



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0048781

(43) 공개일자 2015년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 213/55 (2006.01) C07C 247/04 (2006.01)

C07C 271/20 (2006.01) C07C 275/14 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 213/55 (2013.01)

C07C 247/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7006879

(22) 출원일자(국제) 2013년08월30일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년03월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/057677

(87) 국제공개번호 WO 2014/036492

국제공개일자 2014년03월06일

(30) 우선권주장

61/696,087 2012년08월31일 미국(US)

(71) 출원인

서트로 바이오파마, 인크.

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 스
위트 150 유타 애비뉴 310

(72) 발명자

스태포드 리안

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 에이퍼티,
6405 포스터 시티 블리바드 1000

타노스 크리스토퍼 디.

미국 94920 캘리포니아주 티뷰론 미도우 힐 درا
이브 38

양 웬진

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 보드가 스
트리트 383

(74) 대리인

유미특허법인

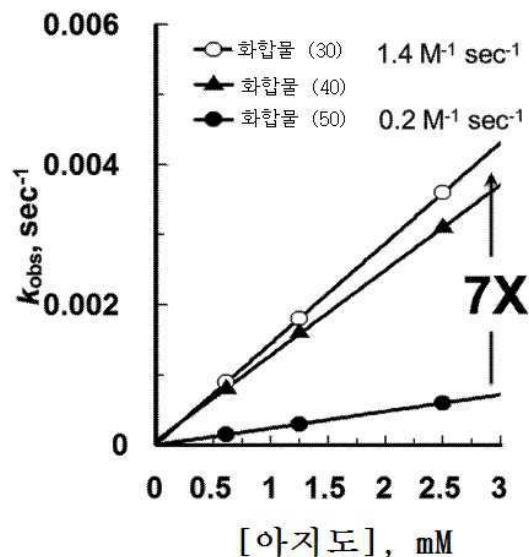
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 아지도 기를 포함하는 변형된 아미노산

(57) 요약

본 발명은 아지도 기를 포함하는 변형된 아미노산, 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체, 및 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 폴리펩타이드, 항체 및 접합체는 치료 방법, 예방 방법, 검출 방법 및 진단 방법에 사용가능하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07C 271/20 (2013.01)

C07C 275/14 (2013.01)

C07K 1/00 (2013.01)

C07K 14/00 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

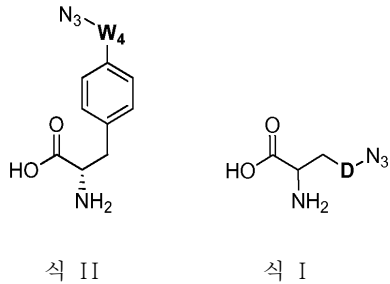
C12Y 601/01 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

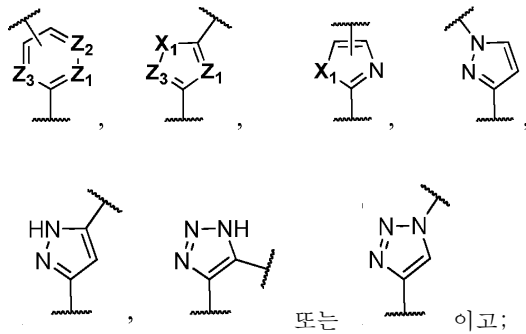
식 II 또는 식 I에 따른 화합물, 또는 이들의 염:



상기 식들에서,

D는 $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ 또는 $-\text{W}_1-\text{Y}_1-\text{C}(\text{O})-\text{Y}_2-\text{W}_2-$ 이고;

Ar은



각각의 W_1 , W_2 및 W_3 는 독립적으로 단일 결합 또는 저급 알킬렌이고;

W_4 는 C_1 - C_{10} 알킬렌이고;

각각의 X_1 은 독립적으로 $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, 또는 $-\text{S}-$ 이고;

각각의 Y_1 은 독립적으로 단일 결합, $-\text{NH}-$, 또는 $-\text{O}-$ 이고;

각각의 Y_2 는 독립적으로 단일 결합, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, N-연결된 피롤리디닐렌 또는 C-연결된 피롤리디닐렌이고; 및

Z_1 , Z_2 및 Z_3 중 하나는 $-\text{N}-$ 이고, 그 나머지는 독립적으로 $-\text{CH}-$ 임.

청구항 2

제1항에 있어서, D는 $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.

