胞维持在含有10%胎牛血清和10 μ g/ml松弛素的分化后培养基中。活体外效能可使用本领域普通技术人员已知的葡萄糖摄取测定来测量。活体外效能可被定义为在基于细胞的测定中松弛素化合物的葡萄糖摄取的量度并且是松弛素化合物的生物效能的量度。它可表示为EC50,即化合物在单剂量反应实验中产生50%活性的有效浓度。

[0941] 葡萄糖转运测定--松弛素依赖性--如通过0.1mM 2-脱氧-D-[14C]葡萄糖的累积所测定,如下测量己糖摄取:用升温至37 $^{\circ}$ C并且含有0.2%BSA的 KRP缓冲液(136mM NaCl, 4.7mM KCl, 10mM NaPO₄, 0.9mM CaCl₂, 0.9 mM MgSO₄, pH 7.4)洗涤12孔板中的3T3-L1脂肪细胞两次,将其在37 $^{\circ}$ C下在室内空气中含有0.2%BSA的莱氏L-15培养基(Leibovitz's L-15medium)中温育2小时,再次用含有0.2%BSA缓冲液的KRP洗涤两次,并且在37 $^{\circ}$ C下在室内空气中含有0.2%BSA缓冲液和不存在渥曼青霉素(wortmannin)(仅存在Me₂SO)或存在渥曼青霉素的KRP中温育30分钟。然后添加松弛素直至100nM的最终浓度历时15分钟,并且在最后4分钟测量2-脱氧-D-[14C]葡萄糖的摄取。将所有值减去在10 μ M细胞分裂抑素B(cytochalasin B)存在下测出的非特异性摄取。使用Pierce二喹啉甲酸测定来确定蛋白质浓度。通常以每一实验一式三份或一式四份来测量摄取。可研究在松弛素存在下用FGF-21短期和长期预处理3T3-L1脂肪细胞的作用。

[0942] 葡萄糖转运测定--松弛素非依赖性--将3T3-L1纤维母细胞铺入96孔板中并且使其分化成脂肪细胞历时2周。分化后,使它们在无血清培养基中饥饿并且用本发明的各种松弛素多肽处理24小时。处理后,用含有0.1%BSA的KRBH缓冲液洗涤细胞两次。在含经标记葡萄糖的KPBH缓冲液的存在下执行葡萄糖摄取。这允许定性评价通过本发明方式制造的多种松弛素多肽和类似物,和那些经聚乙二醇化的松弛素多肽和类似物(因为已知聚乙二醇化使得天然分子的效率降低),并且比较不同胰岛素的功效。另外,本发明松弛素多肽可显示在离体组织模型中诱导葡萄糖摄取。

[0943] 在离体葡萄糖转运模型中,葡萄糖转运测定描述如下:克-汉二氏缓冲液储备溶液(Krebs-Henseleit Buffer Stock Solution)--储备液1:NaCl(1.16M); KCl(0.046M); KH₂PO₄(0.0116M); NaHCO₃(0.0253M)。储备液2:CaCl₂(0.025M); MgSO₄(2H₂O)(0.0116M)。BSA:利用ICN科恩分部分离法V(Cohn FractionV),不经透析直接使用的不含脂肪酸的BSA。培养基制备:将50ml克氏(Krebs)储备液1添加到395ml dH₂O和含有95%O₂/5%CO₂的气体中历时1小时。添加50ml储备液2并且用dH₂O使达到500ml。添加500mg ICN不含脂肪酸的BSA。预温育和温育培养基:32mM甘露糖醇、8mM葡萄糖。洗涤培养基:40mM甘露糖醇、2mM丙酮酸酯。转运培养基:39mM甘露糖醇、1mM 2-DG;32mM甘露糖醇、8mM 3-O-MG。松弛素溶液:(猪松弛素[Lilly])100,000,000 μ U/ml,最终浓度为2000 μ U/ml 或13.3nM。放射性标记培养基制备:所用的比活性:2DG=1.5mCi/ml; 3-O-MG=437 μ Ci/ml;或,甘露糖醇=8 μ Ci/m。每100g体重用0.1cc戊巴比妥(Nembutal)使大鼠麻醉。切除肌肉组织且并用0.9%生理食盐水冲洗,随后将其在29 $^{\circ}$ C下放置在预温育培养基(2ml)中1小时。将肌肉组织转移到温育培养基(2ml;与预温育培养基相同,除了包括松弛素或测试化合物)中并且温育30分钟(视实验条件而定)。然后在29 $^{\circ}$ C下将肌肉组织转移到洗涤培养基(2ml)中并保持10分钟,然后转移

到标记培养基(1.5ml)中并保持10 分钟(3-O-MG)或20分钟(2DG)。修整肌肉组织,将其称重并放置在干冰上的聚丙烯管中。将1ml 1N KOH添加到所述管中,随后将所述管放置在70℃水浴中10-15分钟,每隔数分钟使所述管涡旋。在冰上冷却所述管并且添加 1ml 1N HCl,然后充分混合。然后将200μl上清液放置在一式两份的闪烁瓶中并且在闪烁计数器上计数,将其与已知放射性标准品相比较。

[0944] 关于收缩,首先将肌肉在预温育/温育培养基中温育1小时。1小时后,将每一对肌肉(每只大鼠一对)中的一个肌肉钉在刺激装置上并且将另一个肌肉转移到新温育培养基烧瓶中。通过70Hz的200毫秒(msec)脉冲串来刺激收缩的肌肉,其中串中的每一个脉冲是0.1毫秒。所述脉冲串在10-15V 下以1/sec传递2×10分钟,其间停止1分钟。在刺激期结束时,从刺激装置上移除肌肉并且将其放置在洗涤培养基中10分钟,随后放置在如上文所概述的标记培养基中。

[0945] 本发明的松弛素、松弛素多肽和/或松弛素类似物的平均量可变化并且尤其应基于取得资格的医师的推荐和处方。本发明的松弛素、松弛素多肽和/或松弛素类似物的确切量见仁见智,受以下因素影响,如所治疗的病状的确切类型和/或严重程度、所治疗的患者的病状以及组合物中的其它成分。本发明还提供了治疗有效量的另一种活性剂的施用。所给予的量可容易地由本领域普通技术人员基于利用松弛素的疗法、可利用的松弛素疗法和/或其它松弛素类似物确定。

[0946] 本发明药物组合物可以常规方式制备。

实施例

[0947] 提供以下实施例是为了说明,而不是限制要求保护的本发明。

[0948] 实施例1

[0949] 本实施例描述了选择将非天然编码氨基酸掺入到松弛素中的位点的许多套可能标准中的一套标准。

[0950] 图1-4示出松弛素的结构和序列,并且下表包括具有A链、B链的序列,松弛素和松弛素原。通过用非天然编码氨基酸取代天然编码氨基酸来产生松弛素多肽。每种多肽具有一种被对乙酰基苯丙氨酸(pAcF或pAF)取代的氨基酸。所产生的多肽缺乏前导序列并且是A/B链松弛素多肽(SEQ ID NO. 1-3)。所产生的每一种多肽均在以下位置之一处具有非天然编码氨基酸取代:SEQ ID NO:4的1、5、18、13、2,或任一种已知松弛素序列的A链的那些位置,或任一种已知松弛素序列的B链的那些相同位置中的SEQ ID NO:5 或6的5、7、18、28。图2示出使用PyMOL软件(DeLano Scientific;Palo Alto, CA)标记的人松弛素的结构和本发明松弛素多肽中的一些与用对乙酰基苯丙氨酸取代的氨基酸相应的氨基酸。

[0951] 选择掺入非天然编码氨基酸的优选位点的另一套标准包括使用 and 比较来自蛋白质数据库或其它数据库的晶体结构,用于模拟松弛素的结构并且以下残基被鉴定:1)不会干扰与其受体的结合的残基和2)不存在于蛋白质内部的残基。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在但不限于松弛素的一个或多个以下位置处:SEQ ID NO:4的1、5、18、13、2,或任一种已知松弛素序列的A链的那些位置,或任一种已知松弛素序列的B链的那些相同位置中的SEQ ID NO:5或6的5、7、18、28。

[0952] 使用以下标准评价用于引入非天然编码氨基酸的松弛素和松弛素类似物的每个

位置:残基(a) 基于结构分析不应干扰所述受体的结合,b) 不应受丙氨酸或同系物扫描诱变影响,(c) 应表面暴露并且与周围残基展现最小的范德华力或氢键相互作用,(d) 在松弛素变异体中应缺失或可变化,(e) 经非天然编码氨基酸取代后将产生保守性变化,以及(f) 可见于高度柔性区或结构刚性区中。另外,可利用Cx程序(Pintar等(2002)Bioinformatics, 18,第980页) 评价每个蛋白质原子的突出程度,来进一步计算松弛素分子。

[0953] 在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素A链中的一个或多个以下位置处:位置1(即在N-端)之前、位置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(即在蛋白质的羧基端)(SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:1-3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素B 链中的一个或多个以下位置处:位置1(即在N-端)之前、位置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(即在蛋白质的羧基端)(SEQ ID NO: 5或6,或SEQ ID NO:1-3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素中的一个或多个以下位置处:位置1、5、 31、2、13、29、18、52 (SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素中的一个或多个以下位置处:5、31、2、13、29、18、52 (SEQ ID NO:1,或 SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素中的一个或多个以下位置处:1、5、31、2、13、 29 (SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素中的一个或多个以下位置处:5、31、2、13、29 (SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素中的一个或多个以下位置处:1、5、31、2、13 (SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO: 2和3中的相应氨基酸)。在一些实施方案中,一种或多种非天然编码氨基酸掺入在松弛素的一个或多个以下位置处:5、31、2、13 (SEQ ID NO:1,或SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸)。

[0954] 实施例2

[0955] 本实施例详述包括非天然编码氨基酸的松弛素多肽在大肠杆菌中的克隆和表达。

[0956] 本领域普通技术人员已知克隆松弛素的方法。松弛素的多肽和多核苷酸序列和松弛素于宿主细胞中的克隆详述于以下文献中:美国专利第4,758,516 号,美国专利第5,166,191号、美国专利第5,179,195号、第5,945,402号,和第5,759,807号;所述的所有专利都以引用的方式并入本文。

[0957] cDNA编码松弛素如SEQ ID NO:12所示,并且成熟多肽氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0958] 表1:所引用的松弛素序列

SEQ ID NO:	序列名称	序列
1	****	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0960]

2	如SEQ ID NO: 318所示的氨基酸序列	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	如SEQ ID NO: 319所示的氨基酸序列	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
4	如SEQ ID NO: 320所示的氨基酸序列	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	如SEQ ID NO: 321所示的氨基酸序列	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	如SEQ ID NO: 322所示的氨基酸序列	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	如SEQ ID NO: 323所示的氨基酸序列	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	如SEQ ID NO: 324所示的氨基酸序列	MKKNIAFLIKR
9	如SEQ ID NO: 325所示的氨基酸序列	MIEGGR
10	如SEQ ID NO: 326所示的核苷酸序列	caacictacagtgcatggcgaataaagtgtgcatgttggtgtaccaaaagatccttgcctagatttgc
11	如SEQ ID NO: 327所示的核苷酸序列	gactcatggatggaggaagtattatgaattatgcggcgcgaattagttcgcgcgcagatggcatttgcggc atgagcaccctggagc

[0961]

12	如表1所示的核苷酸序列	caacictacagigcatlggctaataaatgttccatgttggltgtacaaaagatccttgcagatttgc gactcatggatggagggaagtattaaatfatgcggccgcgaatagttcgcgccagattgccatttgcggc atgagcacctggagc
13	如表1所示的核苷酸序列	atgaaaaagaaatalegcatttctttaaacgg
14	如表1所示的核苷酸序列	atgattgaaggtagtgtgt
15	如表1所示的核苷酸序列	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQI AICGMSTWSRREAEDLQVGQVFLGGG PGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALAN KCCHVQCTKRSLARFC

[0962] 使用包含正交tRNA (O-tRNA) 和正交氨酰基tRNA合成酶 (O-RS) 的所引入翻译系统表达含有非天然编码氨基酸的松弛素或松弛素类似物。O-RS优先利用非天然编码氨基酸使O-tRNA氨酰化。翻译系统继而响应于所编码的选择密码子而将非天然编码氨基酸插入到松弛素或松弛素类似物中。合适的 O-RS和O-tRNA序列描述于标题为“Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof”的WO 2006/068802中 (E9;SEQ ID NO: 16) 和标题为“Compositions of tRNAand UsesThereof”的WO 2007/021297中 (F13; SEQ ID NO:17), 其以引用的方式完整地并入本文。

[0963] 表2:所引用的序列

[0964]

SEQ ID NO: 18	詹氏甲烷球菌mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
SEQ ID NO: 19	HLAD03 ; 优化的琥珀抑制因子 tRNA	tRNA
SEQ ID NO: 20	HL325A ; 优化的 AGGA 移码抑制因子 tRNA	tRNA
SEQ ID NO: 21	用于掺入对叠氮基-L-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-Az-PheRS(6)	RS
SEQ ID NO: 22	用于掺入对苯甲酰基-L-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-BpaRS(1)	RS
SEQ ID NO: 23	用于掺入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶炔丙基 -PheRS	RS
SEQ ID NO: 24	用于掺入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶炔丙基 -PheRS	RS

[0965]

SEQ ID NO: 25	用于掺入炔丙基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶炔丙基-PheRS	RS
SEQ ID NO: 26	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-Az-PheRS(1)	RS
SEQ ID NO: 27	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-Az-PheRS(3)	RS
SEQ ID NO: 28	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-Az-PheRS(4)	RS
SEQ ID NO: 29	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 p-Az-PheRS(2)	RS
SEQ ID NO: 30	用于掺入对乙酰基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶(LW1)	RS
SEQ ID NO: 31	用于掺入对乙酰基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶(LW5)	RS
SEQ ID NO: 32	用于掺入对乙酰基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶(LW6)	RS
SEQ ID NO: 33	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 (AzPheRS-5)	RS
SEQ ID NO: 34	用于掺入对叠氮基-苯丙氨酸的氨酰基 tRNA 合成酶 (AzPheRS-6)	RS

[0966] 用含有经修饰松弛素或松弛素类似物基因和正交氨酰基tRNA合成酶 /tRNA对 (对所需非天然编码氨基酸具有特异性) 的质粒转化大肠杆菌使得可将非天然编码氨基酸位点特异性地掺入到松弛素多肽中。

[0967] 通过PCR,由使用标准方案的cDNA合成反应扩增野生型成熟松弛素并且将其克隆到PET30 (NcoI-BamHI) 中。在序列确认之前或者之后,在来源于大肠杆菌脂蛋白启动子序列 (Miller, J.H., Gene, 1986) 的合成启动子的组成型控制下,将包括N端HHHHHSGG序列的松弛素从詹氏甲烷球菌 (Mj tRNA^{Tyr}/CUA) 亚克隆到含有琥珀抑制因子酪氨酰基tRNA^{Tyr}/CUA 的抑制载体中,以及在大肠杆菌GlnRS启动子的控制下,亚克隆正交酪氨酰基tRNA 合成酶 (MjTyrRS)。在T7启动子的控制下表达松弛素。使用标准快速变化突变方案 (Stratagene; La Jolla, California) 引入琥珀突变。验证构建体的序列。

[0968] 长效松弛素化合物的测试可使用STZ糖尿病大鼠模型 (PCO 08-400-209) 来进行。

[0969] 用对乙酰基-苯丙氨酸 (pAcF) 抑制

[0970] 将质粒 (例如pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381)) 转化到大肠杆菌菌株 W3110B57中以产生大肠杆菌的RLX-BA1-AV13pAF W3110 B2菌株,其中T7聚合酶的表达在阿拉伯糖诱导性启动子的控制下。将过夜细菌培养物1:100稀释到含有2X YT培养基的摇瓶中并且让其在37℃下生长到 OD₆₀₀为~0.8。通过添加阿拉伯糖 (0.2%最终) 和对乙酰基-苯丙氨酸 (PAcF) 至4mM的最终浓度来诱导蛋白质表达。将培养物在37℃下温育5小时。使细胞成球粒,将其重悬于B-PER裂解缓冲液 (Pierce) 100ul/OD/ml+10ug/ml DNase中并且让其在37℃下温育30min。通过离心去除细胞物质并且去除上清液。将球粒重悬于等量SDS-PAGE蛋白质加载缓冲液中。将所有样品都加载到含有MES和DTT的4-12%PAGE凝胶上。纯化松弛素的

方法是本领域普通技术人员已知的,其通过SDS-PAGE、Western印迹分析,或电喷雾-电离离子阱质谱法等来证实。

[0971] His标识的突变松弛素蛋白可使用本领域普通技术人员已知的方法纯化。可通过由制造商提供的标准His标识的蛋白质纯化程序来使用ProBond 镍螯合树脂 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。蛋白质的功能性测量可通过本领域中已知的方法、本申请和所并入的参考文献中提供的方法进行,或者,可开发针对活细胞的ELISA来评估本发明松弛素多肽。

[0972] 表3:松弛素变异体的分析

批次/描述	SDS-PAGE	LAL (EU/mg)	在 A280 处的 onc.	RP-HPL C 纯度	SE-HPL C 纯度
WT 松弛素 ³	NR 主要带在 6 kDa MW 标准品附 近迁移	NT	2.4	91.2%	NT
20K 聚乙二醇化 Q1pAF ^{1,3,4}	NR 主要带在 49 和 38 kDa MW 标准 品之间迁移	7.7	3.4	100%	NT
20K 聚乙二醇化 A5pAF ^{1,3,4}		3.6	2.4	100%	NT
[0973] 20K 聚乙二醇化 R18pAF ^{1,3,4}		16.1	2.4	100%	NT
20K 聚乙二醇化 E5pAF ^{2,3}		NT	0.6	99.8%	NT
20K 聚乙二醇化 V7pAF ^{2,3,4}		10.5	2.3	99.4%	NT
20K 聚乙二醇化 A18pAF ^{2,3}		NT	2.0	99.0%	NT
20K 聚乙二醇化 W28pAF ^{2,3,4}		9.1	2.2	99.4%	NT
20K 聚乙二醇化		5.1	3.7	99.5%	NT

[0974]	V13pAF ^{1,3,4}					
	20K 聚乙二醇化 E5pAF ²		NT	0.6	99.6%	NT
	20K 聚乙二醇化 L2pAF ¹		0.0	1.6	99.5%	NT
	WT 松弛素 ³	NR 主要带在 6 kDa MW 标准品附近迁移	0.1	2.5	85.6%	NT
	20K 聚乙二醇化 Q1pAF ^{1,3}	NR 主要带在 49 与 38 kDa MW 标准品之间迁移	<0.4	2.3	99.3%	99.3%
	5K 聚乙二醇化 V13pAF ^{1,3}	NR 主要带在 14 kDa MW 标准品附近迁移	5.4	1.5	99.4%	99.8%
	10K 聚乙二醇化 V13pAF ^{1,3}	NR 主要带在 28 与 17 kDa MW 标准品之间迁移	9.8	1.8	99.4%	99.5%
	20K 聚乙二醇化 V13pAF ^{1,3}	NR 主要带在 49 与 38 kDa MW 标准品之间迁移	4.7	1.9	99.0%	99.5%
	30K 聚乙二醇化 V13pAF ^{1,3}	NR 主要带在 62 与 49 kDa MW 标准品之间迁移	8.0	2.1	99.5%	99.8%

[0975] 未还原样品 (NR) ; NT = 未测试

[0976] ¹位于A-链上的pAcF取代

[0977] ²位于B-链上的pAcF取代

[0978] ³B-链 (BA1) 上的Asp被Ala取代

[0979] ⁴用于初始PK

[0980] 表4: 松弛素变异体活性损失

[0981]

变异体	活体外 活性损失 倍数	PEG 尺寸	活体内PK终 末 HL (hr)	活体内 药理学	摇瓶	发酵罐滴 度 (细胞匀 浆)	分析表征
RLX-A -AV13	17	5K, 10K, 20K, 30K	2.6(5K), 8.7(10K), 13.8(20K),26. 8(30K)		是	1gm/L	SDS-PAGE, conc., LAL, RP-HPLC, SE-HPLC
RLX-A -AQ1	12	20K	10.7	20K 显 示出功 效	是	720 mg/L	SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL, SE-HPLC
RLX-A -AA5	12	20K	12.2		是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A -BV7	15	20K	13.1		是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A -AL2	17	20K			是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A -BE5	17	20K			是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A -AR18	21	20K	12.5		是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-B E5	22	20K			是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A -BA18	48	20K			是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A -BW28	48	20K	13.9		是		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL

[0982] 实施例3

[0983] 本实施例详述了大肠杆菌对松弛素原多肽的表达。

[0984] 大肠杆菌表达作为单链蛋白质的由88种氨基酸组成的松弛素原。在用胰蛋白酶和羧肽酶消化后,除去连接肽和前导序列。所得肽为胰岛素超家族的小6kDa双链肽成员,其由24残基A链和29残基B-链组成。结构折叠 (structural fold) 的特征是两个肽链通过两个链间 (Cys11-Cys36,和 Cys24-Cys48) 和一个链内 (Cys10-Cys15) 二硫键合在一起。基于人松弛素-2的晶体结构的三级结构揭示包含围绕疏水核心的三个螺旋区段和短延伸区的紧凑折叠。

[0985] 具有一种或多种非天然编码氨基酸的松弛素提供独特的化学性质并且通过用对乙酰基苯丙氨酸 (pAcF) 置换天然氨基酸,使得能够得到含有通过生物合成掺入的具有化学反应性的羰基的特定聚乙二醇化重组变异体,从而提供用于连接聚(乙二醇) (PEG) 的独特

共价位点。

[0986] 实施例4

[0987] 本实施例详述了大肠杆菌对松弛素原多肽的表达。

[0988] 本实施例描述了使用五(5)升发酵罐对松弛素多肽生产的按比例放大。这些方法和按比例放大也可用于10L、30L、150L和1000L批次。在本发明的一些实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少2g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少4g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少6g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少8g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少10g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少15g松弛素蛋白质。在本发明的另一个实施方案中,对于每升细胞培养物产生至少20g松弛素蛋白质。

[0989] 2.1种子摇瓶

[0990] 使用具有质粒pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381)的大肠杆菌菌株W3110B57 [F-IN(rrnD-rrnE) λ -araB::gltetAfhua::dhfr ompT::cat]生产 RLX-BA1-AV13pAF。将单一研究细胞库(RCB)小瓶从-80℃移开,并在室温下解冻,然后将50 μ L接种在250mL带挡板Erlenmeyer烧瓶中的50mL补充有50 μ g/mL硫酸卡那霉素的种子培养基(化学成分确定的培养基)中。让初级种子培养物在37℃和250rpm(1-英寸摆幅(throw))下生长18小时。在含有100mL补充有50 μ g/mL硫酸卡那霉素的种子培养基的500mL带挡板Erlenmeyer烧瓶中,将初级种子培养物亚培养成次级种子培养物直至在600nm波长处测得的光密度(OD600)为0.05。让次级种子培养物在37℃和250rpm(1-英寸摆幅(throw))下生长大约8小时,或生长至OD600达到介于2与4之间时。

[0991] 2.2发酵罐

[0992] 在Sartorius Biostat B 5-L容器中装入2.1-L补充有50 μ g/L硫酸卡那霉素的生产培养基(化学成分确定的培养基)。将次级种子培养物接种到发酵罐中至初始OD600为0.035。让培养物在37℃下生长,并且用初级搅拌(480-1200rpm)级联和次级O2级联设定溶解氧以维持30%(空气饱和)。在整个发酵过程中维持5LPM的空气流速,以及6psi的背压。通过加入15%氢氧化铵将培养物的pH设定在7.2 $\pm$ 0.05,并在必要时添加Dow Chemical P2000 抗泡剂来控制泡沫。当培养物达到介于35 $\pm$ 5的OD600时(当批次培养基中的初始甘油几乎耗尽时),开始给予200mL批式进料(bolus feed)并且在同时将pH设定点从7.2调节至6.6。在初始批式进料后,以0.25mL/L/min的速率开始持续进料并持续到收获为止。在开始所述进料后即刻向发酵罐中加入2.5mL/L(0.2g/L最终培养物体积)在水中制备的100g/L L-Ala-pAcF二肽溶液。在二肽添加后的第15分钟,通过添加L-阿拉伯糖(在PTR-FGF-002中给予的食谱(recipe))来使培养物浓度为2g/L(最终培养物体积)。在阿拉伯糖添加后让培养物生长6小时并收获。

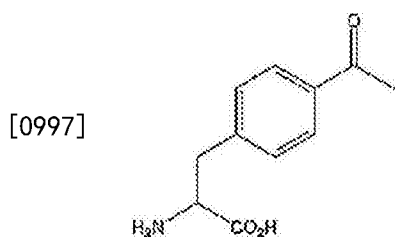
[0993] 图5示出通过这些方法产生的松弛素原的SDS-PAGE凝胶,在所述松弛素原中,链B1氨基酸为Ala并且A链的第13个氨基酸位置中具有取代缬氨酸的对乙酰基苯丙氨酸。

[0994] 实施例5

[0995] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[0996] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法,所述

含酮的非天然编码氨基酸随后与约5,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:3、5、7、9、11中的相应氨基酸) 处的每个残基和在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:2的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:4、6、8、10、12中的相应氨基酸) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:



[0998] 用于将对乙酰基-苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:1和2 (松弛素的A链和B链), 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及在上述实施例2中描述的SEQ ID NO:15、29、30或31 (TyrRS LW1、5或6)。

[0999] 一经修饰后, 包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

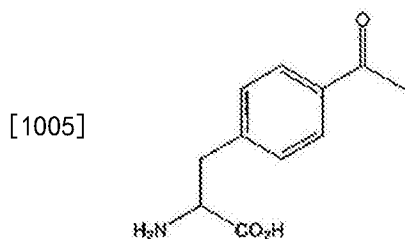
[1000] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1001] 其中R为甲基, n为3并且N为约5,000MW。将含有对乙酰基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0) 或10mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中, 使其与10倍至100倍过量的含氨基的PEG反应, 并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。然后, 将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1002] 实施例6

[1003] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[1004] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法, 所述含酮的非天然编码氨基酸随后与约20,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:



[1006] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:4和5或6 (松弛素的A链和B链), 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并

且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1007] 一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

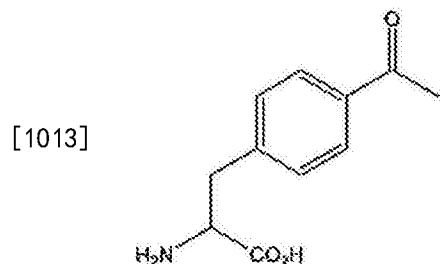
[1008] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1009] 其中R为甲基,n为3并且N为约20,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0) 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中,使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应,并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。然后,将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1010] 实施例7

[1011] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[1012] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法,所述含酮的非天然编码氨基酸随后与约20,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端,或在SEQ ID NO:2和3中的相应氨基酸位置) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:



[1014] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:13, 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1015] 一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

[1016] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1017] 其中R为甲基,n为3并且N为约20,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0) 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中,使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应,并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。然后,将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

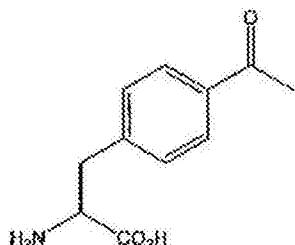
[1018] 实施例8

[1019] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[1020] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法,所述

含酮的非天然编码氨基酸随后与约20,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端,或在SEQ ID NO:2和3中相应氨基酸位置) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:

[1021]



[1022] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:1, 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1023] 一经修饰, 包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

[1024] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

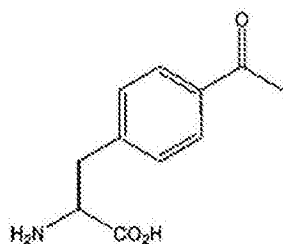
[1025] 其中R为甲基, n为3并且N为约20,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解在25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0) 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中, 使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应, 并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。然后, 将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1026] 实施例9

[1027] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[1028] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法, 所述含酮的非天然编码氨基酸随后与约30,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:

[1029]



[1030] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:1 (或SEQ ID NO:2或3), 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1031] 一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

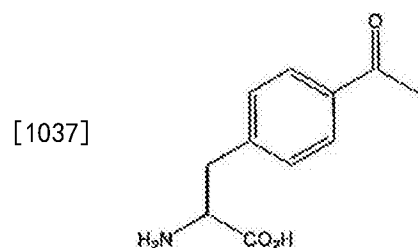
[1032] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1033] 其中R为甲基,n为3并且N为约30,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0), 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中,使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应,并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。随后,将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1034] 实施例10

[1035] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

[1036] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法,所述含酮的非天然编码氨基酸随后与约40,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:



[1038] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:13 (或SEQ ID NO:1、2或14), 和SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1039] 一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:

[1040] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

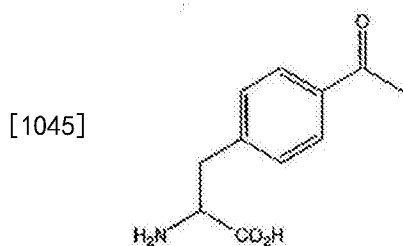
[1041] 其中R为甲基,n为3并且N为约40,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0), 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中,使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应,并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。随后,将PEG-松弛素稀释于适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1042] 实施例11

[1043] 本实施例详述含羰基的氨基酸的引入以及其随后与含氨基的PEG的反应。

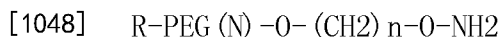
[1044] 本实施例展示一种产生掺有含酮的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法,所述含酮的非天然编码氨基酸随后与约10,000MW的含氨基的PEG 反应。在位置1 (即在N端) 之前、位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、

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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置) 处的每个残基分别由具有以下结构的非天然编码氨基酸取代:



[1046] 用于将对氨基苯丙氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:13 (或在SEQ ID NO:1、2或14中的相应位置), 和SEQ ID NO:16或 17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 以及以上所述并且用于位点特异性地掺入对氨基苯丙氨酸所掺入的序列。

[1047] 一经修饰, 包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应:



[1049] 其中R为甲基, n为3并且N为约10,000MW。将含有对氨基苯丙氨酸的经纯化松弛素以10mg/mL溶解于25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH6.0)、25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 7.0), 或10 mM乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (pH 4.5) 中, 使其与10倍至100 倍过量的含氨基的PEG反应, 并且然后在室温下搅拌10-16小时 (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 第475页)。随后, 将PEG-松弛素稀释在适当缓冲液中用于立即纯化和分析。

[1050] 实施例12

[1051] 与由经由酰胺键与PEG连接的羟胺基组成的PEG缀合。

[1052] 使用实施例3-9中所描述的程序使具有以下结构的PEG试剂与含酮的非天然编码氨基酸偶联:



[1054] 其中R为甲基, n=4并且N为约5,000MW-40,000MW。反应、纯化和分析条件如本领域中所描述并且是本领域中已知的。

[1055] 实施例13

[1056] 本实施例详述将两种不同的非天然编码氨基酸引入到松弛素多肽和松弛素类似物多肽中。

[1057] 本实施例展示一种产生在以下残基中的两个位置处掺有包含酮官能团的非天然编码氨基酸的松弛素多肽的方法: 位置1 (即在N端) 之前、位置 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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置)。如上所述的那样制备松弛素多肽, 但是在核酸内的两个不同位点处引入选择密码子。

[1058] 实施例14

[1059] 本实施例详述松弛素多肽或松弛素类似物多肽与含酰肼的PEG的缀合以及随后的

原位还原。

[1060] 根据上述程序制备掺有含羰基的氨基酸的松弛素多肽。一经修饰,具有以下结构的含酰肼的PEG立即与松弛素多肽缀合:

[1061] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-X-NH-NH_2$

[1062] 其中R为甲基, $n=2$ 并且 $N=5,000、10,000、20,000、30,000$ 或 $40,000$ MW, 并且X为羰基 ($C=O$)。将含有对乙酰基苯丙氨酸的经纯化松弛素以介于 $0.1-10\text{ mg/mL}$ 之间的浓度溶解于 25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 6.0$)、 25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 7.0$), 或 10mM 乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 4.5$) 中, 使其与1倍至100倍过量的含酰肼的PEG反应, 并且通过加入溶解于 H_2O 中至最终浓度为 $10-50\text{mM}$ 的储备液 1M NaCNBH_3 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 来原位还原相应脒。在黑暗环境中在 4°C 至 RT 下反应18-24小时。通过加入约 $\text{pH } 7.6$ 的 1M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 至最终Tris浓度为 50mM 来终止反应或将反应物稀释在适当缓冲液中用于立即纯化。

[1063] 实施例15

[1064] 本实施例详述松弛素多肽或松弛素类似物多肽与含酰肼的PEG的缀合以及随后的原位还原。

[1065] 根据上述程序制备掺有含羰基的氨基酸的松弛素多肽。一经修饰,具有以下结构的含酰肼的PEG立即与松弛素多肽缀合:

[1066] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-X-NH-NH_2$

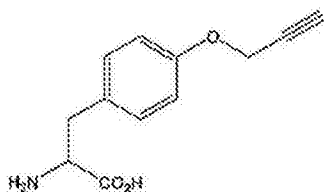
[1067] 其中R为甲基, $n=2$ 并且 $N=20,000$ MW, 并且X为羰基 ($C=O$)。将含有对乙酰基苯丙氨酸的经纯化松弛素以介于 $0.1-10\text{mg/mL}$ 之间的浓度溶解于 25mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 6.0$)、 25mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 7.0$), 或 10mM 乙酸钠 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ($\text{pH } 4.5$) 中, 使其与1倍至100倍过量的含酰肼的PEG反应, 并且通过加入溶解于 H_2O 中至最终浓度为 $10-50\text{mM}$ 的储备液 1M NaCNBH_3 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 来原位还原相应脒。在黑暗环境中在 4°C 至 RT 下反应18-24小时。通过加入约 $\text{pH } 7.6$ 的 1M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 直至最终Tris浓度为 50mM 来终止反应或将反应物稀释在适当缓冲液中用于立即纯化。

[1068] 实施例16

[1069] 本实施例详述将含炔的氨基酸引入到松弛素多肽或松弛素类似物多肽中以及用mPEG-叠氮化物使其衍生化。

[1070] 以下在位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置) 处的残基各自被以下非天然编码氨基酸取代:

[1071]



[1072] 用于将对炔丙基-酪氨酸位点特异性地掺入到松弛素中的序列为SEQ ID NO:1 (或在SEQ ID NO:2或3中的相应位置), SEQ ID NO:16或17 (muttRNA, 詹氏甲烷球菌), 和以上

所述的SEQ ID NO:22、23或24。在大肠杆菌中表达含有炔丙基酪氨酸的松弛素多肽并且使用上述条件进行纯化。

[1073] 将含有炔丙基-酪氨酸的经纯化松弛素以介于0.1-10mg/mL的浓度溶解于PB缓冲液(100mM磷酸钠,0.15M NaCl,pH=8)中并且向反应混合物中加入10倍至1000倍过量的含叠氮基的PEG。然后,将催化量的CuSO₄和铜丝加入到反应混合物中。在将混合物温育(包括但不限于在室温或37℃下温育约4小时,或在4℃下温育过夜)后,加入H₂O并且将混合物通过透析膜过滤。可包括但不限于通过与实施例3中所描述的程序类似的程序来分析样品的添加。在本实施例中,PEG将具有以下结构:

[1074] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N_3$

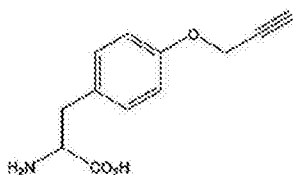
[1075] 其中R为甲基,n为4并且N为5,000、10,000、20,000、30,000或40,000 MW。

[1076] 实施例17

[1077] 本实施例详述用炔丙基酪氨酸取代松弛素多肽中大的疏水性氨基酸。

[1078] 存在于松弛素的一个以下区域中的Phe、Trp或Tyr残基:位置1(即在N端)之前、位置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(即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置)如以上所述被以下非天然编码氨基酸取代:

[1079]



[1080] 一经修饰,PEG立即与包含炔的氨基酸的松弛素多肽变异体连接。PEG将具有以下结构:

[1081] $Me-PEG(N)-O-(CH_2)_2-N_3$

[1082] 并且偶联程序将遵循以上实施例中的程序。这将产生松弛素多肽变异体,其包含大致与一种天然存在的大的疏水性氨基酸等比容的非天然编码氨基酸并且在所述多肽内的不同位点处被PEG衍生物修饰。

[1083] 实施例18

[1084] 本实施例详述由一个或多个PEG连接子分隔的松弛素多肽同源二聚物、异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物的产生。松弛素多肽多聚物可在胰岛素原之间形成或在本发明的成熟A链与B链松弛素多肽之间形成。

[1085] 使以上实施例中产生的含炔的松弛素多肽变异体与以下形式的双官能PEG衍生物反应:

[1086] $N_3-(CH_2)_n-C(O)-NH-(CH_2)_2-O-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N_3$

[1087] 其中n为4并且PEG具有约5,000、10,000、20,000、30,000或40,000MW的平均MW,以产生其中两种松弛素分子由PEG物理分隔开的相应松弛素多肽同源二聚物。松弛素多肽可以类似方式与一种或多种其它多肽偶联以形成异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物。偶联、纯化和分析如上面实施例中所描述的那样执行。

[1088] 实施例19

[1089] 本实施例详述由一个或多个PEG连接子分隔的松弛素多肽同源二聚物、异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物的产生。松弛素多肽多聚物可在A链与其它A链或者B链与其它B链之间形成。

[1090] 使以上实施例中产生的含炔的松弛素多肽变异体与以下形式的双官能 PEG 衍生物反应：

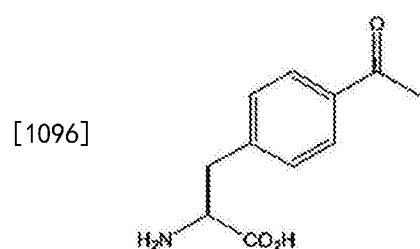
[1091] $N_3-(CH_2)_n-C(O)-NH-(CH_2)_2-O-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N_3$

[1092] 其中n为4并且PEG具有约5,000、10,000、20,000、30,000或40,000MW 的平均MW,以产生其中两种松弛素分子由PEG物理分隔开的相应松弛素多肽同源二聚物。松弛素多肽可以类似方式与一种或多种其它多肽偶联以形成异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物。偶联、纯化和分析如上面实施例中所述的那样执行。

[1093] 实施例20

[1094] 本实施例详述糖部分与松弛素多肽的偶联。

[1095] 以下位置1 (即在N端) 之前、位置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 (即在SEQ ID NO:1的蛋白质的羧基端或在SEQ ID NO:2和3中的相应位置) 处的一个残基如上所述由下面的非天然编码氨基酸取代。



[1097] 一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) 的β-连接氨基糖类似物反应。在100mM水性乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) 中混合松弛素多肽变异体 (10mg/mL) 与氨基糖 (21mM), 并且在 37°C 下温育7小时至26小时。通过将糖缀合的松弛素多肽 (5mg/mL) 与UDP- 半乳糖 (16mM) 和β-1,4-半乳糖基转移酶 (0.4单位/毫升) 一起在150mM HEPES缓冲液 (pH 7.4) 中在环境温度下温育48小时而使第二种糖与第一种糖酶促偶联 (Schanbacher等, J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061)。

[1098] 实施例22

[1099] 本实施例详述聚乙二醇化松弛素多肽拮抗剂的产生。

[1100] 包括但不限于与松弛素受体结合有关的残基的残基如上所述被以下非天然编码氨基酸取代。一经修饰,包含含羰基的氨基酸的松弛素多肽变异体立即与以下形式的含氨基的PEG衍生物反应：

[1101] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1102] 其中R为甲基,n为4并且N为5,000、10,000、20,000、30,000或40,000 MW,以产生在多肽内的单一位点处被PEG衍生物修饰的包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽拮抗剂。偶联、纯化和分析如上所述的那样执行。

[1103] 实施例21

[1104] 其中松弛素分子被直接连接的松弛素多肽同源二聚物、异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物的产生

[1105] 包含含炔的氨基酸的松弛素多肽变异体可与另一种包含含叠氮基的氨基酸的松弛素多肽变异体直接偶联。松弛素多肽多肽可以类似方式与一种或多种其它多肽偶联从而形成异源二聚物、同源多聚物或异源多聚物。关于可形成的多聚物的更多描述提供在上文实施例16和17中,偶联、纯化和分析如以上所述的那样执行。

[1106] 实施例22



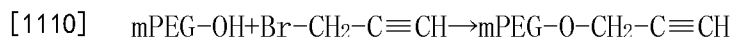
[1107]

A

B

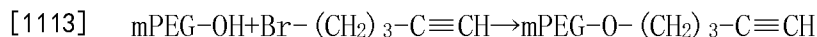
[1108] 使聚亚烷基二醇(P-OH)与烷基卤化物(A)反应从而形成醚(B)。在这些化合物中,n为1至9的整数并且R'可为直链或支链、饱和或不饱和的C1至C20烷基或杂烷基。R'也可C3至C7饱和或不饱和的环状烷基或环状杂烷基,经取代或未经取代的芳基或杂芳基,或者经取代或未经取代的烷芳基(所述烷基为C1至C20饱和或不饱和烷基)或杂烷芳基。通常,PEG-OH为具有800道尔顿至40,000道尔顿(Da)的分子量的聚乙二醇(PEG)或单甲氧基聚乙二醇(mPEG)。

[1109] 实施例23



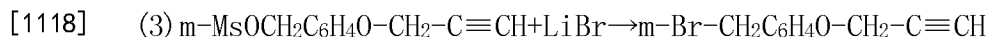
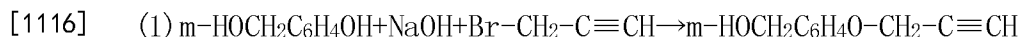
[1111] 用在THF(35mL)中的NaH(12mg,0.5mmol)处理具有20,000Da的分子量的mPEG-OH(mPEG-OH 20kDa;2.0g,0.1mmol,Sunbio)。然后,将溶解于二甲苯中的80重量%溶液形式的炔丙基溴溶液(0.56mL,5mmol,50当量,Aldrich)和催化量的KI加入到该溶液中并且将所得混合物加热至回流并保持回流2小时。然后加入水(1mL)并且在真空下去除溶剂。向残余物中加入CH₂Cl₂(25mL)并且分离有机层,用无水Na₂SO₄干燥,并将体积缩减至约2mL。将此CH₂Cl₂溶液逐滴加入到乙醚(150mL)中。收集所得沉淀物,用数份冷乙醚洗涤并干燥从而得到炔丙基-O-PEG。

[1112] 实施例24



[1114] 用在THF(35mL)中的NaH(12mg,0.5mmol)处理具有20,000Da的分子量的mPEG-OH(mPEG-OH 20kDa;2.0g,0.1mmol,Sunbio)。然后,将50当量的5-溴-1-戊炔(0.53mL,5mmol,Aldrich)和催化量的KI加入到该混合物中。将所得混合物加热至回流并保持回流16小时。然后加入水(1mL)并且在真空下去除溶剂。向残余物中加入CH₂Cl₂(25mL)并且分离有机层,用无水Na₂SO₄干燥,并将体积缩减至约2mL。将此CH₂Cl₂溶液逐滴添加到乙醚(150mL)中。收集所得沉淀物,用数份冷乙醚洗涤并干燥从而得到相应炔。5-氯-1-戊炔可用于类似反应中。

[1115] 实施例25



[1120] 首先向3-羟基苄醇(2.4g,20mmol)在THF(50mL)和水(2.5mL)中的溶液中加入粉末状氢氧化钠(1.5g,37.5mmol),然后加入溶解于二甲苯中的80重量%溶液形式的炔丙基溴

溶液 (3.36mL, 30mmol)。将反应混合物在回流下加热6小时。向混合物中加入10%柠檬酸 (2.5mL) 并且在真空下去除溶剂。用乙酸乙酯 (3×15mL) 萃取残余物并且用饱和NaCl溶液 (10mL) 洗涤合并的有机层, 用MgSO₄干燥并浓缩从而得到3-炔丙基氧基苄醇。

[1121] 在0℃下将甲烷磺酰氯 (2.5g, 15.7mmol) 和三乙胺 (2.8mL, 20mmol) 加入到化合物3 (2.0g, 11.0mmol) 在CH₂Cl₂中的溶液中, 并且将反应物放置在冰箱中16小时。常用后处理得到呈浅黄色油状物的甲磺酸酯。将所述油状物 (2.4g, 9.2mmol) 溶解于THF (20mL) 中并且加入LiBr (2.0g, 23.0mmol)。将反应混合物加热至回流1小时并且然后冷却至室温。向混合物中加入水 (2.5mL) 并在真空下去除溶剂。用乙酸乙酯 (3×15mL) 萃取残余物并且用饱和NaCl溶液 (10mL) 洗涤合并的有机层, 用无水Na₂SO₄干燥并浓缩从而得到所需溴化物。

[1122] 将mPEG-OH 20kDa (1.0g, 0.05mmol, Sunbio) 溶解于THF (20mL) 中并且在冰浴中冷却所述溶液。在剧烈搅拌下历经数分钟加入NaH (6mg, 0.25mmol), 接着加入上文获得的溴化物 (2.55g, 11.4mmol) 和催化量的KI。移除冷却浴并且将所得混合物加热至回流并持续回流12小时。向该混合物中加入水 (1.0mL) 并在真空下去除溶剂。向残余物中加入CH₂Cl₂ (25mL) 并且分离有机层, 用无水Na₂SO₄干燥, 并将体积缩减至约2mL。逐滴加入到乙醚溶液 (150mL) 中, 产生白色沉淀物, 收集所述沉淀物从而得到PEG衍生物。

[1123] 实施例26

[1124]
$$\text{mPEG-NH}_2 + \text{X-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-C}\equiv\text{CR}' \rightarrow \text{mPEG-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-C}\equiv\text{CR}'$$

[1125] 如上所示, 也可通过使含有末端官能团的聚(乙二醇)聚合物与含有炔官能团的反应性分子偶联来获得末端含炔的聚(乙二醇)聚合物。 n 介于1与10之间。 R' 可为H或从C₁至C₄的小烷基。

[1126] 实施例27

[1127] (1) $\text{HO}_2\text{C-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{NHS} + \text{DCC} \rightarrow \text{NHSO-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

[1128] (2) $\text{mPEG-NH}_2 + \text{NHSO-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow \text{mPEG-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

[1129] 将4-戊炔酸 (2.943g, 3.0mmol) 溶解于CH₂Cl₂ (25mL) 中。加入N-羟基琥珀酰亚胺 (3.80g, 3.3mmol) 和DCC (4.66g, 3.0mmol) 并且将溶液在室温下搅拌过夜。将所得粗NHS酯7用于下一反应中而无需进一步纯化。

[1130] 将具有5,000Da分子量的mPEG-NH₂ (mPEG-NH₂, 1g, Sunbio) 溶解于THF (50mL) 中并且将混合物冷却至4℃。在剧烈搅拌下分批加入NHS酯7 (400mg, 0.4mmol)。让混合物搅拌3小时同时升温到室温。然后加入水 (2mL) 并在真空下去除溶剂。向残余物中加入CH₂Cl₂ (50mL) 并且分离有机层, 用无水Na₂SO₄干燥, 并将体积缩减至约2mL。将此CH₂Cl₂溶液逐滴加入到乙醚 (150mL) 中。收集所得沉淀物并在真空中干燥。

[1131] 实施例28

[1132] 本实施例表示聚(乙二醇)的甲烷磺酰基酯(其也可称作聚(乙二醇)的甲烷磺酸酯或甲磺酸酯)的制备。可通过类似程序制备相应的甲苯磺酸酯和卤化物。

[1133]
$$\text{mPEG-OH} + \text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl} + \text{N(Et)}_3 \rightarrow \text{mPEG-O-SO}_2\text{CH}_3 \rightarrow \text{mPEG-N}_3$$

[1134] 在氮气下, 将在150mL甲苯中的mPEG-OH (MW=3,400, 25g, 10mmol) 共沸蒸馏2小时并且将溶液冷却至室温。将40mL干燥CH₂Cl₂和2.1mL干燥三乙胺 (15mmol) 加入到该溶液中。在冰浴中冷却该溶液并且逐滴加入1.2mL经蒸馏的甲烷磺酰氯 (15mmol)。将该溶液在室温下在氮气下搅拌过夜, 并且通过加入2mL绝对乙醇来中止反应。在真空下蒸发该混合物