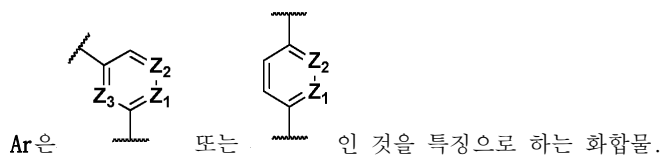
청구항 3

제1항에 있어서, D는 $-\text{W}_1-\text{Y}_1-\text{C}(\text{O})-\text{Y}_2-\text{W}_2-$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

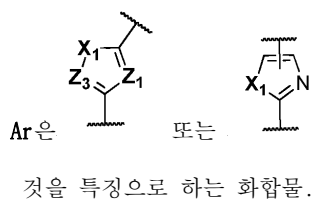
D는 $-Ar-W_3-$ 이고;



청구항 5

제1항에 있어서,

D는 $-Ar-W_3-$ 이고;

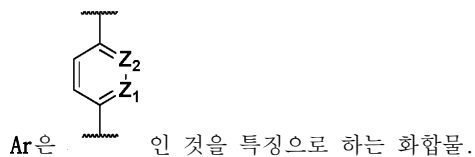


청구항 6

제1항에 있어서,

D는 $-Ar-W_3-$ 이고;

W_3 는 $-CH_2-$ 이고;



청구항 7

제1항에 있어서,

D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고;

각각의 Y_1 은 독립적으로 $-NH-$ 또는 $-O-$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서,

D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고;

각각의 Y_2 는 독립적으로 N-연결된 피롤리디닐렌 또는 C-연결된 피롤리디닐렌이고;

각각의 W_2 는 단일 결합인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서,

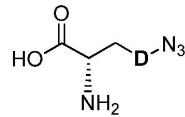
D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고;

각각의 Y_2 는 독립적으로 단일 결합, $-NH-$ 또는 $-O-$ 이고;

각각의 W_2 는 저급 알킬렌인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10

제1항에 있어서, 식 Ia에 따른 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물:



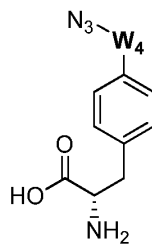
식 Ia

청구항 11

제1항에 있어서, 각각의 W_2 및 W_3 는 독립적으로 C_1-C_3 알킬렌인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 12

제1항에 있어서, 식 II에 따른 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 하는 화합물:

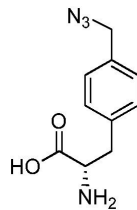


식 II

상기 식에서, W_4 는 C_1-C_{10} 알킬렌임.

청구항 13

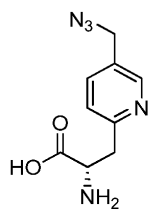
제12항에 있어서, 식 (30)에 따른 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 하는 화합물:



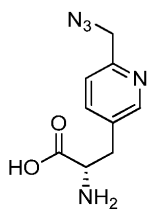
식 (30).

청구항 14

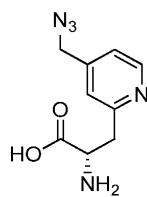
제1항에 있어서, 식 (1) - (29) 및 (40) 중 어느 하나의 식에 따른 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 하는 화합물:



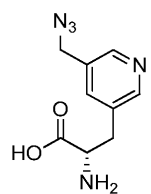
(1)



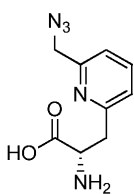
(2)



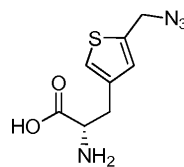
(3)



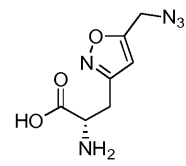
(4)



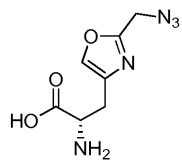
(5)



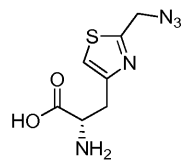
(6)



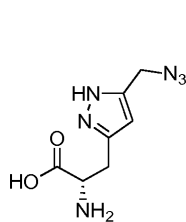
(7)



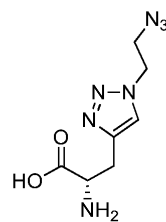
(8)



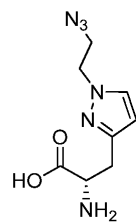
(9)



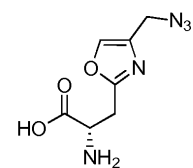
(10)



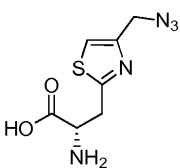
(11)



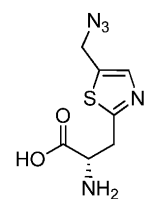
(12)



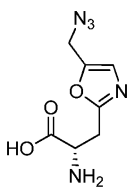
(13)



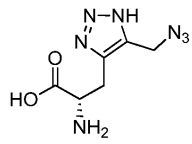
(14)



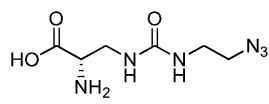
(15)



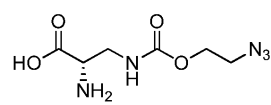
(16)



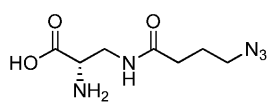
(17)



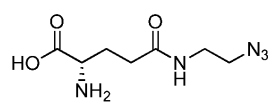
(18)