从而去除溶剂(主要是除甲苯以外的溶剂),过滤,再次在真空下浓缩并且然后在100mL乙醚中沉淀。用数份冷乙醚洗涤滤液并在真空下干燥从而得到甲磺酸酯。

[1135] 将甲磺酸酯(20g,8mmol)溶解于75mL THF中并且将溶液冷却至4℃。向经冷却的溶液中加入叠氮化钠(1.56g,24mmol)。将反应物在氮气下加热至回流并保持回流2小时。然后蒸发溶剂并且用CH₂Cl₂(50mL)稀释残余物。用NaCl溶液洗涤有机级分并且用无水MgSO₄干燥。将体积缩减至20mL,并通过加入到150mL冷干燥的乙醚中来使产物沉淀。

[1136] 实施例29

[1137] (1) N₃-C₆H₄-CO₂H→N₃-C₆H₄CH₂OH

[1138] (2) N₃-C₆H₄CH₂OH→Br-CH₂-C₆H₄-N₃

[1139] (3) mPEG-OH+Br-CH₂-C₆H₄-N₃→mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃

[1140] 可使用美国专利5,998,595中所描述的方法来生产4-叠氮基苄醇,所述专利以引用的方式并入本文。在0℃下将甲烷磺酰氯(2.5g,15.7mmol)和三乙胺(2.8mL,20mmol)加入到4-叠氮基苄醇(1.75g,11.0mmol)的CH₂Cl₂溶液中,并且将反应物放置在冰箱中16小时。常用后处理得到呈浅黄色油状物的甲磺酸酯。将该油状物(9.2mmol)溶解于THF(20mL)中并且加入LiBr(2.0g,23.0mmol)。将反应混合物加热至回流并保持回流1小时,然后将其冷却至室温。向混合物中加入水(2.5mL)并在真空下去除溶剂。用乙酸乙酯(3×15mL)萃取残余物并且用饱和NaCl溶液(10mL)洗涤合并的有机层,用无水Na₂SO₄干燥并浓缩从而得到所需溴化物。

[1141] 用在THF(35mL)中的NaH(12mg,0.5mmol)处理mPEG-OH 20kDa(2.0g,0.1mmol,Sunbio)并且向混合物中加入溴化物(3.32g,15mmol)和催化量的KI。将所得混合物加热至回流并保持回流12小时。将水(1.0mL)加入到该混合物中并在真空下去除溶剂。向残余物中加入CH₂Cl₂(25mL)并且分离有机层,用无水Na₂SO₄干燥,并将体积缩减至约2mL。逐滴加入到乙醚溶液(150mL)中,产生沉淀物,收集所述沉淀物以得到mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃。

[1142] 实施例30

[1143] NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H+N₃-CH₂CH₂CO₂-NHS→N₃-CH₂CH₂-C(O)NH-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H

[1144] 将NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H(MW 3,400Da,2.0g)溶解于NaHCO₃饱和水溶液(10mL)中并且将溶液冷却至0℃。在剧烈搅拌下加入丙酸3-叠氮基-1-N-羟基琥珀酰亚胺酯(5当量)。3小时后,加入20mL H₂O并且再将混合物在室温下搅拌45分钟。用0.5N H₂SO₄将pH值调节至3并且加入NaCl至浓度为约15wt%。用CH₂Cl₂(100mL×3)萃取反应混合物,用Na₂SO₄干燥并浓缩。用冷乙醚沉淀后,通过过滤收集产物并在真空下干燥,从而得到ω-羧基-叠氮基PEG衍生物。

[1145] 实施例31

[1146] mPEG-OMs+HC≡CLi→mPEG-O-CH₂-CH₂-C≡C-H

[1147] 在剧烈搅拌下,向如本领域中已知的那样制备并冷却至-78℃的乙炔锂(4当量)的THF溶液中逐滴加入溶解于THF中的mPEG-OMs溶液。3小时后,让反应物升温至室温并通过加入1mL丁醇来中止反应。然后加入20mL H₂O并且再将混合物在室温下搅拌45分钟。用0.5N H₂SO₄将pH值调节至3并且加入NaCl至浓度为约15wt%。用CH₂Cl₂(100mL×3)萃取反应混合物,用Na₂SO₄干燥并浓缩。在用冷乙醚沉淀后,通过过滤收集产物并在真空下干燥,从而得到1-(丁-3-炔基氧基)-甲氧基聚乙二醇(mPEG)。

[1148] 实施例32

[1149] 可使用以下文献中描述的方法将含叠氮基的氨基酸和含乙炔的氨基酸位点选择性地掺入到蛋白质中:L..Wang等,(2001),Science 292:498-500;J. W.Chin等,Science 301:964-7 (2003);J.W.Chin等,(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等,(2002),PNAS United States of America 99:11020-11024;以及L.Wang,&P.G.Schultz,(2002),Chem. Comm.,1:1-11。掺入氨基酸后,立即在37℃下,在2mM PEG衍生物、1mM CuSO₄和~1mg铜丝的存在下,用0.01mM在磷酸盐缓冲液(PB) (pH 8)中的蛋白质进行环加成反应,持续4小时。

[1150] 实施例33

[1151] 本实施例描述对乙酰基-D,L-苯丙氨酸(pAF)和m-PEG-羟胺衍生物的合成。

[1152] 使用先前描述于Zhang,Z.,Smith,B.A.C.,Wang,L.,Brock,A.,Cho,C. &Schultz,P.G.,Biochemistry (2003) 42,6735-6746中的程序来合成外消旋 pAF。

[1153] 为了合成m-PEG-羟胺衍生物,完成以下程序。向在室温(RT)下搅拌1 小时的(N-t-Boc-氨基)乙酸(0.382g,2.0mmol)和1,3-二异丙基碳化二亚胺(0.16mL,1.0mmol)在二氯甲烷(DCM,70mL)中的溶液中加入甲氧基-聚乙二醇胺(m-PEG-NH₂,7.5g,0.25mmol, Mt.30K,来自BioVectra)和二异丙基乙胺(0.1mL,0.5mmol)。将反应物在RT下搅拌48小时,并且接着浓缩至约100mL。将混合物逐滴加入到冷乙醚(800mL)中。经t-Boc保护的产物沉淀析出,通过过滤收集该沉淀并用乙醚3×100mL洗涤。通过将该产物再次溶解于DCM(100mL)中并且在乙醚(800mL)中沉淀两次来将其进一步纯化。在真空中干燥产物,得到7.2g (96%),通过NMR和茚三酮试验(Nihydrin test)加以确认。

[1154] 上文获得的经保护产物(7.0g)的Boc脱除在50%TFA/DCM(40mL)中在 0℃下进行1小时并且接着在室温下进行1.5小时。在真空中去除大部分TFA 后,通过向残余物中加入含4N HCl的二噁烷(1mL)来使羟胺衍生物的TFA 盐转化为HCl盐。将沉淀物溶解于DCM(50mL)中并且使其再次在乙醚(800mL)中沉淀。通过过滤收集最终产物(6.8g,97%),用乙醚3×100mL洗涤,在真空中干燥,在氮气下储存。使用相同程序合成其它PEG(5K、20K)羟胺衍生物。

[1155] 实施例34

[1156] 聚乙二醇化松弛素的活体内研究

[1157] 向小鼠或大鼠施用PEG-松弛素、未经修饰的松弛素和缓冲溶液。结果显示,本发明的聚乙二醇化松弛素与未经修饰的松弛素相比具有优良的活性和延长的半衰期。类似地,向小鼠或大鼠施用经修饰松弛素、未经修饰的松弛素和缓冲溶液。

[1158] 药物动力学分析

[1159] 通过静脉内或皮下途径向小鼠施用本发明的松弛素多肽。在给药之前以及在给药之后的多个时间点对动物采血。采集每个样品的血浆并通过放射免疫测定分析。可计算消除半衰期并且将其在包含非天然编码氨基酸的松弛素多肽与野生型松弛素或本发明的各种松弛素类似物多肽之间进行比较。类似地,可向猕猴施用本发明的松弛素多肽。在给药之前以及在给药之后的多个时间点对动物采血。采集每个样品的血浆并通过放射免疫测定进行分析。

[1160] 可经由多次剂量、连续输注或单次剂量等向小鼠施用多肽。

[1161] 实施例35

[1162] 使用Novagen表达系统(诱导性T7启动子;详细描述于以引用方式并入本文的pET System Manual,第9版中)、表达载体pET30a和表达菌株BL21 (DE3)表达松弛素。

[1163] 给2mL LB/卡那霉素(10 μ g/ml)培养物接种用所需类似物转化的BL21 (DE3)板的扫落物(sweep)。这减少由菌落之间的表达水平变化所引起的影响。让这一培养物在剧烈震荡下在37 $^{\circ}$ C下生长过夜并且在第二天给10mL LB/卡那霉素培养物接种1mL过夜培养物(OD600~0.4-0.5)。可将剩余几毫升过夜培养物冷冻作为甘油储备液。

[1164] 将10mL生长培养物放在37 $^{\circ}$ C和250rpm下30-45min直至OD600达到0.8-0.9。这一物质然后用1mM IPTG进行诱导(其中可留出1mL作为非诱导性培养对照)并且通常在诱导后3-4小时进行收获并且在SDS-PAGE上进行分析。

[1165] 也可以进行一定时间过程的表达(例如诱导后1、2、4、6小时的时间点和0/N)以确定累积率、蛋白质稳定性等。

[1166] 凝胶分析:在诱导后的所需时间点从培养物收获1mL,将细胞旋转,重悬于100 μ L 2X SDS-PAGE中,加以声波处理以降低粘度并且将10 μ L用 SDS-PAGE电泳。需要时,可将这与一个(多个)非诱导性对照和/或已知阳性对照或标准物相比并且可估计表达水平(例如良好表达可为>100 μ g/ml)。也可使用Western印迹分析。也可以留出4mL培养物,制备包涵体(如果表达不溶性类似物)并且对这些包涵体进行质谱分析从而证实过表达的蛋白质的一致性。

[1167] 对于较大规模蛋白质表达来说,给>250mL LB/卡那霉素(10 μ g/ml)接种 250 μ L冷冻甘油储备液并且让其生长过夜。第二天,给10X 1L LB/卡那霉素培养物接种25mL过夜培养物(OD600~0.1)。

[1168] 让1L培养物在37 $^{\circ}$ C和250rpm下生长~2小时直至OD600达到0.8-0.9。这一物质然后用1mM IPTG进行诱导并且在诱导后4小时或第二天早晨进行收获(收获可通过在4,000rpm下离心15min来进行)。如果需要减少内毒素并且促进纯化,那么用50mM Tris-HCl, pH 8.0(每一球粒50mL+用于冲洗瓶子的50mL)冲洗球粒。将球粒混合在一起并且再次旋转。

[1169] 实施例36

[1170] 毕赤酵母表达研究—DNA制备、电穿孔、表达方案

[1171] 本实施例提供一种在毕赤酵母中制备本发明松弛素多肽的方案。使用SEQ ID NO: 34、35、36和37,并且质粒可用于克隆到毕赤酵母中并且这种或其它经修饰质粒可用来获得松弛素多肽在毕赤酵母中的蛋白质表达,使用本领域中已知的方法对所述质粒进行修饰。

[1172] 在所述方案的第1天,进行过夜消化,通常每 μ g待消化DNA使用2U 酶,并且从甘油储备液中将10mL YPhyD培养物接种于50mL烧瓶中过夜,并在260rpm、30 $^{\circ}$ C下震荡。

[1173] DNA制备

[1174] 通过首先添加1/10体积的无菌3M NaOAc,然后添加0.7体积的无菌IPA 来使DNA沉淀,然后有力地混合该样品并在-20 $^{\circ}$ C下或在-70 $^{\circ}$ C下继续沉淀过夜直至冻住。然后通过离心(benchtop离心机,14,000rpm/10分钟)使DNA成球粒,移除上清液,并且使用500 μ L无菌70%ETOH洗涤球粒。旋转(bench-top离心机,14,000rpm/10分钟),倾析上清液并且风干球粒15-20分钟。用无菌水重悬DNA球粒直至1 μ g/ μ L并且用10 μ g DNA转化毕赤酵母。

[1175] 电穿孔

[1176] 使用OD₆₀₀过夜培养物,用YPhyD稀释至OD₆₀₀=0.2。在260rpm、30℃下震荡培养物直至OD₆₀₀达到0.8-1.0。通过离心(4000rpm/5分钟)收集细胞。倾析培养基,用20mL冰冷无菌水洗涤细胞,再次倾析并且重复。在水洗涤后,用20mL冰冷无菌1M山梨糖醇洗涤球粒,倾析,并且将洗过的细胞球粒重悬于600μL 1M冷山梨糖醇中,然后将这一悬浮液储存在冰上。

[1177] 在无菌1.5mL eppendorf离心管中将来自经洗涤细胞的50μL与10μg 线性化DNA混合,轻轻地混合并且在冰上温育25分钟。使用长移液管尖将细胞/DNA混合物转移至预冷却的0.2cm比色皿中。使用BioRad GenePulsar II装置在以下设置下对细胞进行电穿孔:2000V、200欧姆、25μF(使用单脉冲),并且立即将0.5mL YPhyD培养基添加到比色皿中并通过移液操作来混合。将全部内容物转移至无菌圆底试管中并且在30℃下轻轻地震荡(200 rpm)30分钟。均匀地铺入并展布细胞,并且在30℃下倒置温育培养板3天。

[1178] 培育三天后,用环挑取菌落,将其接种到50mL烧瓶中的10mL BYPhyD 培养基中并且在30℃下温育3天。对20μL板上的菌落进行计数,记录平均数目并且然后收获细胞,首先准备2套标有菌株名称和克隆数目、松弛素(即所表达的蛋白质)和日期的冷冻管。将培养物转移至15mL锥形管中,获取每种培养物的OD₆₀₀,用YPhyD培养基以1:50或1:20稀释培养物。保留培养物的等分试样作为甘油储备液。然后在RT下使酵母在4000rpm下成球粒,持续5min,将上清液转移至新的有标记的15mL锥形管中,并且储存在-20℃或-80℃下直至分析数据需要时。

[1179] 蛋白质表达分析

[1180] 将样品在4-12%NuPAGE TB凝胶(Novex)上电泳。使用来自Invitrogen 的SDS-PAGE试剂,并通过Western印迹法或染色凝胶分析来进行分析。

[1181] 培养基配方

[1182] 缓冲酵母植物蛋白胨右旋糖(BYPhyD)

[1183] 酵母提取物 10g/L

[1184] 植物蛋白胨 20g/L

[1185] 1M磷酸钾缓冲液(pH 6) 100mL/L

[1186] 10X YNB 100mL/L

[1187] 20%右旋糖 100mL/L

[1188] 酵母植物蛋白胨右旋糖(YPhyD)

[1189] 酵母提取物 10g/L

[1190] 植物蛋白胨 20g/L

[1191] 20%右旋糖 100mL/L

[1192] 10X YNB (13.4%含硫酸铵但不含氨基酸的酵母氮源)

[1193] 酵母氮源 134g/L

[1194] 实施例37

[1195] 松弛素A21G生产

[1196] 在本实施例中,使4.0L培养物发酵从而产生13.4g湿细胞匀浆,并且在存在和不存在Triton-X100的情况下制备包涵体。以此方式生产2.07g湿包涵体,并且随后进行溶解和再折叠。每克湿包涵体(IB)用200mL H₂O使包涵体重悬直至3mM的最终浓度,并且将半胱氨

酸添加到重悬液中。然后通过使 pH 值增加至 11.5 历时 1 小时来溶解 IB。然后通过使所溶解物质的 pH 值下降至 10.6 ± 0.1 并且储存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下 ~ 72 小时来使得发生再折叠,并且在图 10 中示出这些结果。通过添加 HCl 直至最终 pH 值为 3.0 来中止再折叠反应,经 $0.45\mu\text{M}$ 过滤并且储存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下直至进一步处理。

[1197] 通过如下方式纯化再折叠蛋白质:用 Tris 碱使淬灭的再折叠的 pH 值增加至 8.0 并且直接加载到 Q HP 柱上。在所示情况下加载的传导率为 $> 3.5\text{mS/cm}$ 。过柱条件是 (A) 20mM Tris (8.0); (B) 20mM Tris (8.0); 200mM NaCl 并且在 30CV 下存在 0-100%B。将正确再折叠的胰岛素原汇集在一起并且回收 79mg 胰岛素原。

[1198] 进行超滤/透滤 (UF/DF) 并且用 25mM 锌进行沉淀,将所沉淀的蛋白质用 20mM NaOAc (4.0)、30% ACN、5mM EDTA 重悬至 2mg/mL 浓度,并且添加 20K PEG 直到 PEG 与蛋白质的最终摩尔比为 10:1,并且在 28°C 下温育 48-72 小时。

[1199] 用 0.5X PEG 缓冲液 A 以 1:10 稀释 PEG 反应物,经 $0.22\mu\text{M}$ 过滤并且在 SP 650S 柱上过柱。过柱条件是 (A) 10mM NaOAc (4.0)、1mM EDTA; (B) 10mM NaOAc (4.0)、1mM EDTA、0.4M NaCl; 在 20CV 下 0-50%B 和用 10mM 柠檬酸钠 (6.5) 调配的 PEG 样品; 150mM NaCl, 并且在图 12 中示出这一情况。

[1200] 使用这些方法生产多种具有非天然氨基酸的松弛素多肽,其中经纯化和聚乙二醇化的变异体的末端蛋白质含量的范围为 0.1-22mg。发现在 PEG 反应中 ACN 有助于溶解 PEG/蛋白质混合物并且在 pI 下的锌沉淀促进在 CAN 存在下的浓缩。

[1201] 实施例 38

[1202] 包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素的安全性和/或功效的人类临床试验。

[1203] 目的:为了观测经皮下施用的包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化重组人松弛素的安全性和药物动力学。

[1204] 患者该项研究中录入 18 名年龄介于 20-40 岁之间并且体重介于 60-90kg 之间的健康志愿者。所述受试者应不会具有临床上显著异常的针对血液学或血清化学以及阴性尿毒物学筛选、HIV 筛选和 B 型肝炎表面抗原的实验值。他们不应具有任何以下迹象:高血压;任何原发性血液病史;严重肝病、肾病、心血管疾病、胃肠疾病、泌尿生殖系统疾病、代谢疾病、神经病史;贫血或癫痫病史;已知对细菌或哺乳动物来源的产品、PEG 或人血清白蛋白具有过敏性;含咖啡因的饮料的习惯性和重度消费者 (heavy consumer); 在进入研究的 30 天内参与任何其它临床试验或输血或献血;在进入研究的 3 个月内曾接触松弛素;在进入研究的 7 天内患病;以及在研究前身体检查时或在进入研究的 14 天内临床实验室评价时具有显著异常。可对所有受试者评价安全性,并且按时采集所有血液采集物用于药物动力学分析。所有研究都是在机构伦理委员会批准和患者同意下进行。

[1205] 研究设计:这项研究将为在健康男性志愿者中的第 I 阶段、单一中心、开放标记、随机性、两个周期的交叉研究。将 18 名受试者随机分配到两个治疗顺序组中的一组中 (每组 9 名受试者)。使用相等剂量的包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素和所选的可商购获得的产品,在大腿上部经两个分开的给药期通过皮下推注施用松弛素。可商购获得的产品施用剂量和频率是按照包装标签中所指示的进行。可通过引入另外的受试者组而在研究中加入使用可商购获得的产品另外的剂量、给药频率或所需要的其它参数。每个给

药期均由14天的清洗期分隔开。对于两个给药期的每一时期来说,在给药之前至少12小时以及给药后72小时将受试者限制在研究中心,但在给药期之间不必如此。如果还存在另外的剂量、频率或其它参数,那么也可加入另外的受试者组来测试聚乙二醇化松弛素。松弛素的实验制剂为包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素。

[1206] 血液取样:在施用松弛素之前和之后,通过直接静脉穿刺连续取血。在给药之前约30分钟、20分钟和10分钟(3个基线样品)以及在给药后大致以下时间:30分钟和1小时、2小时、5小时、8小时、12小时、15小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时和72小时,获取静脉血样(5mL)用于确定血清松弛素浓度。将每个血清样品分为两个等分试样。将所有血清样品储存在-20℃下。将血清样品放在干冰上装运。在第1天初始给药前即刻、第4天早晨、第16天给药前即刻以及第19天早晨进行空腹临床实验测试(血液学、血清化学和尿分析)。

[1207] 生物分析方法:使用ELISA试剂盒来测定血清松弛素浓度。

[1208] 安全性确定:在每次给药(第1天和第16天)之前即刻以及在每次给药后6小时、24小时、48小时和72小时记录生命体征。基于不利事件的发生率和类型以及临床实验测试与基线相比的变化来确定安全性。另外,评价包括血压在内的生命体征测量结果和身体检查结果与研究前相比的变化。

[1209] 数据分析:通过从每一个给药后的数值减去通过对给药前30分钟、20分钟和10分钟时采集的三个样品的松弛素水平取平均值而确定的平均基线松弛素浓度来针对给药前基线松弛素浓度修正给药后血清浓度值。如果给药前血清松弛素浓度低于所述测定的定量水平,那么其不包括在平均值的计算中。由针对基线松弛素浓度修正的血清浓度数据确定药物动力学参数。使用 BIOAVL 软件的最新版本,通过利用 Digital Equipment Corporation VAX 8600 计算机系统上的不依赖于模型的方法来计算药物动力学参数。确定以下药物动力学参数:峰值血清浓度(C_{max});达到峰值血清浓度的时间(t_{max});通过使用线性梯形规则计算的从时间零时到最后血液取样时间(AUC₀₋₇₂)的浓度-时间曲线下面积(AUC);以及根据消除速率常数计算的末期消除半衰期($t_{1/2}$)。在对数-线性浓度-时间曲线的末期线性区域中,通过连续数据点的线性回归来估算消除速率常数。对于每一次治疗,计算药物动力学参数的平均标准偏差(SD)和变异系数(CV)。计算参数平均值的比率(经保存制剂/未经保存制剂)。

[1210] 安全性结果:不利事件的发生率在整个治疗组中分布相同。与基线或研究前临床实验测试或血压相比无临床显著变化,并且身体检查结果和生命体征测量结果与研究前相比也无显著变化。两个治疗组的安全性概况看来应类似。

[1211] 药物动力学结果:在每个时间点,测量所有18名受试者在接受包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素后的平均血清松弛素浓度-时间概况(未针对基线松弛素水平进行修正)。所有受试者都应具有在正常生理学范围内的给药前基线松弛素浓度。根据针对给药前平均基线松弛素浓度修正的血清数据来确定药物动力学参数,并且确定 C_{max} 和 t_{max} 。所选的任一种(多种)临床比较物的平均 t_{max} 都比包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素的 t_{max} 显著更短。与包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素的末期半衰期相比,所测试的一种(多种)临床前比较物的末期半衰期的值显著更短。

[1212] 尽管本发明研究是在健康男性受试者中进行的,但预期在其它患者群体中将出现

类似的吸收特征和安全性概况；所述其它患者群体例如患有糖尿病的男性或女性患者、患有癌症或慢性肾衰竭的男性或女性患者、儿童肾衰竭患者、储存式自体程序中的患者，或计划择期手术的患者。

[1213] 总之，经皮下施用的单一剂量的包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素应为安全的，并且被健康男性受试者良好耐受。根据不利事件的相对发生率、临床实验值、生命体征和身体检查结果，可商购获得的松弛素形式与包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素的安全性概况应相当。包含非天然编码氨基酸的聚乙二醇化松弛素向患者和医疗服务人员潜在地提供巨大临床效用。

[1214] 实施例39

[1215] 松弛素功能测定法开发

[1216] 本实施例提供了松弛素功能测定的细节。使用人外周血单核细胞，THP-1 细胞以及阳性对照异丙肾上腺素 (Isoproterenol) 和毛喉素 (Forskolin) 证实可测量的cAMP增加。将THP-1细胞在500uM IBMX中预温育30分钟，用2uM 毛喉素进行RLX共刺激，持续20min。异丙肾上腺素、毛喉素，和松弛素多肽，所述松弛素多肽包括野生型A (B链的第1个氨基酸位置中具有丙氨酸) 和变异体RLX-BA1-AV13pAF (松弛素变异体，其B链的第1个氨基酸位置中的丙氨酸的主链氨基酸序列中具有取代A链中的位置13 (缬氨酸) 的pAF，并且其连接有四个(4) 不同尺寸的PEG:5K、10K、20K和30K。表 5

[1217] 表5

[1218] 功能测定原始EC50值[ng/mL]

[1219]

样品	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

[1220] 实施例40

[1221] 本实施例评价在SD大鼠中单次皮下注射之后20kDa聚乙二醇化松弛素多肽的药物动力学性质。

[1222] 从Charles River Laboratories (CRL) 收到大约7-8周龄(在研究开始时大约280g)的斯普拉-道来氏(Sprague-Dawley, SD)大鼠。所收到的动物已经在CRL经受颈静脉插入导管。然后在将动物用于研究前使它们适应新环境3天。

[1223] 动物在第1天接受单次皮下注射,在随后的整个80小时内收集PK样品。根据以下取样方案(取样时间是近似时间)从用PEG-松弛素治疗的动物获取血液样品用于血清浓度分析:

[1224] 第1天:给药前、给药后1、2、4、8、12、25、34、50、58、73和80小时

[1225] 使用桥接ECLA基于在Ambrx开发的测定法测量化合物浓度。使用由所给予的相应化合物产生的标准曲线计算浓度,以excel电子表格形式报告所述浓度。使用建模程序WinNonlin (Pharsight, 5.1版)估算药物动力学参数。使用利用线性向上/对数向下梯形积分对个别动物数据的非隔室分析(Noncompartmental analysis),并一致地给浓度数据加权。利用两个隔室、第1阶消除模型和Gauss-Newton (Levenberg-Hartley)模型拟合方程进

行隔室分析。表6给出随时间变化的组平均PEG-松弛素血清浓度值。图8 比较了所有所给予的PEG-松弛素化合物的随时间变化的组平均血清浓度。所有剂量组都具有可测量的血清PEG-松弛素水平。

[1226] 皮下给予0.5mg/kg PEG20K-AQ1-RLX的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图9中。皮下给予0.5mg/kg PEG20K-AA5-RLX的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图10中。皮下给予0.5mg/kg PEG20K-AR18-RLX的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图11中。皮下给予0.5mg/kg PEG20K-BV7-RLX的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图12中。皮下给予0.5mg/kg PEG20K-BW28-RLX的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图13中。皮下给予0.5mg/kg PEG20K-AV13的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图14中。

[1227] 皮下给药的动物的血清浓度对时间的非隔室分析概括在表6中。

[1228] 表6:在单次给予PEG-松弛素后SD大鼠的平均血清浓度。

[1229]

组	测试物品	剂量 (mg/kg)	途径	性别	时间 (hr)	平均浓度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	1	30.8	19.4	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	2	87.4	25.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	4	184.8	50.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	8	237.6	61.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	12	371.2	106.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	25	394.0	50.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	34	278.7	59.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	50	63.4	11.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	58	45.6	6.8	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	73	20.3	5.6	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	80	11.6	1.3	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5

[1230]

2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	1	19.9	6.4	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	2	100.1	51.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	4	185.0	104.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	8	264.7	128.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	12	434.3	135.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	25	438.0	55.2	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	34	353.5	44.2	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	50	86.9	19.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	58	62.4	10.6	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	73	32.8	8.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	雄性	80	22.1	5.4	5
3	20KPE6-AR18	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	1	33.9	17.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	2	109.7	32.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	4	172.7	48.2	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	8	270.5	55.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	12	332.5	57.7	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	25	398.6	37.6	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	34	264.3	33.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	50	76.7	6.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	58	61.8	9.0	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	73	25.0	4.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	雄性	80	14.9	3.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-8V7	0.5	SC	雄性	1	25.7	4.6	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	2	98.9	20.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	4	248.5	75.5	5
4	20KPEG BV7	0.5	SC	雄性	8	343.5	81.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	12	457.3	91.0	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	25	518.5	57.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	34	270.4	64.5	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	50	104.0	14.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	58	63.5	8.1	5
4	20KPEG-8V7	0.5	SC	雄性	73	26.0	3.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	雄性	80	22.6	2.6	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	1	36.4	15.4	5

[1231]

5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	2	107.9	61.5	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	4	228.5	86.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	8	380.9	144.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	12	486.6	135.4	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	25	511.0	60.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	34	404.8	51.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	50	184.2	31.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	58	122.3	37.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	73	48.8	6.1	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	雄性	80	37.1	5.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	1	44.9	16.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	2	138.9	60.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	4	345.7	117.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	8	533.6	157.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	12	630.1	201.2	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	25	742.5	117.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	34	540.7	31.0	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	50	320.9	21.3	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	58	209.4	22.5	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	73	75.0	4.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	雄性	80	58.7	7.7	5

[1232] NE, 未评价; BQL, 低于可量化限 (quantifiable limit); PD, 给药前

[1233] 表7

	AQ1-RLX	AA5-RLX	AR18-RLX	BV7-RLX	BW28-RLX	AV13-RLX
终末 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

[1235] 通过非隔室分析 (Pharsight, 4.1版) 评价浓度对时间曲线。N=5只大鼠/组。终末 HL, 终末半衰期; C_{max}, 所测得的最大血清浓度; T_{max}, 产生 C_{max} 的时间; AUC_{inf}, 外推至无穷

远的所有血清样品/时间点的浓度时间曲线下面积; Cl , 表观总血清清除率; V_z , 在终末期期间的表观分布容积。

[1236] 利用用于血清浓度测量的ECLIA方法测量给药溶液。将给药溶液稀释以使其在测定范围内。所有20KPEG-RLX给药溶液都落在规定的30%的与理论值的差异(PDT)的范围内。下表8概括了用于这项研究的给药溶液分析的结果。

[1237] 表8

[1238]

给药前在缓冲液中的溶液 (DSA1)	标称浓度 (ng/mL)	稀释因子	浓度 (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

[1239] 实施例41

[1240] 本实施例评价在SD大鼠中单次皮下注射之后野生型(WT)松弛素化合物的药物动力学性质。

[1241] 从Charles River Laboratories (CRL) 收到大约5周龄(在研究开始时大约 280g)的SD大鼠。所收到的动物已经在CRL经受颈静脉插入导管。然后在将动物用于研究前使它们适应新环境3天。

[1242] 动物在第1天接受单次皮下注射, 在随后的整个12小时内收集PK样品。根据以下取样方案(取样时间是近似时间) 从用WT rh松弛素治疗的动物获取血液样品用于血清浓度分析: 第1天: 给药前、给药后0.33、0.66、1、1.5、2、3、4、5、6、9和12小时。

[1243] 使用桥接ECLA基于在Ambrx开发的测定法测量化合物浓度。使用由所给予的相应化合物产生的标准曲线计算浓度, 以excel电子表格形式报告所述浓度。使用建模程序WinNonlin (Pharsight, 5.1版) 估算药物动力学参数。使用利用线性向上/对数向下梯形积分对个别动物数据的非隔室分析, 并一致地给浓度数据加权。

[1244] 表9给出随时间变化的组平均wt rh松弛素血清浓度值。图1比较了对于wt rh松弛素的随时间变化的组平均血清浓度。所有动物都具有可测量的血清松弛素水平。

[1245] 皮下给予0.5mg/kg wt松弛素的动物的随时间变化的个别血清浓度绘制在图2中。皮下给药的动物的血清浓度对时间数据的非隔室分析概括在表2 中。表9是给药溶液分析的概括。给药溶液满足小于或等于30%PDT的可接受标准。

[1246] 表9

[1247]

组	测试物品	剂量 (mg/kg)	途径	性别	时间 (hr)	平均浓度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	0.33	244.0	18.7	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	0.66	227.9	45.6	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	1	211.7	45.9	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	1.5	166.7	38.7	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	2	119.9	24.5	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	3	52.5	23.0	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	4	24.1	11.4	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	5	7.7	2.6	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	6	BQL	NE	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	9	BQL	NE	5
1	wt rh 松弛素	0.5	SC	雄性	12	BQL	NE	5

[1248] NE,未评价;BQL,低于可量化限;PD,给药前

[1249] 表10

[1250] 在SD大鼠中所给予的wt rh松弛素的药物动力学参数值

[1251]		wt rh 松弛素
	终末 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)
[1252]	MRT (hr)	1.56 (0.16)

[1253] 通过非隔室分析 (Pharsight,4.1版) 评价浓度对时间曲线。N=5只大鼠/组。终末HL,终末半衰期;C_{max},所测得的最大血清浓度;T_{max},产生C_{max}的时间;AUC_{inf},外推至无穷远的所有血清样品/时间点的浓度时间曲线下面积;Cl,表观总血清清除率;V_z,在终末期期间的表观分布容积。数字为平均值,括号中为SD。

[1254] 表11

[1255] 利用用于血清浓度测量的ECLA方法测量给药溶液。将给药溶液稀释以使其在测定范围内。所有wt rh松弛素给药溶液都落在规定的30%的与理论值的差异 (PDT) 的范围内。下表3概括了用于这项研究的给药溶液分析的结果。

[1256] 表11:测试物品的给药溶液分析

	给药溶液分析	标称浓度 (ng/mL)	稀释因子	浓度 (ng/mL)	%PDT
[1257]	0.5 mg/mL 的给药前在制剂缓冲液中的溶液(DSAD)	250000	10000	208830	-16
	0.5 mg/mL 的给药前在血清中的溶液(DSAD)	250000	10000	225898	-10

[1258] 实施例42

[1259] 本实施例评价了在SD大鼠中单次皮下或静脉内注射之后20kDa聚乙二醇化松弛素化合物的药物动力学性质。

[1260] 从Charles River Laboratories (CRL) 收到大约7-8周龄 (在研究开始时大约280g) 的SD大鼠。所收到的动物已经在CRL经受颈静脉插入导管。然后在将动物用于研究前使它们适应新环境3天。动物在第1天接受单次皮下注射, 在随后的整个82小时内收集PK样品。根据以下取样方案 (取样时间是近似时间) 从用PEG-松弛素治疗的动物获取血液样品用于血清浓度分析: 第1天: 给药前、给药后1、3、5、10、25、34、48、58、72和82小时。

[1261] 使用桥接ECLA基于在Ambrx开发的测定法测量化合物浓度。使用由所给予的相应化合物产生的标准曲线计算浓度, 以excel电子表格形式报告所述浓度。使用建模程序WinNonlin (Pharsight, 5.1版) 估算药物动力学参数。使用利用线性向上/对数向下梯形积分对个别动物数据的非隔室分析, 并一致地给浓度数据加权。利用两个隔室、第1阶消除模型和 Gauss-Newton (Levenberg-Hartley) 模型拟合方程进行隔室分析。

[1262] 表12给出随时间变化的组平均PEG-松弛素血清浓度值。

[1263] 表12

[1264]

组	测试物品	剂量 (mg/kg)	途径	性别	时间 (hr)	平均浓度 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	PD	BQL	NE	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	1	2912.8	203.7	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	3	1310.8	115.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	5	700.7	68.3	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	10	241.6	27.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	25	61.2	5.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	34	27.0	2.6	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	48	13.7	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	58	8.0	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	72	4.3	1.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	雄性	82	2.2	0.6	4
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	1	16.3	4.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	3	75.8	20.2	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	5	96.3	26.7	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	10	135.1	30.1	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	25	257.4	48.5	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	34	184.9	26.8	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	48	159.9	31.7	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	58	86.5	24.6	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	72	20.3	1.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	雄性	82	11.8	1.1	5
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	PD	BQL	NE	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	1	12.8	1.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	3	45.3	6.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	5	62.2	8.6	3

[1265]

3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	10	90.1	10.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	25	127.4	20.2	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	34	83.2	13.8	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	48	32.6	2.6	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	58	16.3	0.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	72	4.9	0.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	雄性	82	2.7	0.4	3
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	1	5.7	1.5	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	3	26.4	6.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	5	37.2	8.6	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	10	50.1	6.1	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	25	75.9	8.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	34	46.9	6.7	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	48	20.8	8.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	58	8.4	2.4	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	72	2.3	0.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	雄性	82	1.3	0.4	5

[1266] NE, 未评价; BQL, 低于可量化限; PD, 给药前

[1267] 实施例43

[1268] 本实施例评价了野生型松弛素和PEG-松弛素变异体在雌性Long-Evans 大鼠中的药理活性剂量和全身暴露。

[1269] 这些信号产生研究的目的在于确定活体内活性并定义PEG-松弛素变异体的药理活性剂量。为了完成这些目的, 在雌性Long-Evans大鼠中评价包括水摄入量、尿液输出量在内的生理相关终点对松弛素的反应, 并选择尿液和血液临床化学。为了使候选终点能被鉴定, 首先(1期)测试野生型松弛素, 以计算达到活体外靶抑制的0.3X、1X和10X血浆浓度所需的剂量测试。靶剂量由静脉内推注(IV)给予, 接着由6小时连续输注递送。0.3X、1X和10X野生型松弛素的剂量分别诱导水摄入量与媒介物组相比增加95%、68%, 和32%。在2和6小时时平均血浆钠浓度与基线相比的变化对于媒介物(0X)为-9.5mEq/L和1.2mEq/L; 在0.3X情况下为-5.8mEq/L和-9.0mEq/L; 在1X情况下为1.0mEq/L和-1.5mEq/L; 在10X情况下为-4.7mEq/L和-1.4 mEq/L。在2和6小时时血浆渗透压与基线相比的变化对于媒介物(0X)为-20.7 mosmol/kg水和1.0mosmol/kg水; 在0.3X情况下为-11.0mosmol/kg水和-19.1

mosmol/kg水;在1X情况下为0.3mosmol/kg水和-4.4mosmol/kg水;在10X 情况下为-10.3mosmol/kg水和-3.8mosmol/kg水。

[1270] 以1μL推注体积/克体重施用PEG-松弛素(2期),在给药后的第2和6 小时采集血液,并在给药后收集6小时的尿液。用0.1X、0.3X和1X剂量的 PEG-松弛素治疗,分别导致水摄入量与媒介物组相比增加93%、128%和 105%。在2和6小时时平均血浆钠浓度与基线相比的变化对于媒介物(0X) 为2.5mEq/L和1.5mEq/L;在0.1X情况下为-1.5mEq/L和-4.8mEq/L;在 0.3X情况下为-4.0mEq/L和-2.9mEq/L;在1X情况下为-2.3mEq/L和-4.0 mEq/L。在2和6小时时血浆渗透压与基线相比的变化对于媒介物(0X) 为4.5 mosmol/kg水和2.1mosmol/kg水,在0.1X情况下为-5.1mosmol/kg水和-11.0 mosmol/kg水;在0.3X情况下为-8.2mosmol/kg水和-5.0mosmol/kg水;在 1X情况下为-5.6mosmol/kg水和-9.5mosmol/kg水。在用野生型或PEG-松弛素治疗后尿液临床化学值没有明显变化。这些数据确定活体内活性并且使得能够实现用于利用PEG-松弛素的后续活体内疾病模型研究的合理剂量选择。

[1271] 表13:动物组设计

[1272]

组	测试物品	动物 ID	血浆浓度 (较靶靶增加 的剂量)	IV 推注剂量浓 度 (mg/mL)	IV 输注浓度 (mg/mL) ^c	#每组 动物
1 期野生型松弛素给药 ^a						
1	野生型松弛素	1F001- 1F004	1X	0.003	0.08	4
2	野生型松弛素	2F001- 2F004	10X	0.03	0.8	4
3 ^b	野生型松弛素	3F001- 3F004	媒介物	媒介物	媒介物	4
4 ^b	野生型松弛素	4F001- 4F004	0.3X	0.001	0.026	4

[1273] ^a首先评价组1和2(1x和10x),并且因为饮用水消耗量、血细胞比容,和尿液输出量所受到的与测试物品有关的影响是明显的,所以将第二系列大鼠的剂量分别修改为组3及组4中的媒介物和0.3X。在组1和2之间存在至少约36小时的清洗期。组3和4之间也存在至少约36小时的清洗期。

[1274] ^b在清洗期之后组1中的大鼠经受第二次随机化并被分配到组2。组3 中的大鼠经受第二次随机化并被分配到组4。在组2和4中,动物编号001-004 与它们在组1和3中仍然是相同的;但是使用组数字标号,组2和组4以便能够标记管和使样品鉴定清晰。

[1275] ^c以100μL推注体积,接着以50μL/小时的输注速率静脉内注射野生型松弛素。

[1276] 表14

[1277]	组	测试物品	动物 ID	血浆浓度 (较标靶的增加倍数)	IV 推注剂量浓度 (mg/mL) ^a	#每组动物
				2 期 PEG-松弛素给药		
	5	PEG-松弛素	5F001-5F004	媒介物	NA	4
	6	PEG-松弛素	6F001-6F004	0.3X	0.03	4
	7	PEG-松弛素	7F001-7F004	0.1X	0.01	4
	8	PEG-松弛素	8F001-8F004	1.0X	0.1	4

- [1278] ^a推注剂量以1μL/g体重的体积施用。
- [1279] 1期野生型松弛素
- [1280] 由供应商通过手术安置两侧颈静脉导管的12-14周龄雌性Long-Evans 大鼠获自 Charles River Laboratories。使用2个系列的四只大鼠。每个系列用于评价两种剂量的野生型松弛素。在组1和2以及组3和4之间存在36小时或更长的清洗期,因为来自组1和3的大鼠分别被重用于组2和4。在给药开始之前的夜晚以及在IV推注给药后和输注给药开始后的6个小时,大鼠可随意取用食物和水并且被圈养在Culex ABS代谢锁定系统 (Culex Automated Blood Sampler,Bioanalytical System Inc)。
- [1281] 1期野生型松弛素剂量施用
- [1282] 在1期中,给予每只大鼠一次IV推注和6小时IV输注。经由手术植入的颈静脉导管IV推注,接着经由手术植入的颈静脉导管IV输注。在第1系列大鼠的组1和2之间以及在第二系列大鼠的组3和4之间的至少36小时考虑到清洗。
- [1283] 2期PEG-松弛素
- [1284] 由供应商通过手术安置两侧颈静脉导管的12-14周龄雌性Long-Evans 大鼠获自 Charles River Laboratories。使用4个系列的四只大鼠,其中每个系列用于评价一种剂量的PEG-松弛素。接受PEG-松弛素的大鼠在清洗期之后没有被重复使用,因为聚乙二醇化化合物的血浆暴露时间延长。大鼠可随意取用食物和水并被圈养在Culex ABS代谢笼中。
- [1285] 2期PEG-松弛素剂量施用
- [1286] 在2期中,大鼠经由手术植入的颈静脉导管接受一次IV注射。
- [1287] 所有推注和IV给药溶液都根据这些用于所有给药溶液的解冻和混合说明来调配:
- [1288] 让冷冻的每种给药制剂样品瓶在4℃下解冻3至4小时,其中每小时检查解冻过程。一旦解冻完成,立即通过轻轻翻转来混合该制剂,注意不要产生气泡。注意,在紧接静脉内给药之前轻轻地充分混合每种制剂。将每种给药制剂维持在4℃直至用于给药。
- [1289] 紧接在配制之前准备剂量,并且每组接受以下的剂量浓度:

[1290]	1 期 (组 1-4)		
		组 1 : (1X)	IV 推注 0.003 mg/mL IV 输注 0.08 mg/mL
		组 2 : (10X)	IV 推注 0.03 mg/mL IV 输注 0.8 mg/mL
		组 3 : (媒介物)	推注和输注
		组 4 : (0.3X)	IV 推注 0.001 mg/mL IV 输注 0.026 mg/mL
	2 期 (组 5-8)		
		组 5 : 媒介物	IV 推注 NA
		组 6 : (0.3X)	IV 推注 0.03 mg/mL
		组 7 : (0.1X)	IV 推注 0.01 mg/mL
		组 8 : (1.0X)	IV 推注 0.1 mg/mL

[1291] 基于来自体重测量、颈静脉导管通畅和功能性的可接受调查结果来选择用于这项研究的动物。在研究开始之前或在初始给药后在血液采集期间将带有不适合于给药或血液采集的导管的动物从该研究中去除,并用带有合适的导管的大鼠替换。插有导管的大鼠的替换和化合物给药可能相对于给药方案、人员配备情况,和从供应商收到大鼠,发生在最早的时间。

[1292] 1期:根据研究前体重将动物随机化并分配到组1中。在给药完成后,组1中的大鼠在清洗期之后经受第二次随机化,并被重新分配到组2中。在给药完成后,组3中的大鼠在清洗期之后经受第二次随机化并被重新分配到组4中。

[1293] 2期:根据研究前体重将动物随机化并分配到组5至8中。

[1294] 每天在给药开始后的大约30分钟及1、2、4和6小时。目视检查身体和行为变化,并检查动物的身体姿势、皮毛 (hair coat)、活动、粪便的变化。在给药之前定期称取体重并记录。

[1295] 血液和尿液样品、收集、处理和分析

[1296] 1期研究方案

[1297] 在剂量施用之前的夜晚开始基线尿液收集,持续15-18小时,并收集到冷却(湿冰)的小瓶中。在基线尿液收集结束时收集基线血液样品(~400µL 全血)。在实验那天,给大鼠IV推注测试物品,接着以50µL/小时的体积经由左颈静脉导管以注射泵(Harvard 11plus)递送的恒定输注速率连续输注野生型松弛素6小时。在松弛素输注后第2和6小时收集两个另外的血液样品(各自为~400µL全血)。所有血液样品都使用Culex ABS编程的取样方法经由右颈静脉导管被收集到含有K3EDTA抗凝血剂的样品管中,并且样品被储存在冷藏环境下直至样品加工。在整个松弛素输注过程中连续收集尿液于经冷却的小瓶中。记录每次收集的总尿液体积,将2-5mL的每个尿液样品储存在被设定为维持大约-80°的Seventh Wave Labs冷冻器中。通过比较输注前和输注后瓶+水重量来记录在6小时输注期期间的水摄入

量。在连续输注 6 小时后关闭输注泵,大鼠在经受第二剂量评价之前经历至少 36 小时的清洗期。

[1298] 维持靶向的稳定血浆药物浓度需要连续 IV 输注。

[1299] 2 期研究方案

[1300] 在剂量施用之前的夜晚开始基线尿液收集,持续 15-18 小时,并将样品收集到经冷却的小瓶中。在基线尿液收集结束时收集基线血液样品 (~400 μ L 全血)。在实验那天,给大鼠静脉内施用体积不超过 10 mL/kg/天 (一次剂量) 的单剂 PEG-松弛素。在松弛素施用后第 2 和 6 小时收集两个另外的血液样品 (~400 μ L 全血)。所有血液样品都使用 Culex ABS 编程的取样方法经由右颈静脉导管被收集到含有 K3EDTA 抗凝血剂的样品管中,并且被储存在冷藏环境下直至加工。在取样期间从 PEG-松弛素施用后的 0 至 6 小时连续收集尿液样品于经冷却的小瓶中。记录每次收集的总尿液体积,将 2-5 mL 的每个尿液样品储存在被设定为维持大约 -80°C 的 Seventh Wave Labs 冷冻器中。在给药后第 6 小时将大鼠安乐死。通过比较药物输注期开始和结束时瓶 + 水重量来记录在 6 小时输注期期间的水摄入量。

[1301] 病理学

[1302] 如本实施例中已描述的那样收集尿液样品。将 2 至 5 mL 经冷却的尿液样品冷冻在干冰上,并储存在被设定为维持大约 -80°C 的冷冻器中直至放在干冰上装运至 AVL 用于尿肌酐和 BUN 的分析以确定肌酐清除率。

[1303] 使用 Culex ABS 使用 K3EDTA 作为抗凝血剂采集血液样品。将十五微升全血样品灌装到未经处理的毛细管中,一端用粘土密封,并在血细胞比容离心机 (International Equipment Company, IEC MB centrifuge) 中离心五分钟。使用由制造商提供的微量血细胞比容读取装置获得血细胞比容结果。

[1304] 根据下面列出的采集方案和程序采集血液用于潜在地确定野生型和 PEG-松弛素的全身暴露。有三个采集间隔。采集时间点对于 1 期大鼠和 2 期大鼠为给药后的第 0、2 和 6 小时。1 期:每个时间点 8 只动物。2 期:每个时间点 16 只动物。采集体积为接近 400 微升全血。分别在以下三个时间点给组 1 至 8 中的所有动物抽血:基线 (给药前 $t=0$) 以及用于野生型松弛素 IV 给药组的输注开始后以及用于 PEG-松弛素给药组的 IV 给药后第 2 和 6 小时。为每只动物以原始数据形式记录 IV 输注给药的开始时间和每次抽血的实际时间。按照主办方的决定,在研究进行期间不将血液送往 Ambrx 用于全身暴露测定。样品已被冷冻储存在被设定为维持大约 -80°C 的 Seventh Wave Labs 冷冻器中并且将被送回给主办方。

[1305] 1 期野生型松弛素结果

[1306] 在媒介物 (0X) 治疗的大鼠中在 6 小时输注期间的平均水摄入量为 1.8 mL/100 克体重,其在 0.3X、1X 和 10X 野生型松弛素治疗的大鼠中分别增加至 3.6/100 克体重、3.1/100 克体重,和 2.4 mL/100 克体重。0.3X、1X 和 10X 给药组的平均水摄入量较媒介物组分别增加 95%、68%、32%。

[1307] 在基线、给药开始后第 2 和 6 小时时的平均血细胞比容在媒介物治疗的大鼠中分别为 35.1%、35.0% 和 34.3%;在 0.3X 组中为 33.1%、33.7% 和 32.3%;在 1X 组中为 31.4%、32.0% 和 33.7%;在 10X 组中为 29.7%、31.9% 和 30.4%。

[1308] 在 6 小时输注期间的平均尿液输出量对于媒介物 (0X)、0.3X、1X 和 10X 组分别为 1.8 mL/100 克体重、1.5 mL/100 克体重、1.2 mL/100 克体重和 1.2 mL/100 克体重。

[1309] 在基线、给药开始后第2和6小时时的平均血浆钠浓度在媒介物 (0X) 组中为139.3mEq/L、129.8mEq/L、140.5mEq/L;在0.3X组中为141.8mEq/L、136.0mEq/L和132.8mEq/L;在1X组中为138.8mEq/L、139.8mEq/L和137.3 mEq/L;在10X组中为137.0mEq/L、132.3mEq/L和135.6mEq/L。在2和 6小时时与基线相比的变化对于媒介物 (0X) 为-9.5mEq/L和1.2mEq/L;在 0.3X情况下为-5.8mEq/L和-9.5mEq/L;在1X情况下为1.0mEq/L和-1.5 mEq/L;在10X情况下为-4.7mEq/L和-1.4mEq/L。

[1310] 血浆渗透压使用以下方程式计算:渗透压 (OSM) = (2*na) + (Glu/18) + (BUN/2.8) 。在基线、开始给药后第2和6小时时的平均血浆渗透压在0.3X 组中为277.3mosmol/kg水;在1X组中为291.0mosmol/kg水、291.3 mosmol/kg水和286.6mosmol/kg水;在10X组中为286.4mosmol/kg水、276.1 mosmol/kg水和282.6mosmol/kg水。在2和6小时时与基线相比的变化对于媒介物 (0X) 为-10.7mosmol/kg水和1.0mosmol/kg水;在0.3X情况下为=11.0 mosmol/kg水和=19.1mosmol/kg水;对于1X为0.3mosmol/kg水和-4.4 mosmol/kg水;对于10X为-10.3mosmol/kg水和-3.8mosmol/kg水。BUN/Cr、Na排泄的尿液临床化学数据概括在下表中:

[1311] 表3.野生型松弛素的尿液临床化学数据汇总 (1期研究)

[1312]

组	BUN /Cr	sem	Na 排泄 (mEq/hr)	sem	BUN 排泄 (mg/hr)	sem	CrCl (mL/min /100g)	sem
媒介物(基线)	36	12	0.083	0.010	13.5	4.4	0.65	0.04
媒介物(6 hr 研究)	26	3	0.079	0.018	9.4	2.3	0.60	0.15
0.3X (基线)	66	9	0.055	0.005	17.3	3.9	0.38	0.06
0.3X (6 hr 研究)	43	6	0.071	0.015	12.1	1.3	0.45	0.07
1X (基线)	18	2	0.046	0.010	7.6	1.5	0.62	0.09
1X (6 hr 研究)	19	4	0.030	0.003	4.6	1.5	0.36	0.05
10X (基线)	21	2	0.063	0.001	8.5	1.1	0.69	0.04
10X (6 hr 研究)	17	4	0.055	0.005	4.9	0.7	0.81	0.11

[1313] 表4.野生型松弛素的尿液临床化学原始数据 (1期研究)

[1314]

剂量	组	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl (ml/min/100g)
媒介物	3F001 T0	68232	136	119	84	1080	0.702
媒介物	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0.257
媒介物	3F002 T0	68234	122	130	59	980	0.692
媒介物	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0.979
媒介物	3F003 T0	68236	276	130	54	2950	0.694
媒介物	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0.552
媒介物	3F004 T0	68238	355	126	52	3000	0.522
媒介物	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
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	2F00S-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	2F0D4-T6	67493	212	125	85	1400	0.756

[1315] 单位:Na (mEq/L);肌酐 (mg/dL);BUN (mg/dL),葡萄糖 (mg/dL),K (mmol/L),CrCl:
mL/min/100g BW

[1316] 肌酐清除率 (CrCl) = (U creat.*U vol)/(P creat*U时间)

[1317] 表5.野生型松弛素 (1期研究) 的生理学数据汇总

	剂量	水摄入量(0-6hr) mL/100 g BW		基线尿液(-16-0hr) mL/100 g BW		尿液(0-6hr) mL/100 g BW	
		平均	sem	平均	sem	平均	sem
[1318]	媒介物	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

	剂量	血细胞比容(%)					
		0 hr		2 hr		6 hr	
		平均	sem	平均	sem	平均	sem
[1319]	媒介物	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

[1320] 2期PEG-松弛素变异体结果

[1321] 在给药后6小时期间的平均水摄入量在媒介物(0X)治疗的大鼠中为1.5 mL/100克体重,其在0.1X、0.3X和1X PEG-松弛素变异体治疗的大鼠中分别增加至2.9mL/100克体重、3.4mL/100克体重,和3.1mL/100克体重。这些表示0.1X、0.3X和1X组较媒介物组的平均值分别增加了93%、128%和 105%。

[1322] 在给药后6小时期间的平均尿液输出量对于媒介物(0X)、0.3X和1X组分别为0.9mL/100克体重、0.2mL/100克体重、0.5mL/100克体重和0.4 mL/100克体重。在基线、给药后第2和6小时时的平均血浆钠浓度在媒介物(0X)组中分别为136.3mEq/L、138.8mEq/L和137.8mEq/L;在0.1X组中分别为138.5mEq/L、137.0mEq/L和133.7mEq/L;在0.3X组中分别为137.5 mEq/L、133.5mEq/L和134.6mEq/L;在1X组中分别为137.3mEq/L、135.0 mEq/L和133.3mEq/L。在2和6小时时与基线相比的变化对于媒介物(0X) 为2.5mEq/L和1.5mEq/L;在0.1X情况下为-1.5mEq/L和-4.8mEq/L;在 0.3X情况下为-4.0mEq/L和-2.9mEq/L;在1X情况下为-2.3mEq/L和-4.0 mEq/L。

[1323] 在基线、给药后第2和6小时时的平均血浆渗透压在媒介物(0X)组中分别为285.4mosmol/kg水、289.9mosmol/kg水,和287.5mosmol/kg水;在 0.1X组中分别为292.7mosmol/kg水、287.6mosmol/kg水,和281.7mosmol/kg 水;在0.3X组中分别为287.6mosmol/kg水、279.4mosmol/kg水和282.6 mosmol/kg水;在1X组中分别为289.3mosmol/kg水、283.7mosmol/kg水和 279.4mosmol/kg水。在2和6小时时与基线相比的变化对于媒介物(0X) 为 4.5mosmol/kg水和2.1mosmol/kg水;在0.1X情况下为-5.1mosmol/kg水和 -11.0mosmol/kg水;对于0.3X为-8.2mosmol/kg水和-5.0mosmol/kg水;对于1X为-5.6mosmol kg水和-9.9mosmol kg水。

[1324] 应理解,本文描述的实施例和实施方案仅是为了说明,并且本领域普通技术人员将会想到关于其的各种修改或改变,并且所述修改或改变包括在本申请的精神和权限及附加权利要求书的范围内。本申请中所引用的所有出版物、专利、专利申请和/或其它文献都

以引用的方式完整地并入本文用于所有目的,所引用的程度就如同已单独地指出每个出版物、专利、专利申请和/或其它文献以引用的方式并入本文用于所有目的。

序列表

<110> V.克拉伊诺夫

N.克努森

A.赫维特

K.德蒂奥斯

J.平克斯塔夫

L.苏利文

<120> 经修饰松弛素多肽及其用途

<130> AMBX-0174.00PCT

<150> 61/374,582

<151> 2010-08-17

<160> 34

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu

20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

85

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

20

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly

1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu

20 25 30

Gln Lys Arg

35

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg

1 5

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gc 72

<210> 11

<211> 87
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgcagatt 60
 gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87
 <210> 12
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60
 gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120
 cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159
 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 atgaaaaaga atatcgcat tcttcttaaa cgg 33
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 atgattgaag gtggtcgt 18
 <210> 15
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
 1 5 10 15
 Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
 20 25 30
 Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
 35 40 45
 Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
 65 70 75 80
 Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 85 90
 <210> 16
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mutant synthetase derived from Methanococcus jannaschii
 synthetase
 <400> 16
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
 145 150 155 160
 Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		240
	245	250
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		255
	260	265
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		270
	275	280
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		285
	290	295
Arg Leu		300
305		
<210> 17		
<211> 77		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA		
<400> 17		
ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60		
tccagcccg cggacca 77		
<210> 18		
<211> 77		
<212> DNA		
<213> Methanococcus jannaschii		
<400> 18		
ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60		
tccgccccgc cggacca 77		
<210> 19		
<211> 88		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> An optimized amber supressor tRNA		
<400> 19		
cccagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60		
gagggttcga atcccttccc tgggacca 88		
<210> 20		

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA

<400> 20

gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt 60
cgagggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-L-phenylalanine

<400> 21

Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Gly
				20				25					30		
Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
				35				40					45		
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
				50				55					60		
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65				70				75					80		
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
				85				90					95		
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
				100				105					110		
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
				115				120					125		
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
				130				135					140		
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Thr	Tyr	Tyr
145				150				155					160		
Tyr	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile
				165				170					175		
His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His

180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 22		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of		
p-benzoyl-L-phenylalanine		
<400> 22		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly		
20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65	70	75
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 23
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 propargyl-phenylalanine
 <400> 23
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35				40				45							
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
50				55				60							
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65				70				75				80			
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
85				90				95							
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
100				105				110							
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
115				120				125							
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
130				135				140							
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Ala	Ile	Tyr
145				150				155				160			
Leu	Ala	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	His
165				170				175							
Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His	Asn
180				185				190							
Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser	Lys
195				200				205							
Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Lys
210				215				220							
Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro	Ile
225				230				235				240			
Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys	Arg
245				250				255							
Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu
260				265				270							
Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys	Asn
275				280				285							
Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys	Arg
290				295				300							
Leu															
305															
<210> 24															
<211> 305															
<212> PRT															
<213> Artificial															

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
propargyl-phenylalanine

<400> 24

Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala
			20					25					30		
Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
		35					40					45			
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
	50					55					60				
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65				70					75					80	
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
			85					90					95		
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
			100					105					110		
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
	115					120						125			
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
	130					135					140				
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Ile	Pro	Tyr
145				150					155					160	
Leu	Pro	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	His
			165					170					175		
Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His	Asn
	180							185				190			
Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser	Lys
	195					200					205				
Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Lys
	210					215					220				
Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro	Ile
225				230					235					240	
Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys	Arg
			245					250				255			
Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu	Leu
			260					265				270			
Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys	Asn

275	280	285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg		
290	295	300
Leu		
305		
<210> 25		
<211> 305		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of propargyl-phenylalanine		
<400> 25		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1 5 10 15		
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala		
20 25 30		
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35 40 45		
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50 55 60		
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp		
65 70 75 80		
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met		
85 90 95		
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys		
100 105 110		
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115 120 125		
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130 135 140		
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr		
145 150 155 160		
Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His		
165 170 175		
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn		
180 185 190		
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys		
195 200 205		

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255
 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305
 <210> 26
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine
 <400> 26
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His		
145	150	155
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 27		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of		
p-azido-phenylalanine		
<400> 27		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr		
20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln		
35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile		
50	55	60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
 145 150 155 160
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 28
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine

<400> 28

Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu
				20				25					30		
Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
				35				40					45		
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
				50				55					60		
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65					70				75					80	
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
				85				90						95	
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
				100				105					110		
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
				115				120					125		
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
				130				135					140		
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Pro	Val	His
145					150				155					160	
Tyr	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile
				165				170						175	
His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His
				180				185					190		
Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser
				195				200					205		
Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala
				210				215					220		
Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro
225					230				235					240	
Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
				245				250					255		
Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu
				260				265					270		
Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys
				275				280					285		
Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys
				290				295					300		

Arg Leu

305

<210> 29

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-phenylalanine

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225	230	235	240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys			
	245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu			
	260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys			
	275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys			
	290	295	300
Arg Leu			
305			
<210> 30			
<211> 306			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of			
p-acetyl-phenylalanine			
<400> 30			
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser			
1	5	10	15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu			
	20	25	30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln			
	35	40	45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile			
	50	55	60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp			
65	70	75	80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met			
	85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys			
	100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys			
	115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro			
	130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His			
145	150	155	160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 31
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-acetyl
 -phenylalanine
 <400> 31
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85	90	95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys		
100	105	110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys		
115	120	125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro		
130	135	140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His		
145	150	155
Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile		
165	170	175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His		
180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		
<210> 32		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of		
p-acetyl-phenylalanine		
<400> 32		
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser		
1	5	10
		15

Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala
20				25				30							
Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
35				40				45							
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
50				55				60							
Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65				70				75				80			
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
85				90				95							
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Glu	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
100				105				110							
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
115				120				125							
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
130				135				140							
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Gly	Gly	His
145				150				155				160			
Tyr	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Ile	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile
165				170				175							
His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His
180				185				190							
Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser
195				200				205							
Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala
210				215				220							
Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro
225				230				235				240			
Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
245				250				255							
Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu
260				265				270							
Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys
275				280				285							
Asn	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ile	Arg	Lys
290				295				300							
Arg Leu															
305															
<210> 33															

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-phenylalanine

<400> 33

```

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1           5           10           15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
           20           25           30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
           35           40           45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
           50           55           60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65           70           75           80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
           85           90           95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
           100          105          110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
           115          120          125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
           130          135          140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
           145          150          155          160
Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
           165          170          175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
           180          185          190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
           195          200          205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
           210          215          220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
           225          230          235          240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
           245          250          255

```

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 34
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
 p-azido-phenylalanine
 <400> 34
 Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30
 Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45
 Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60
 Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95
 Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180	185	190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser		
195	200	205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala		
210	215	220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro		
225	230	235
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys		
245	250	255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu		
260	265	270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys		
275	280	285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys		
290	295	300
Arg Leu		
305		

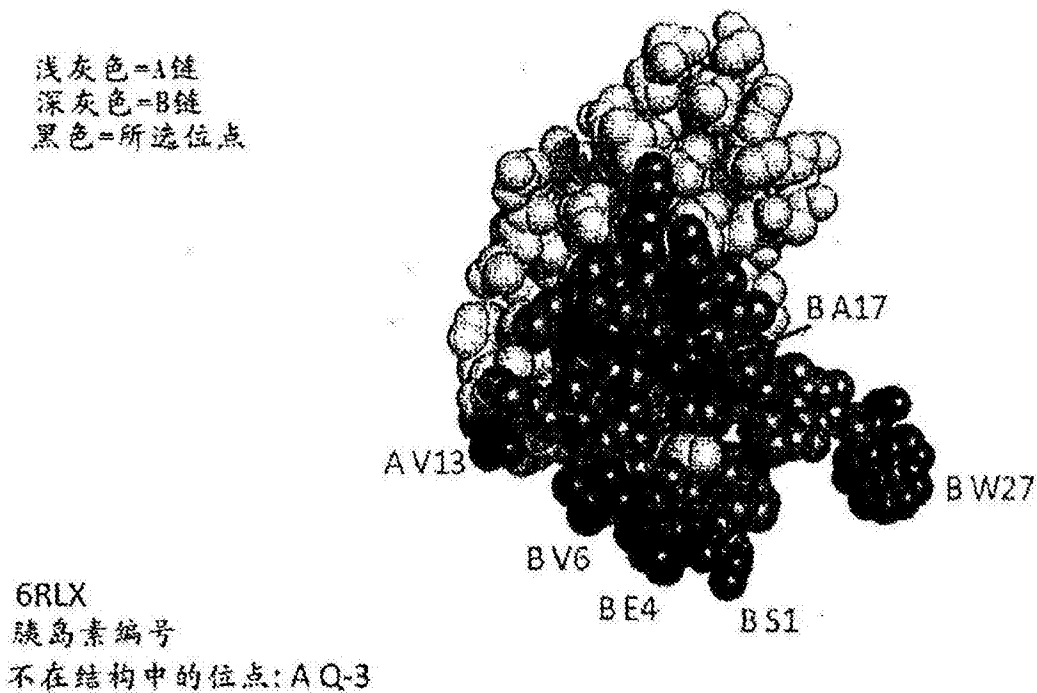


图1

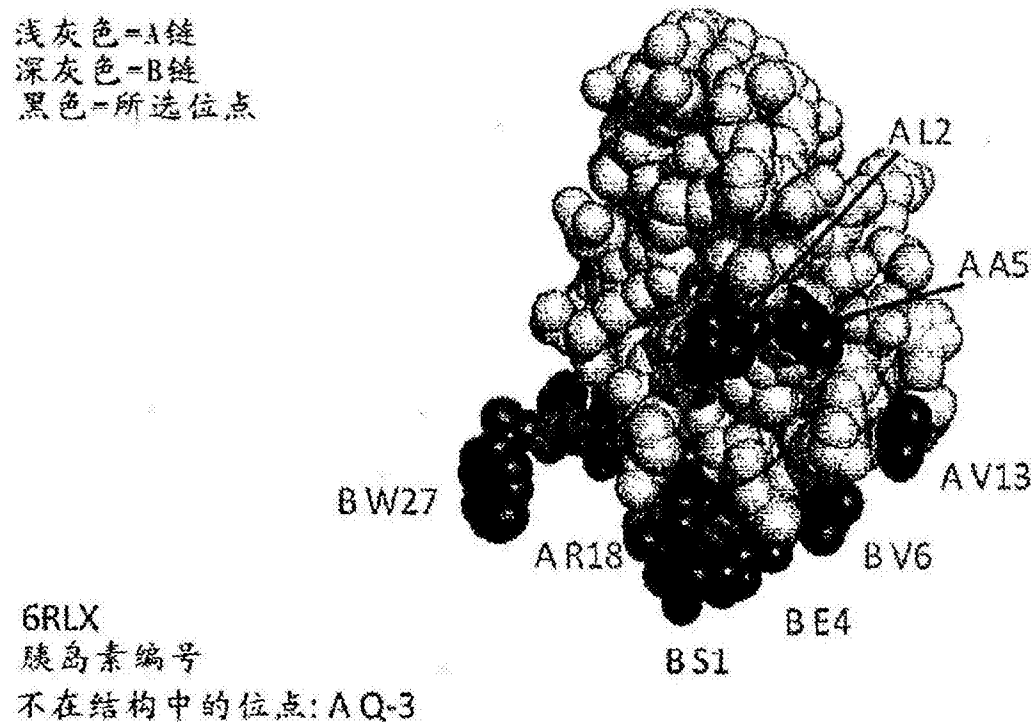
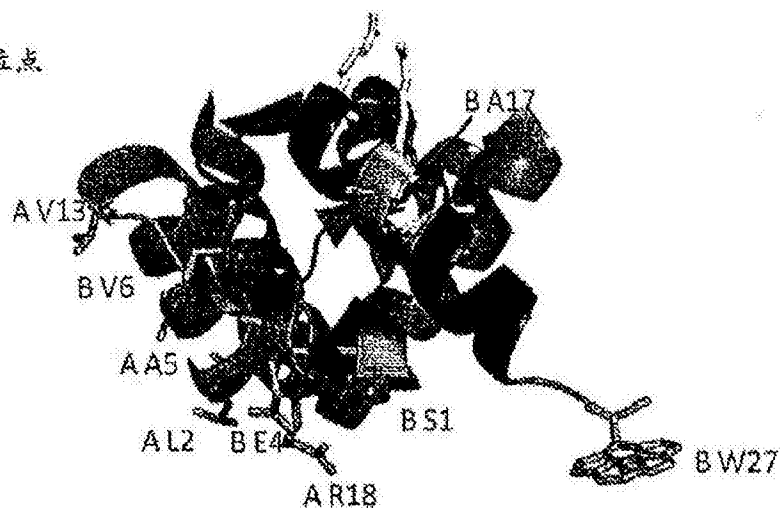


图2

浅蓝=A链
深蓝=B链
黄色=受体结合位点
橙色=所述位点



6RLX

胰岛素编号

不在结构中的位点: A Q-3

图3

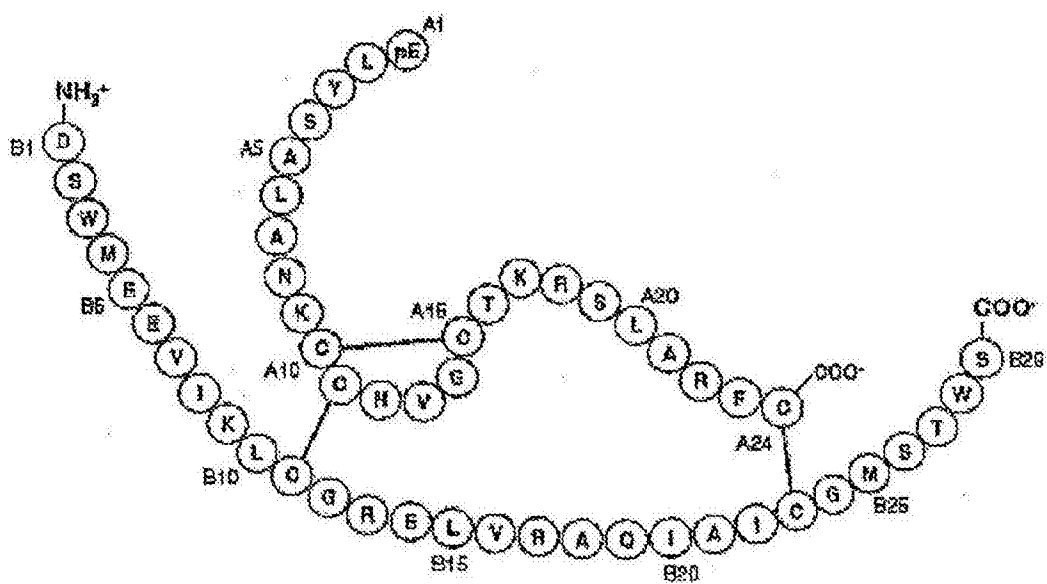


图4

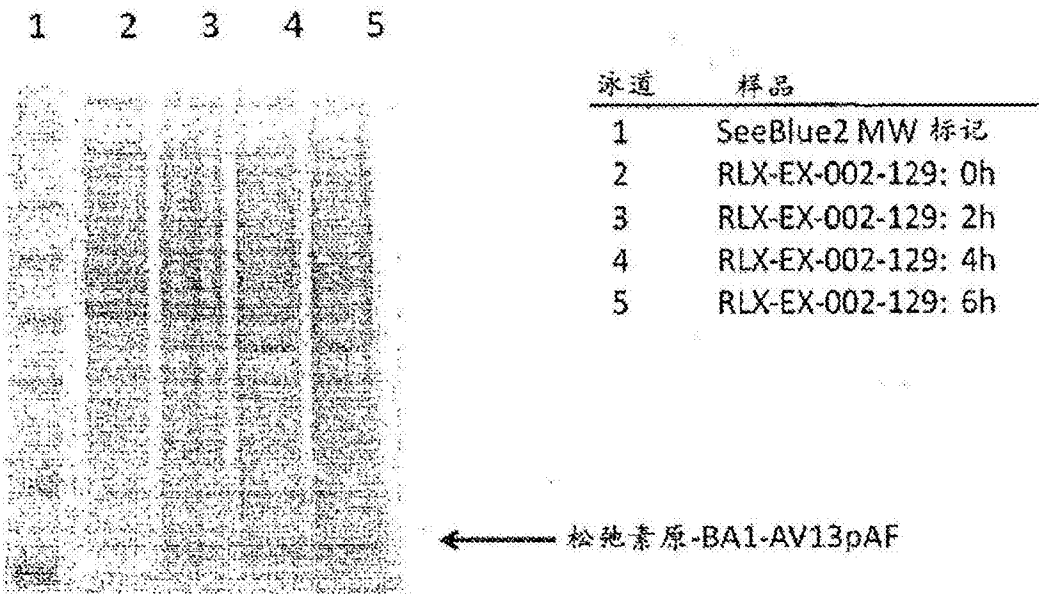


图5

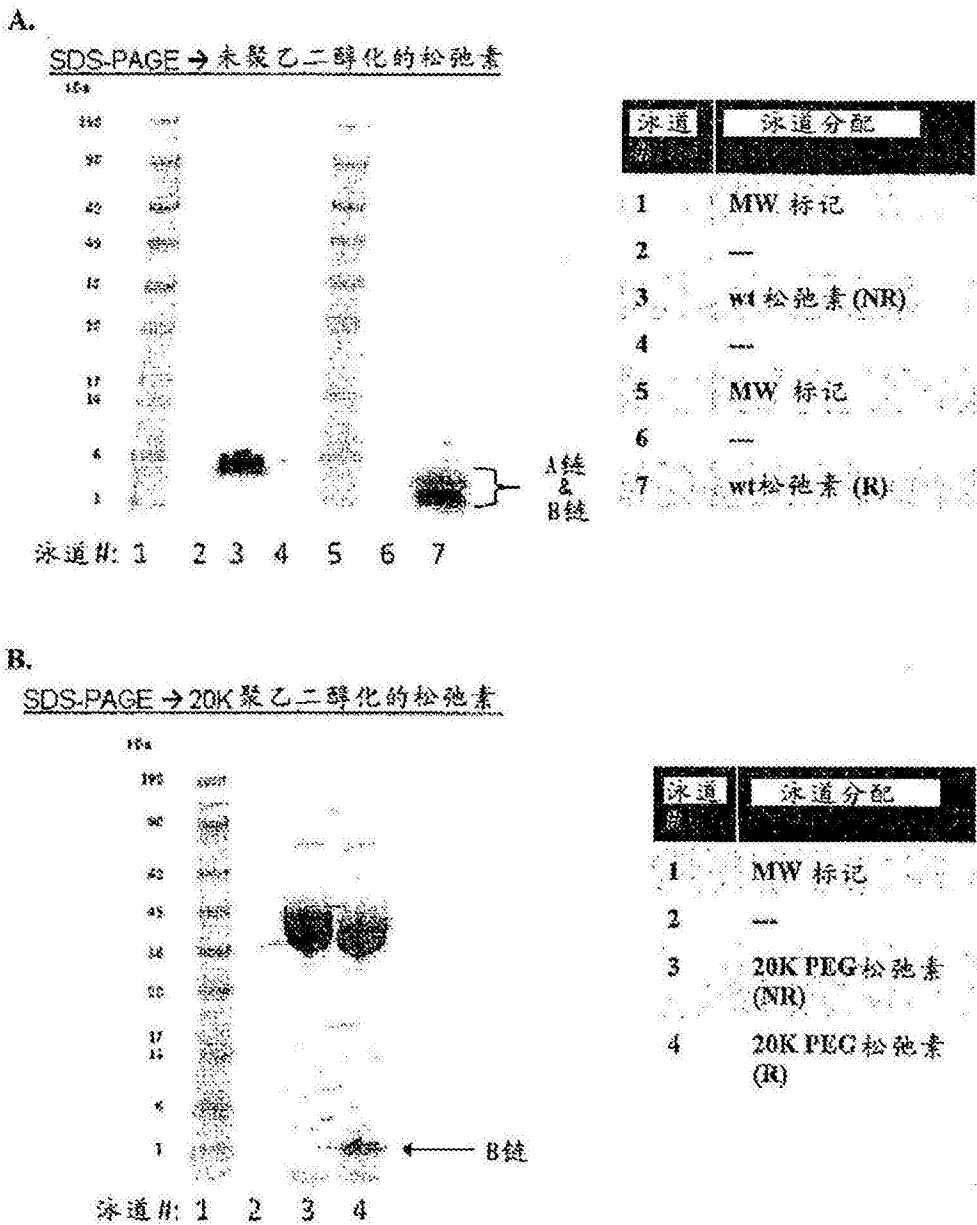


图6

PEG尺寸的PK评价

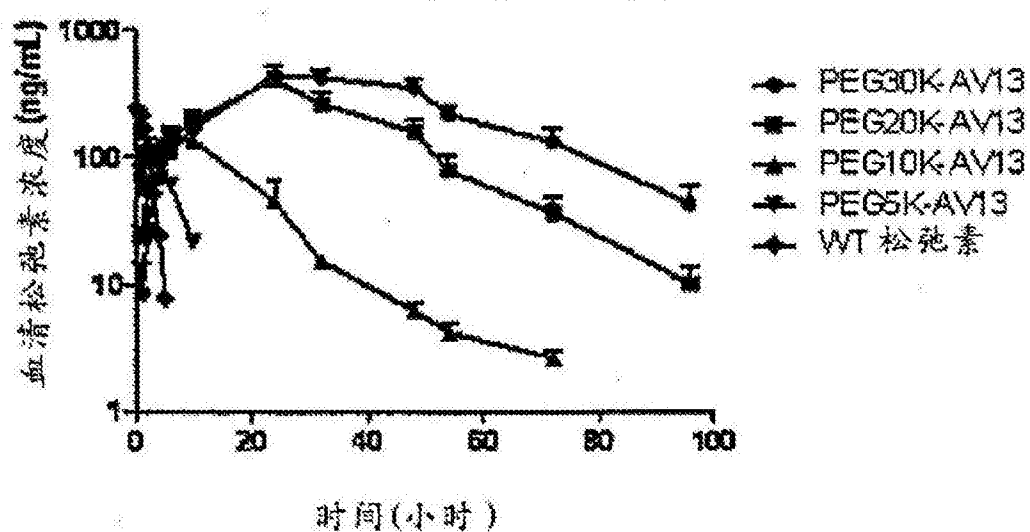


图7

随时间变化的平均RLX血清浓度

误差棒=标准偏差, 性别=雄性

剂量=0.5mg/kg, 途径=SC

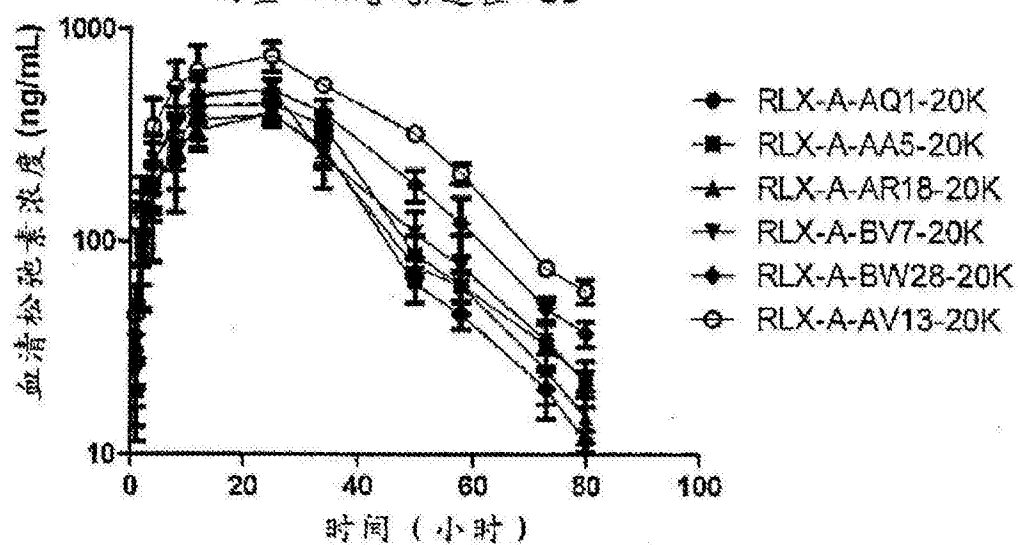


图8A

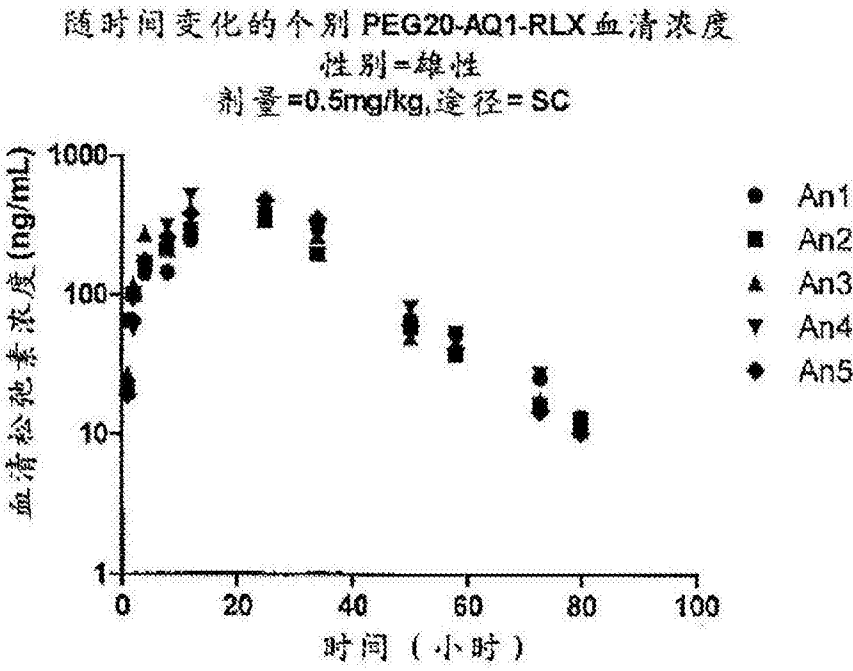


图8B

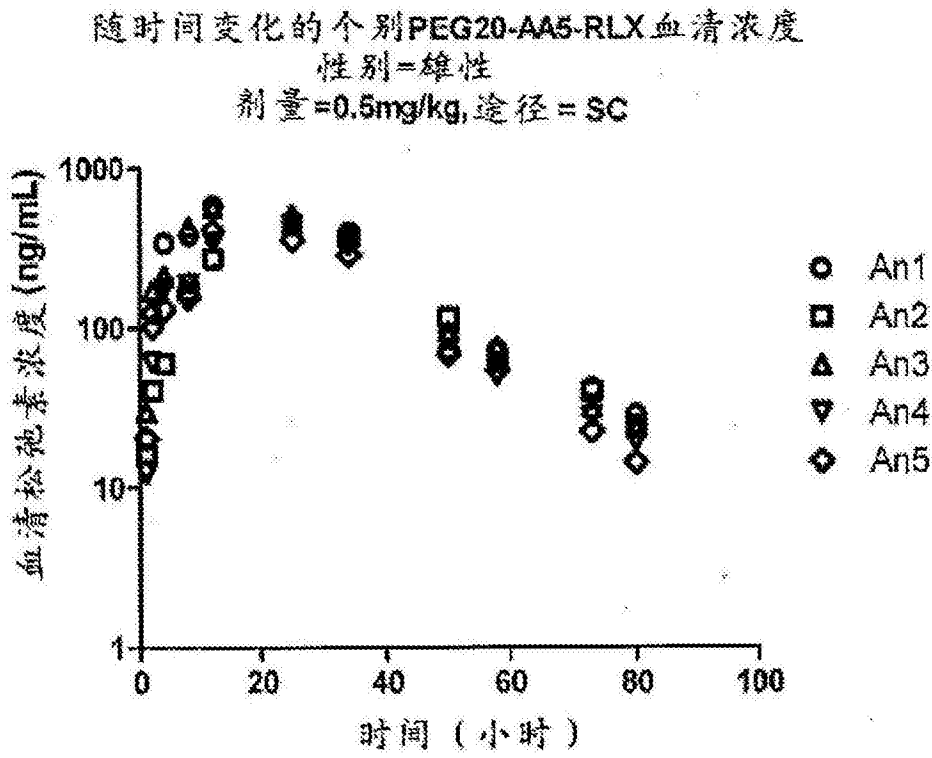


图9A

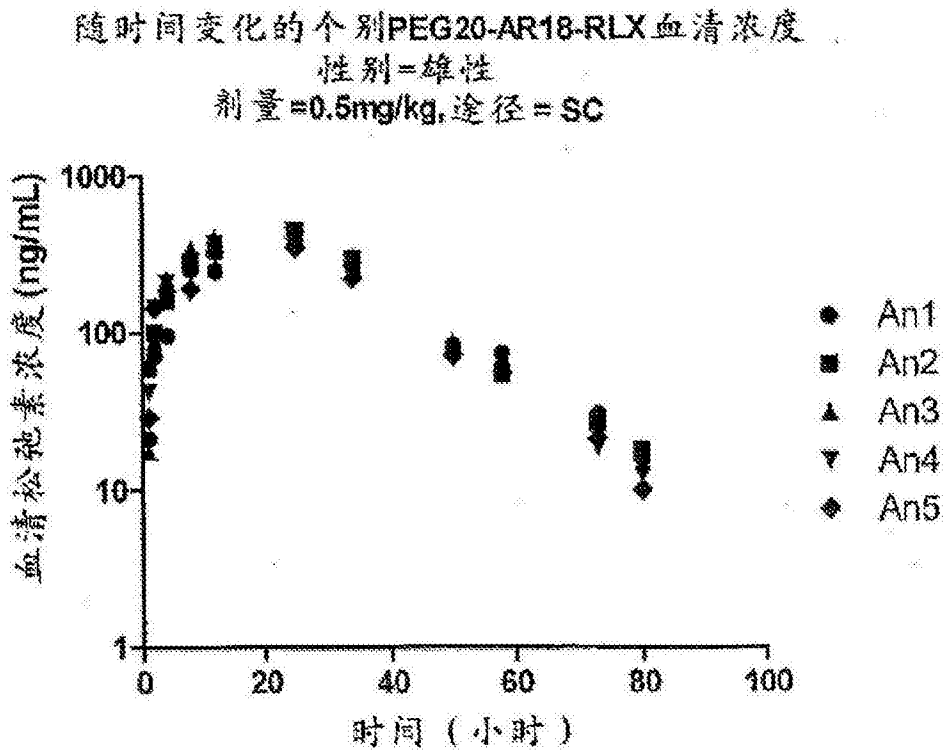


图9B

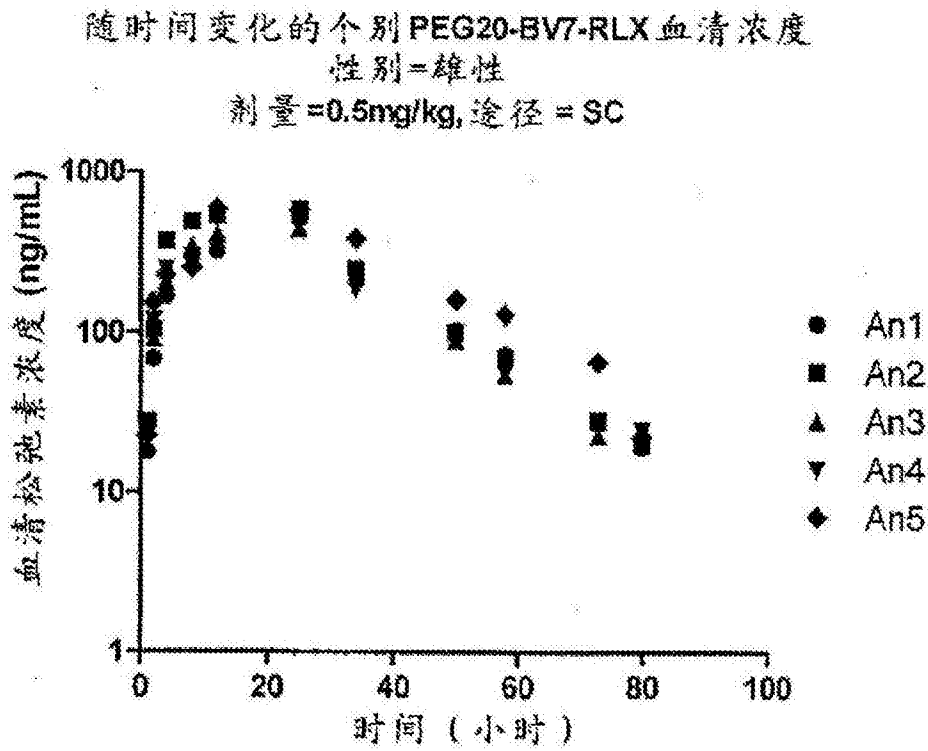


图10A

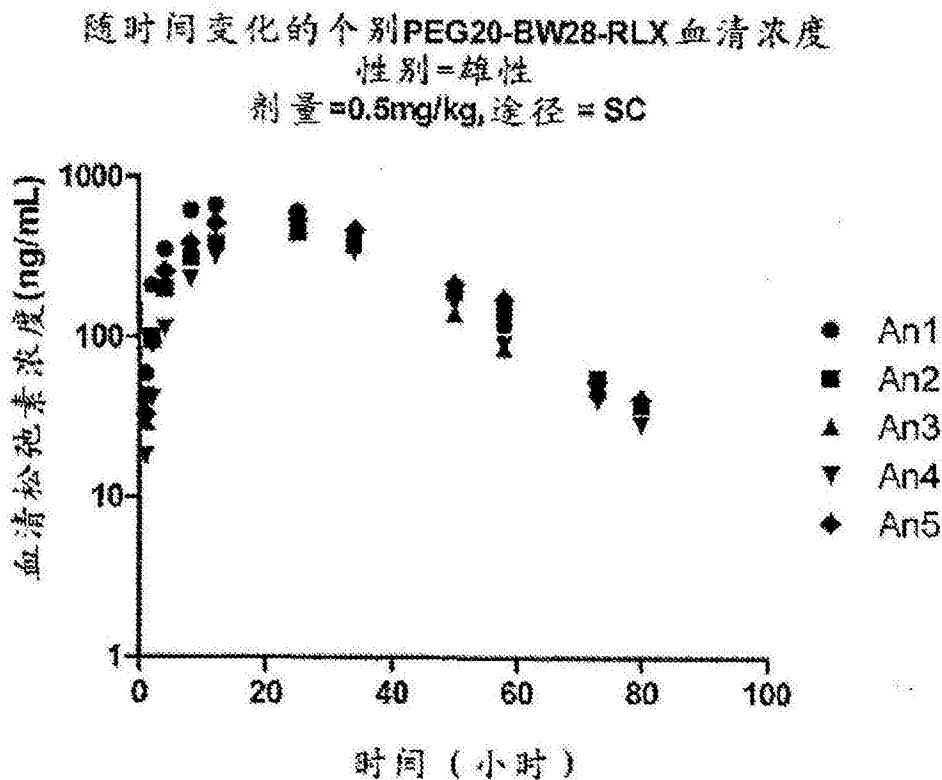


图10B

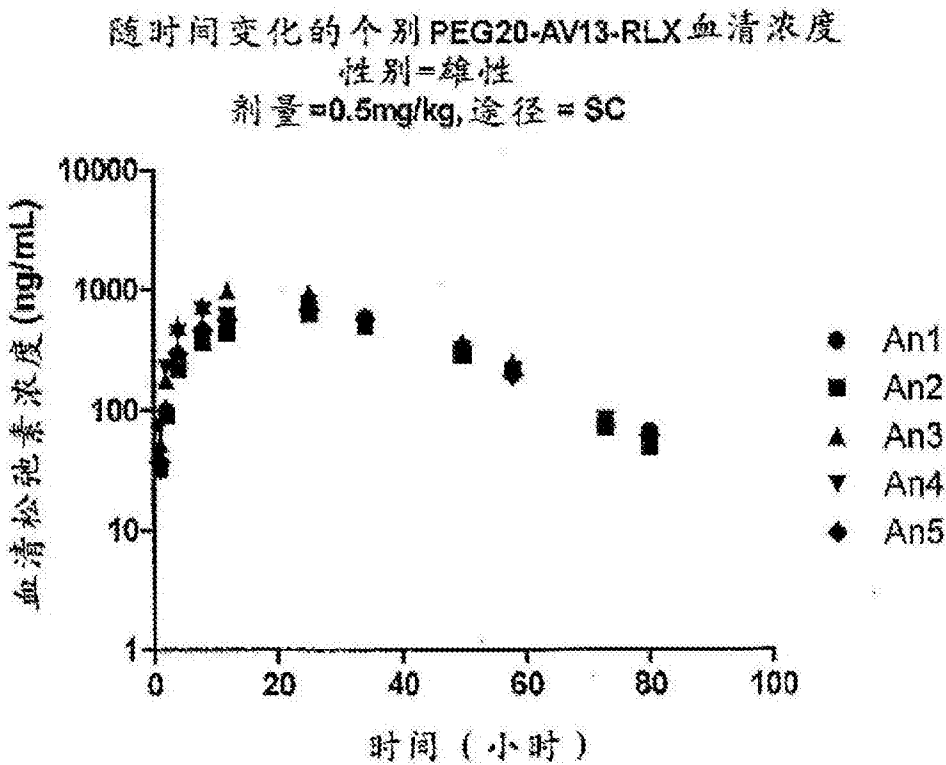


图11

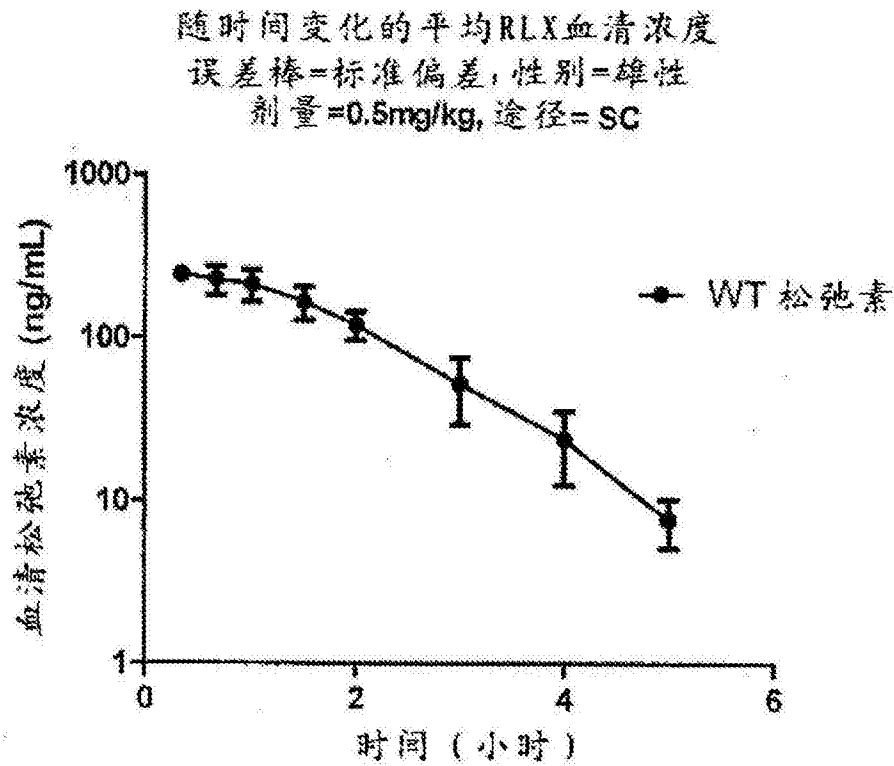


图12A

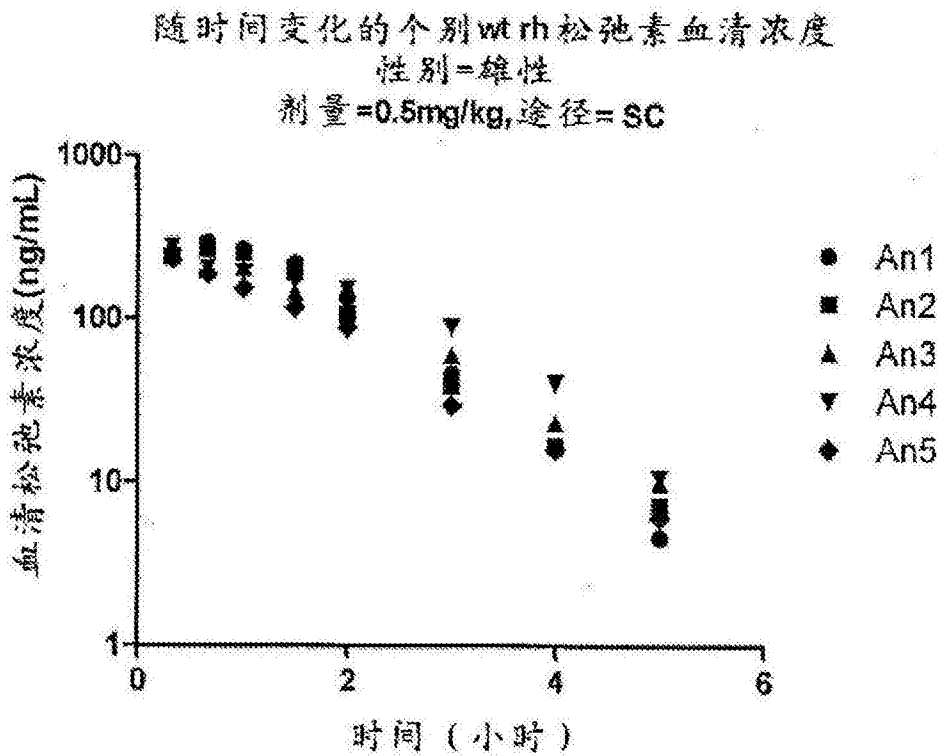


图12B

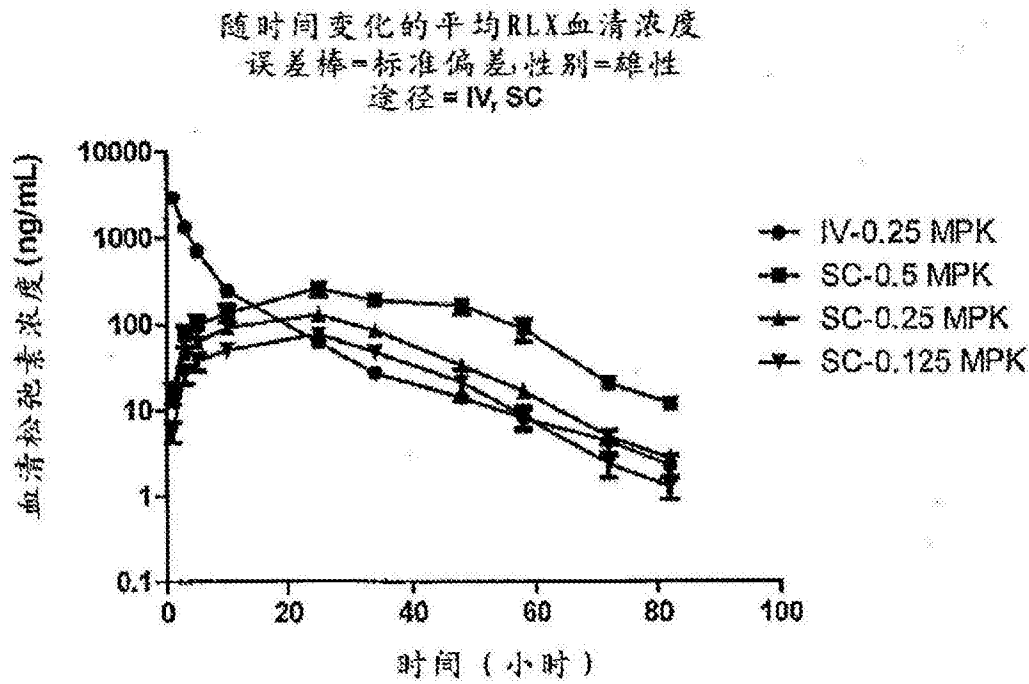


图13A

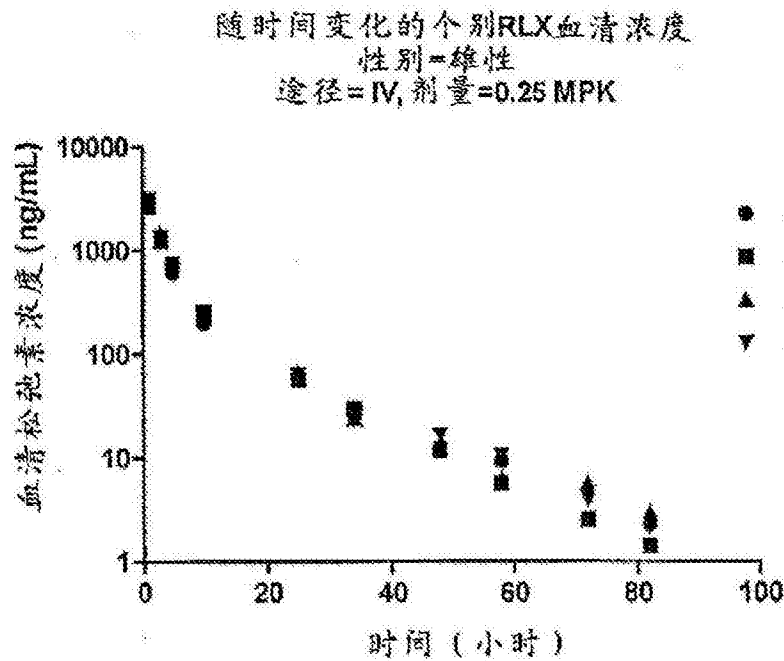


图13B

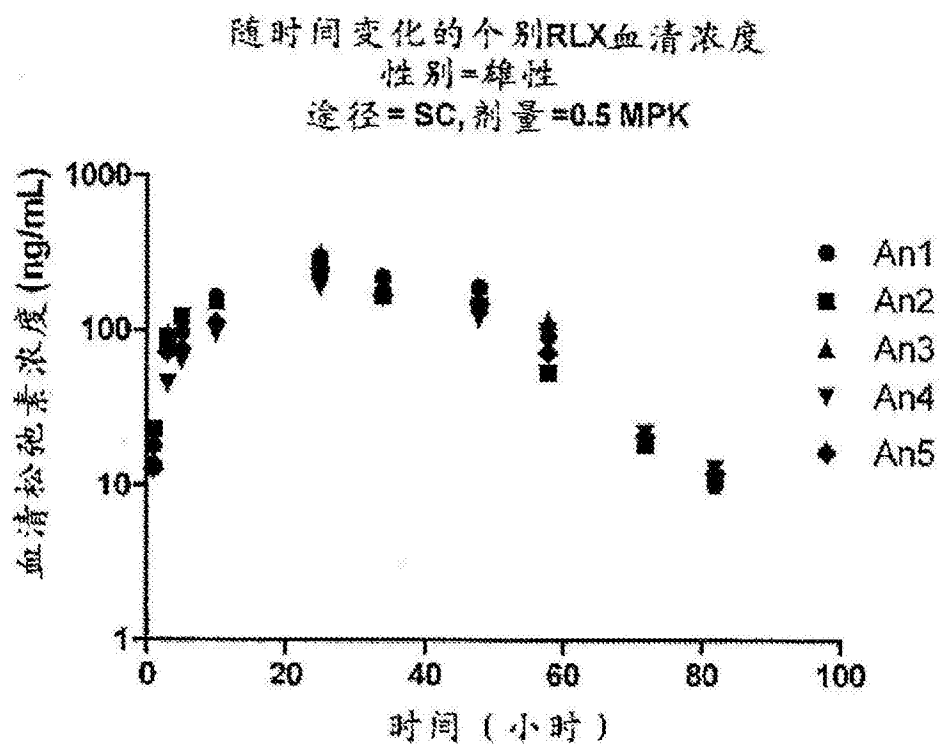


图14A

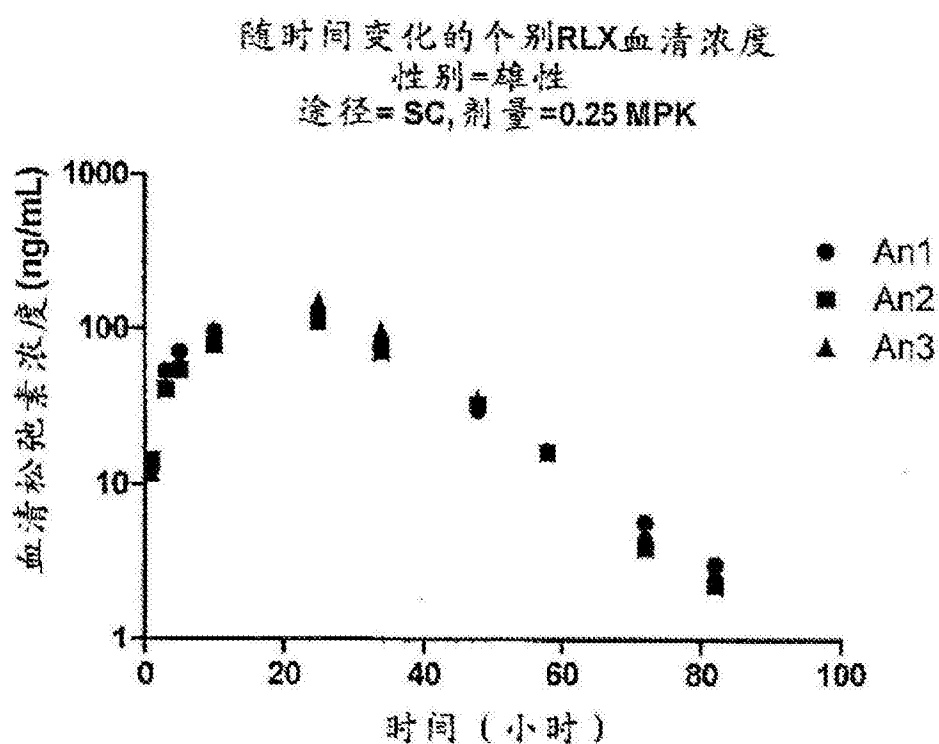


图14B

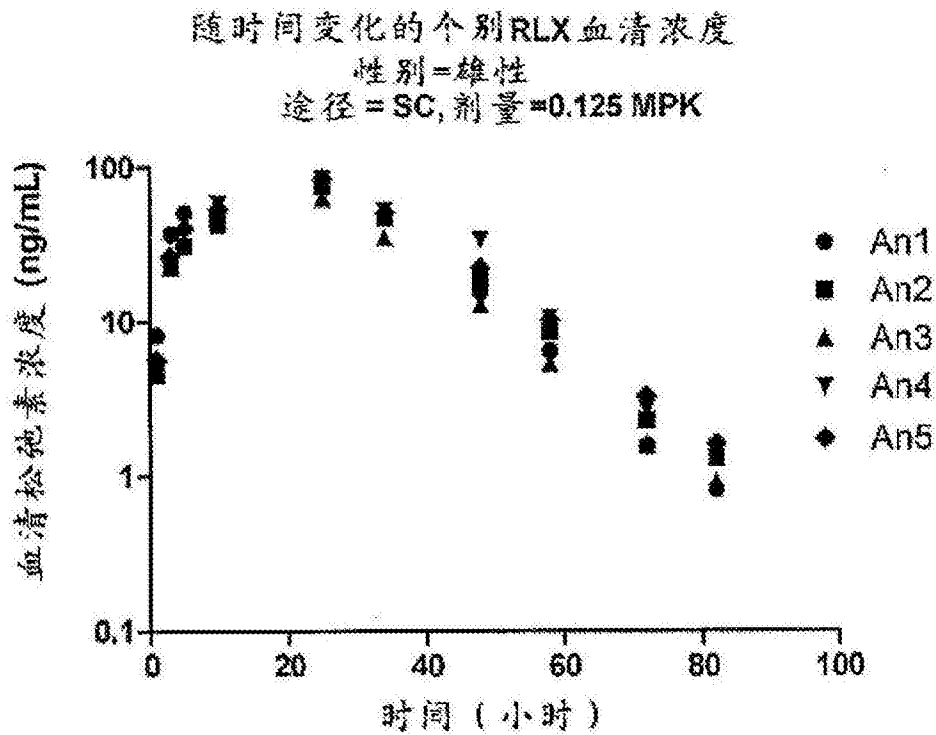


图15

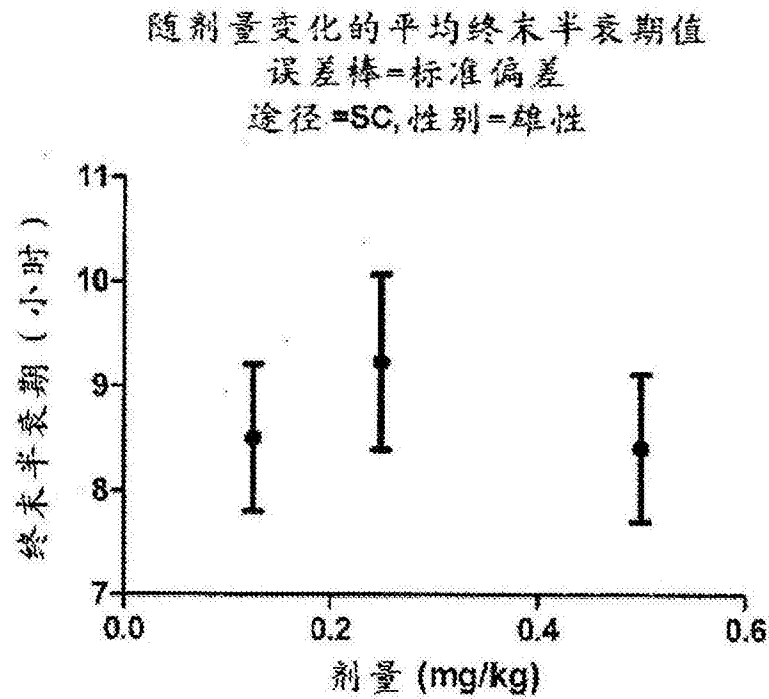


图16A

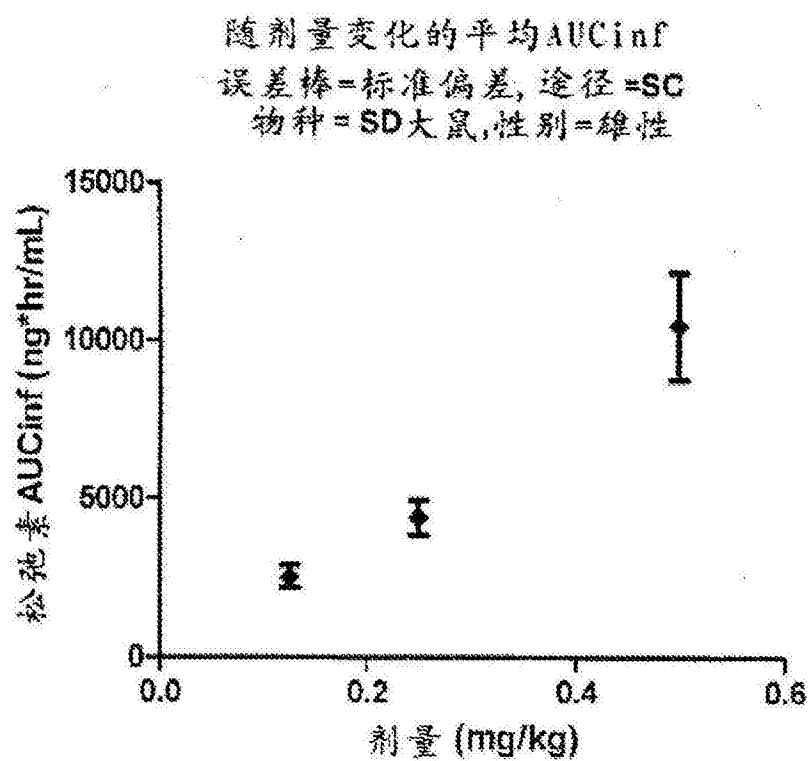


图16B

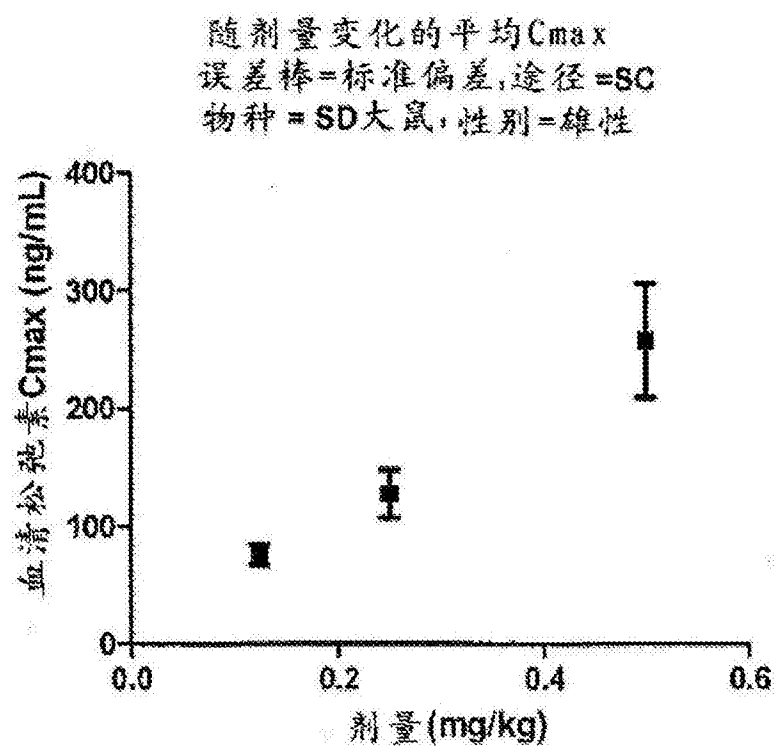


图17A

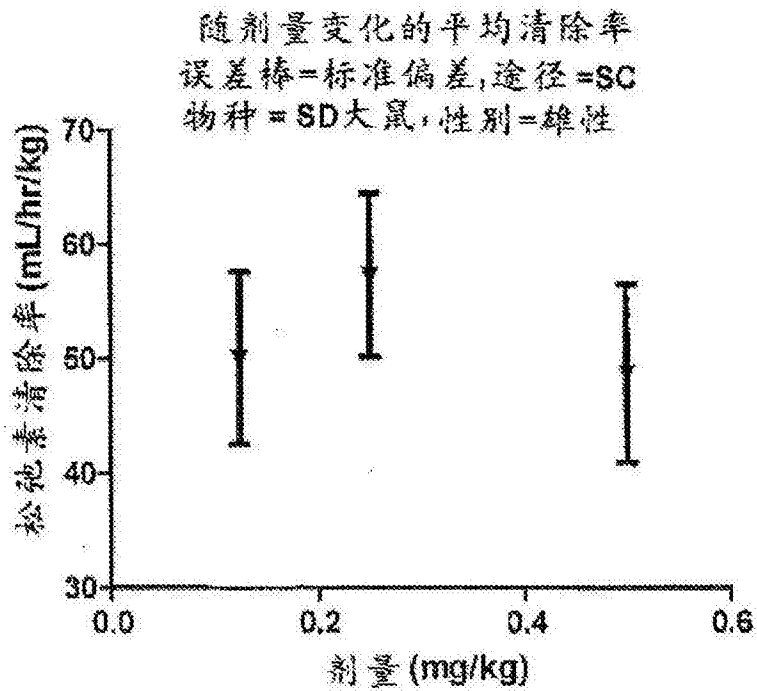


图17B

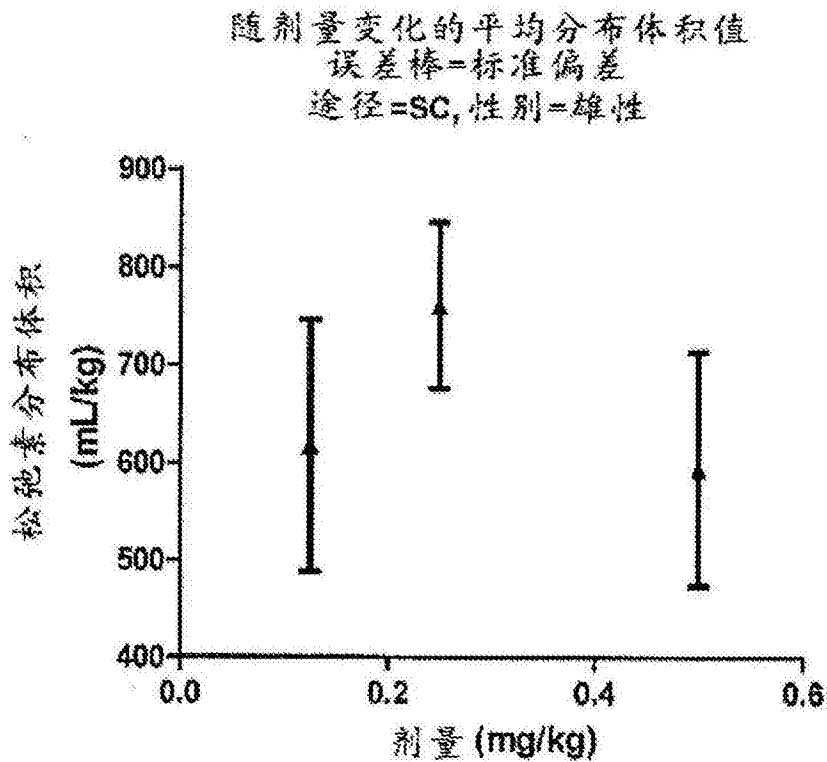


图18A

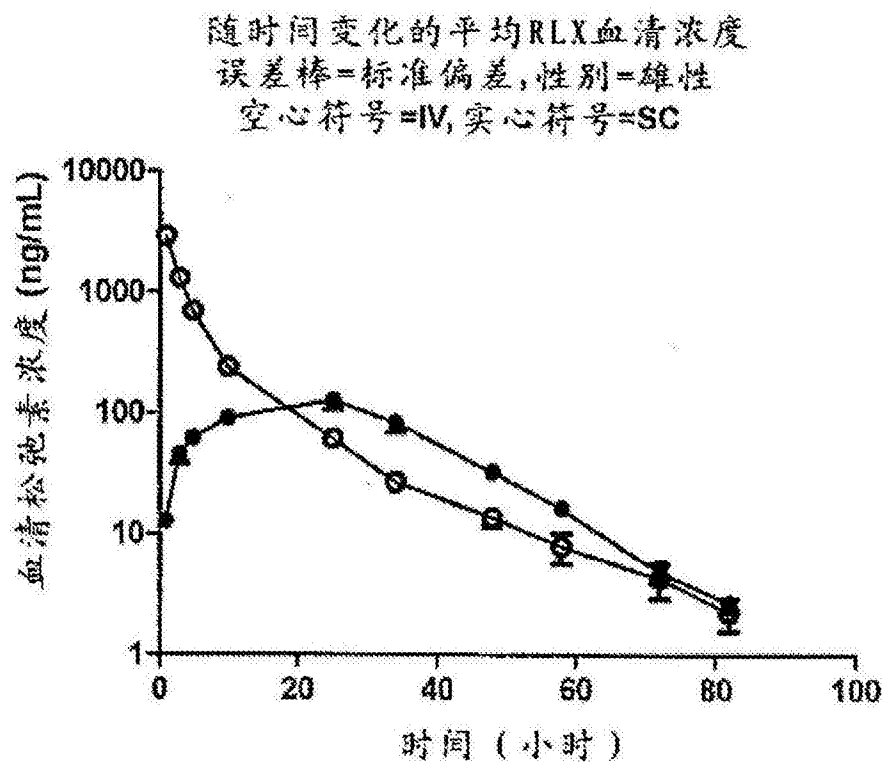


图18B

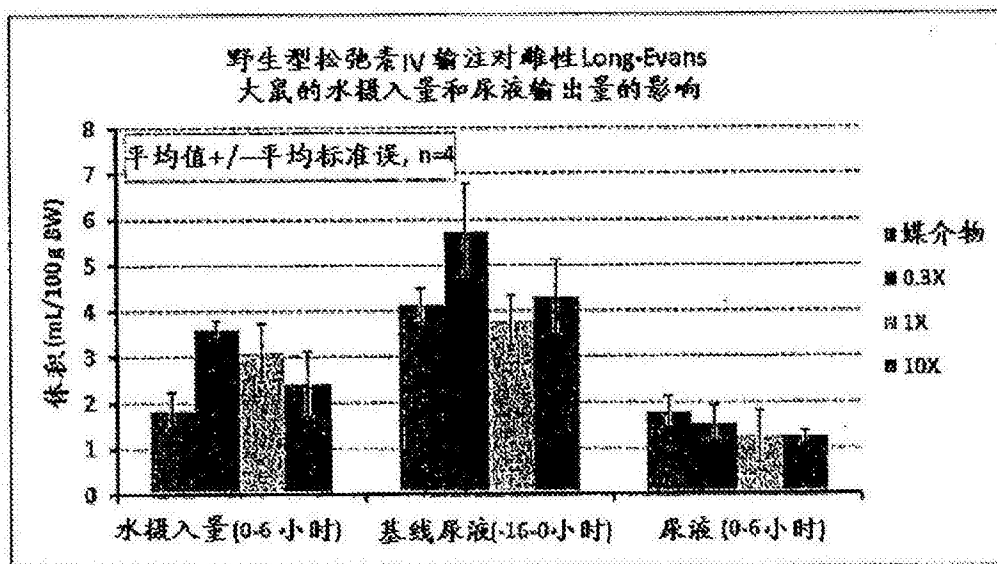


图19 A

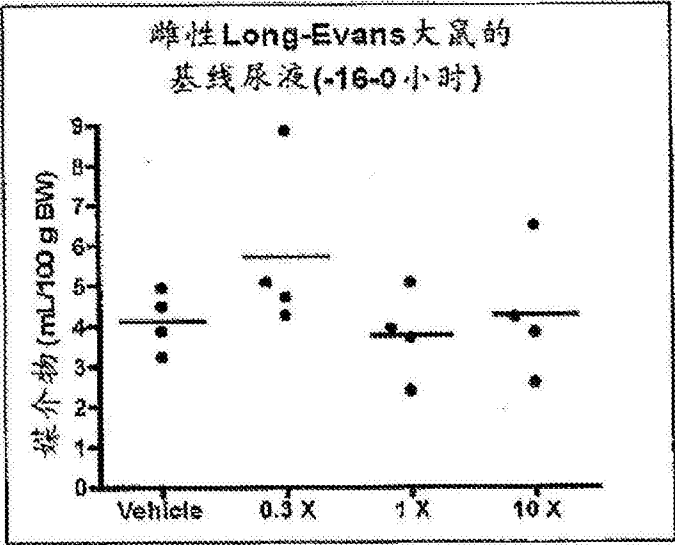


图19 B

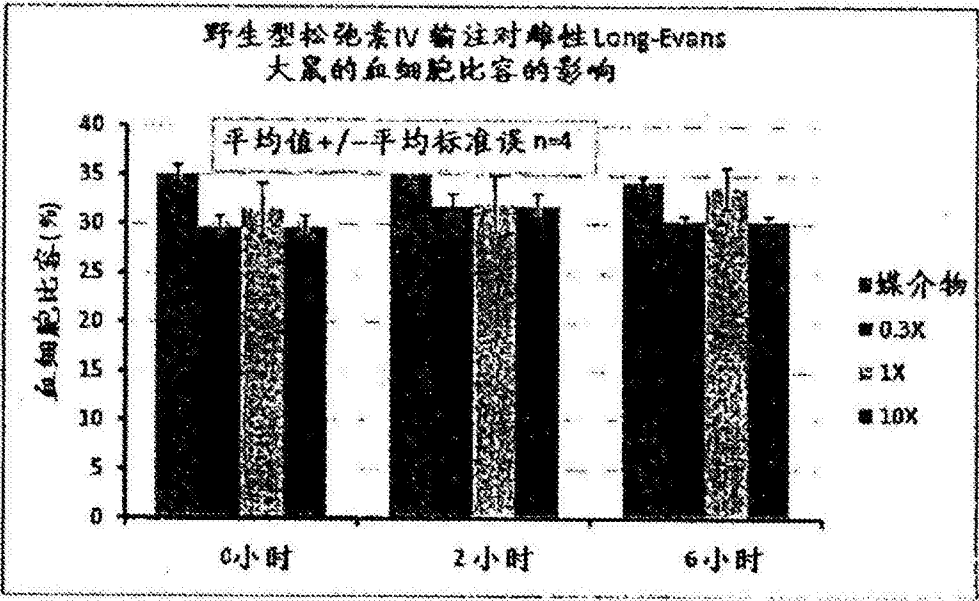


图19 C

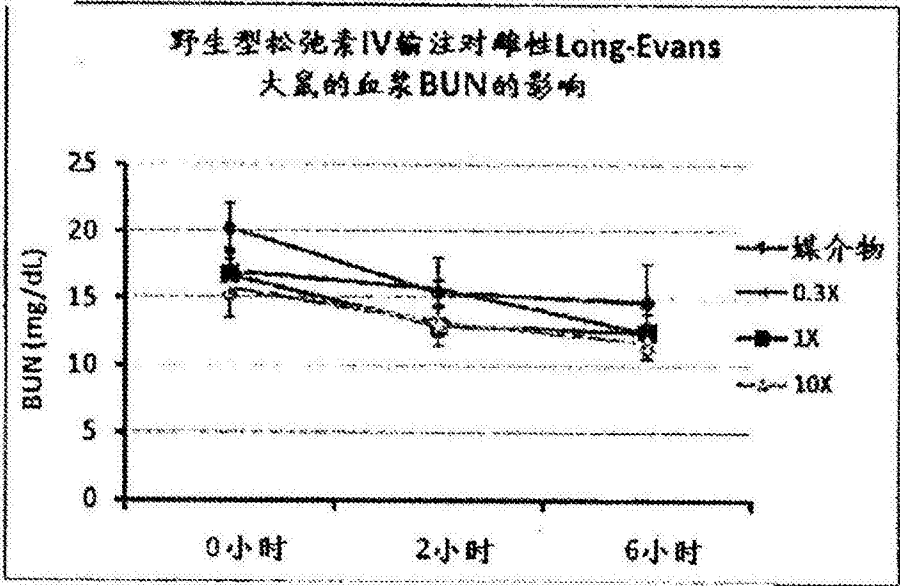


图19 D

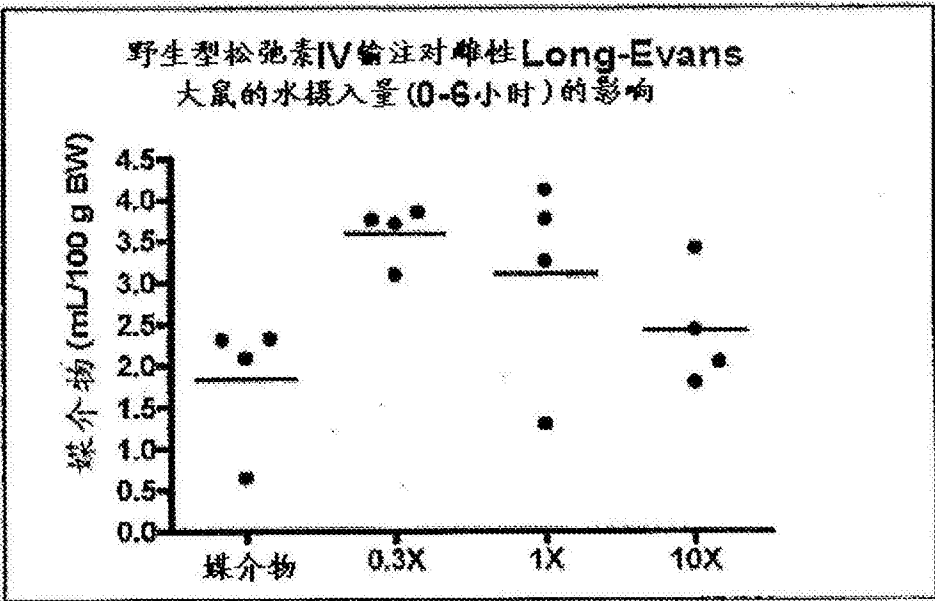


图19 E

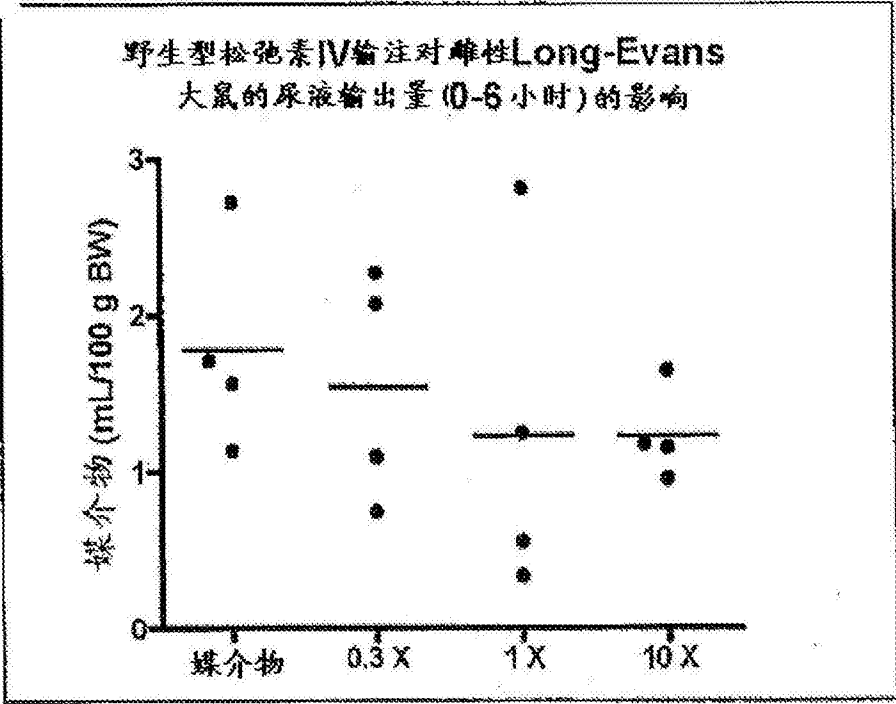


图19 F

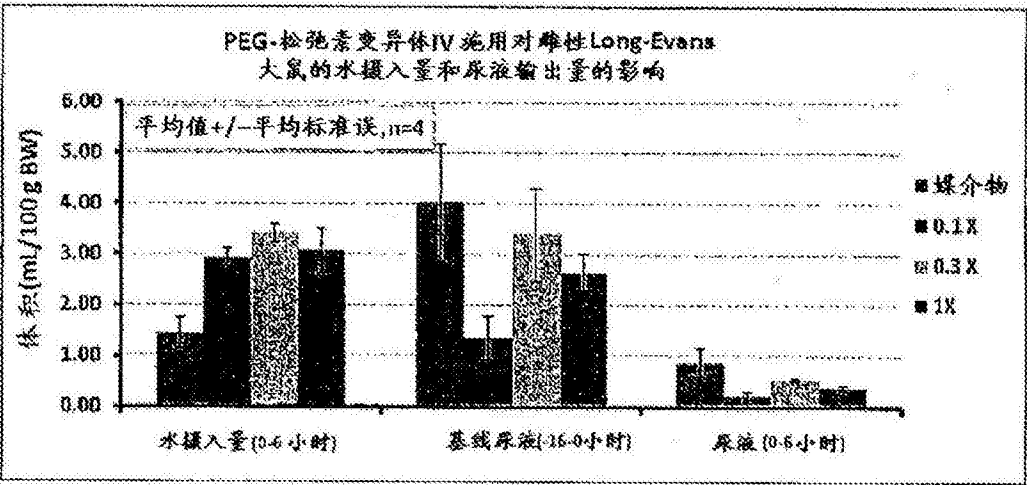


图20 A

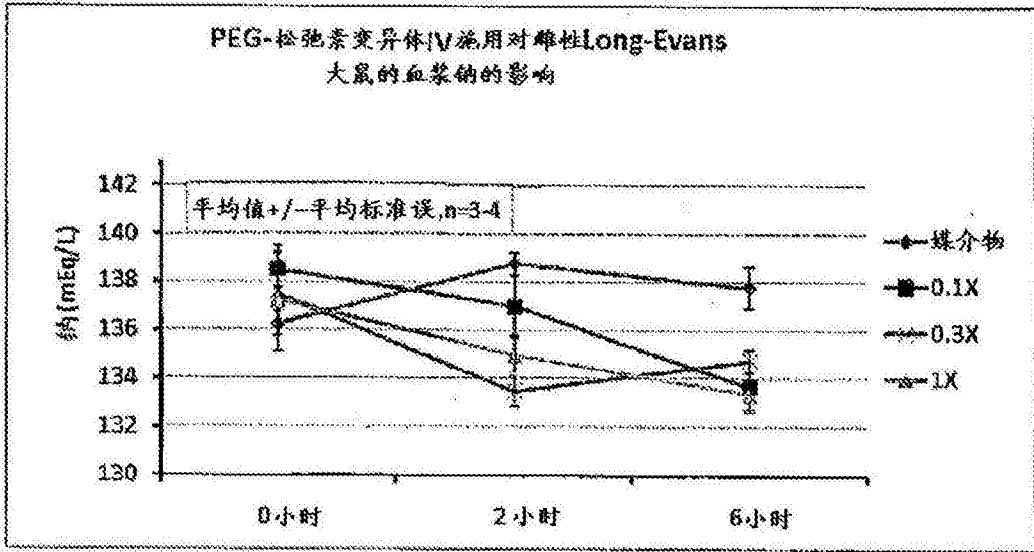


图20 B

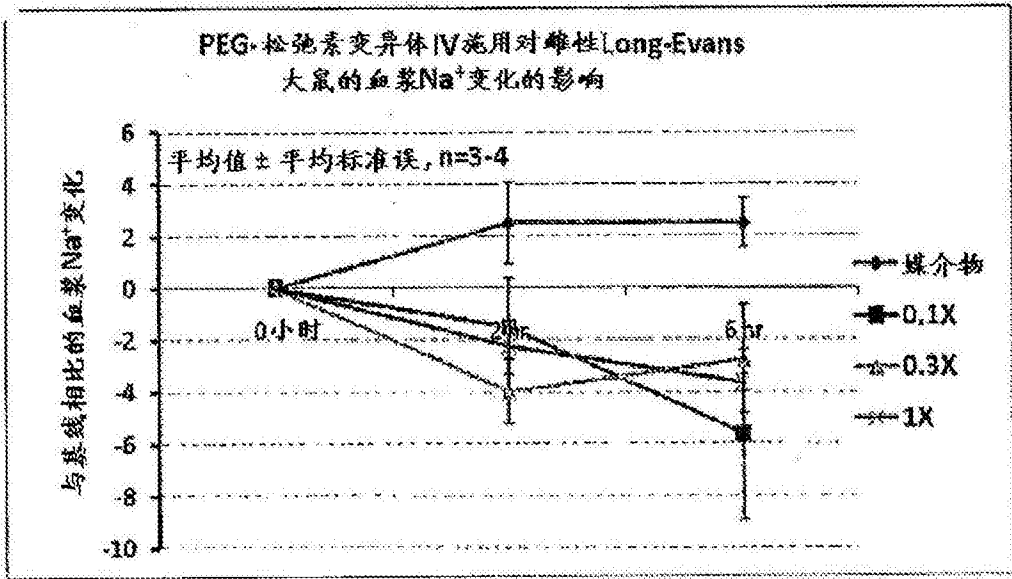


图20 C

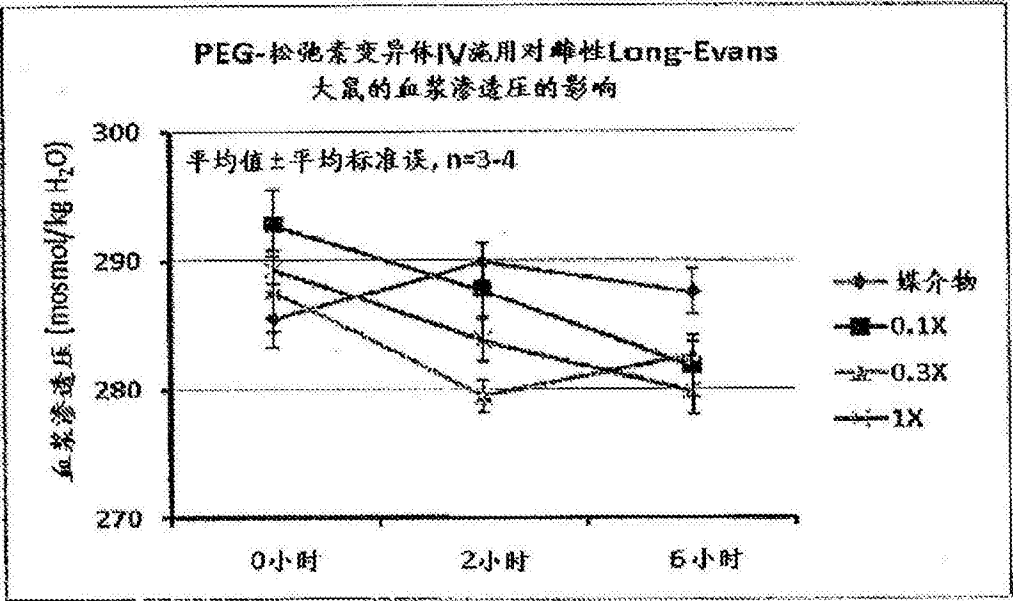


图20 D

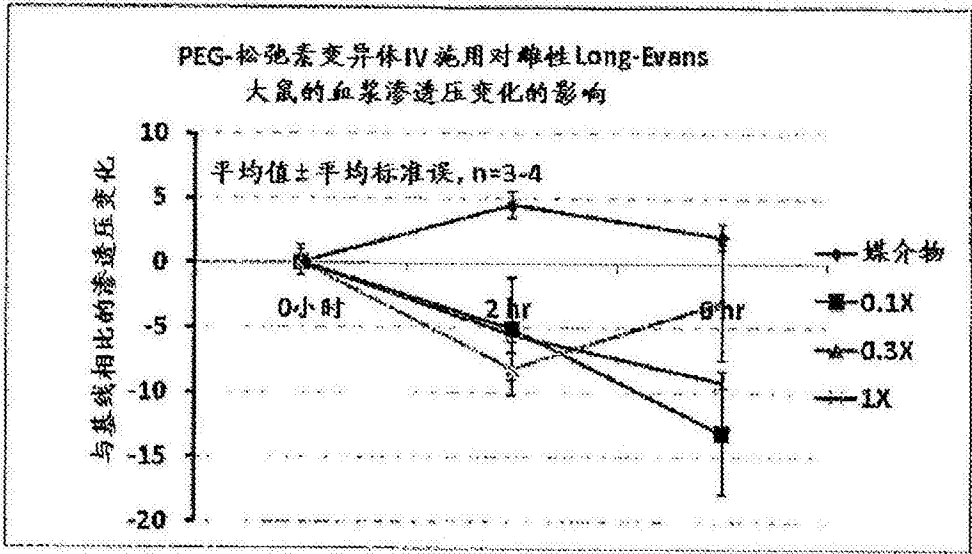


图20 E

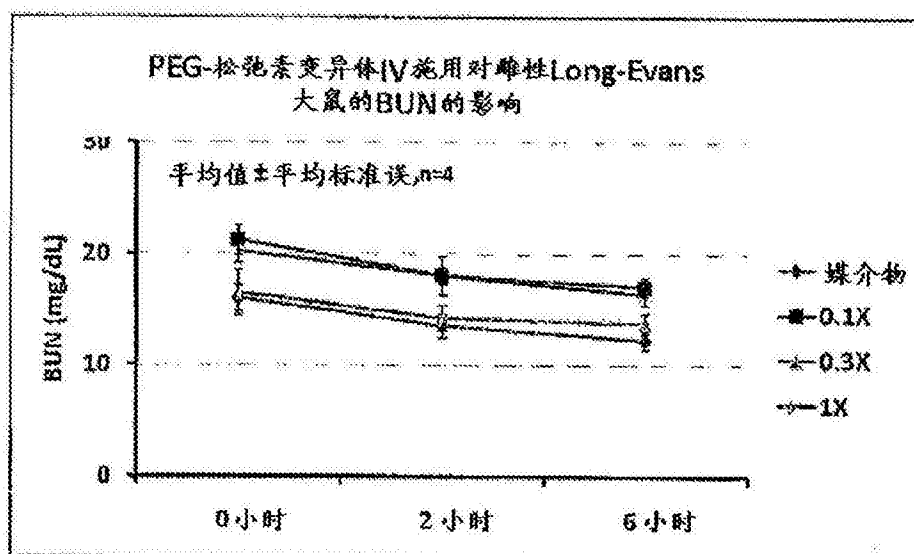


图20 F

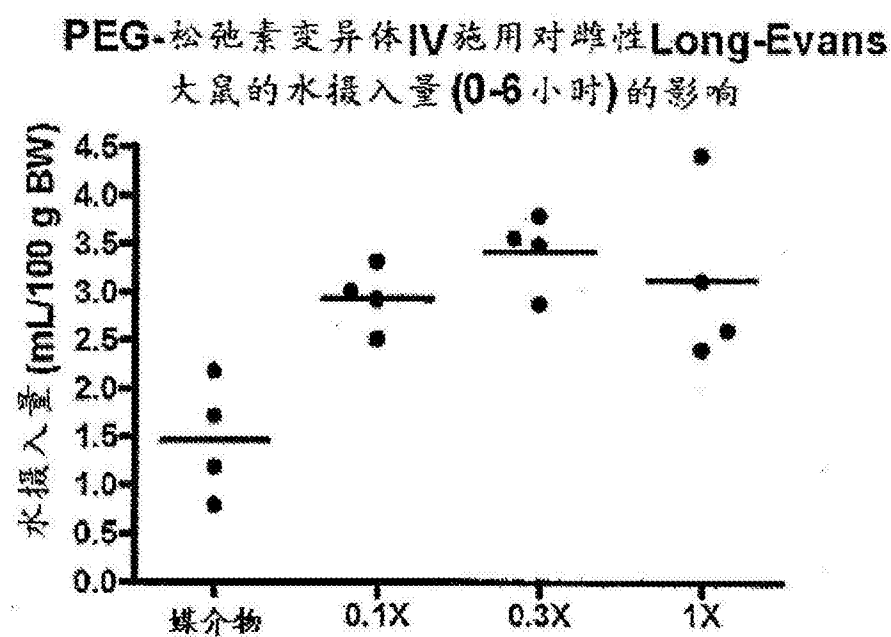


图20 G

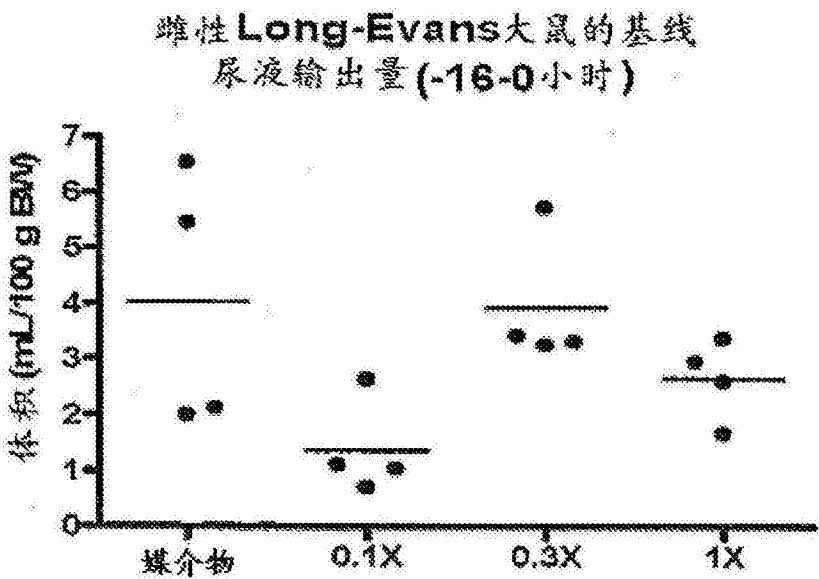


图20H

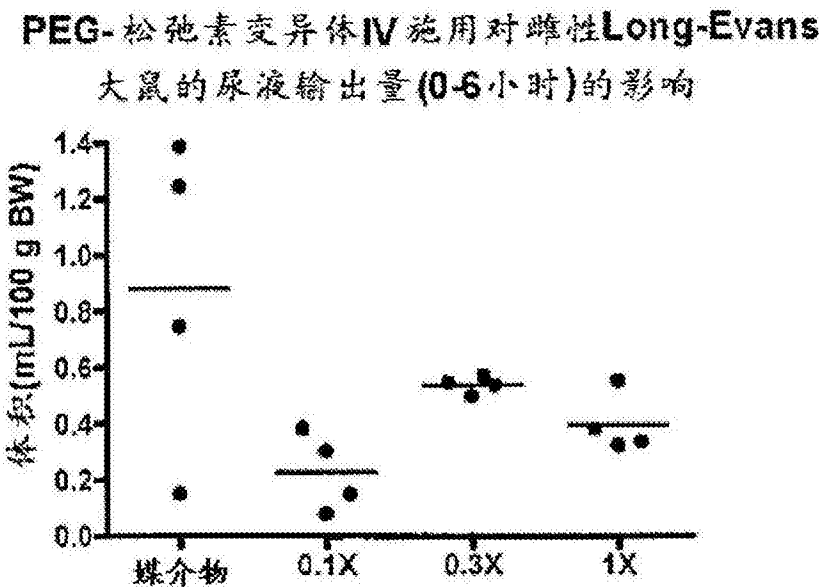


图20I

ABSTRACT

Modified relaxin polypeptides and their uses thereof are provided. This invention relates to relaxin polypeptides optionally modified with at least one non-naturally encoded amino acid.