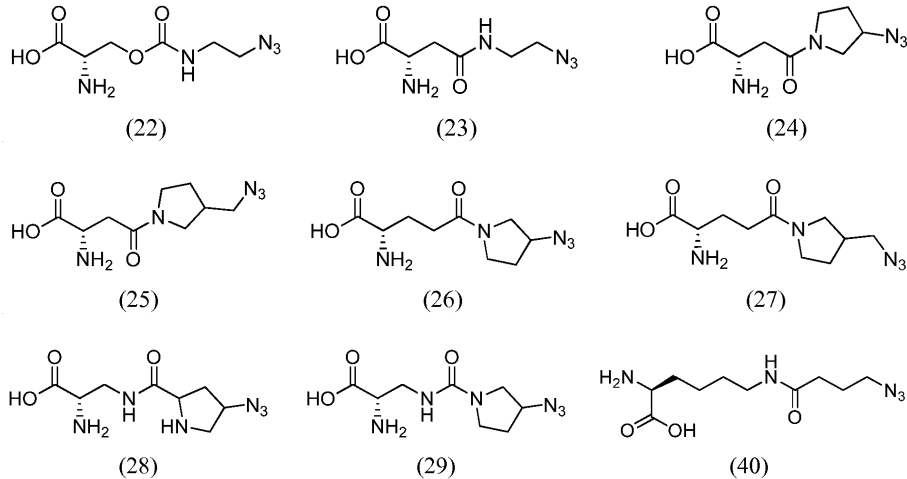
(19)



(20)



(21)



청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한항에 따른 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 16

제15항에 따른 폴리펩타이드와, 상기 폴리펩타이드에 연결된 페이로드 (payload)를 포함하며, 선택적으로, 상기 폴리펩타이드와 상기 페이로드 사이에 연결 모이어티를 포함하는, 접합체.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한항에 따른 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 항체.

청구항 18

제17항에 따른 항체와, 상기 항체에 연결된 페이로드를 포함하며, 선택적으로, 상기 항체와 상기 페이로드 사이에 연결 모이어티를 포함하는, 접합체.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한항에 따른 화합물에 해당되는 아미노산 잔기로 아미노아실화된 오르소고날 tRNA (orthogonal tRNA).

청구항 20

아미노산 잔기를 폴리펩타이드에 병합 (incorporation)하는데 적합한 조건에서 폴리펩타이드를 제19항에 따른 오르소고날 tRNA와 접촉시키는 단계를 포함하는,

폴리펩타이드의 제조 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 오르소고날 tRNA는 정상적으로는 아미노산과 연관성이 없는 코돈과 염기 쌍을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 접촉은 제1항 내지 제14항 중 어느 한항에 따른 화합물로 상기 오르소고날 tRNA를 아미노아실화할 수 있는 tRNA 신테타제 (synthetase)를 포함하는 반응 혼합물 중에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2012년 8월 31일자 "변형된 아미노산"을 발명의 명칭으로 하는 미국 가출원번호 61/696에 대한 혜택과 우선권을 주장하며, 이 문헌의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0002] 본 발명은 아지도 기를 포함하는 변형된 아미노산, 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체, 및 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체의 제조 방법을 제공한다. 본 폴리펩타이드, 항체 및 접합체는 치료 방법, 예방 방법, 검출 방법 및 진단 방법에 이용가능하다.

배경 기술

[0003] 조작된 폴리펩타이드는 치료 및 진단 용도로 널리 사용되고 있다. 치료 항체들은 다년간 예를 들어 암 및 염증성 병태를 치료하는데 유용하였다. 또한, 치료 폴리펩타이드는 혈액 병태와 바이러스 감염을 치료 및 예방하는데에도 사용되고 있다. 진단용 폴리펩타이드는 생체내에서 건강한 세포 및 조직과 병에 걸린 세포 및 조직을 동정하는데 성공적으로 사용되고 있다.

[0004] 많은 폴리펩타이드들이 특정 세포에 대한 타겟팅 기능을 제공할 수 있다. 특정 폴리펩타이드의 선택적인 친화성을 이용함으로써, 원하는 거의 모든 임의의 세포 또는 조직, 예를 들어 항원을 발현하는 세포를 타겟팅할 수 있다. 폴리펩타이드는 타겟 세포나 조직을 지연시키거나 또는 파괴하기 위한 분자 페이로드 (molecular payload)를 운반할 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드는 암, 감염성 질환, 자가면역 질환 및 이식 거부 반응 등의 병태들을 치료하는데 있어 그 활용성이 확인되고 있다.

[0005] 일부 적용예에서는, 유기체 체내에서의 수명을 늘이기 위해 치료 폴리펩타이드에 분자 실드를 결합시킨다. 또한, 폴리펩타이드는 진단제로서의 용도도 검증되고 있다. 이들 폴리펩타이드는 세포 상 또는 조직내에 타겟 수용체가 존재함을 표시하기 위한 표지물질을 운반할 수 있다. 이들 표지물질은 전형적으로 공유 결합에 의해 폴리펩타이드에 결합된다.

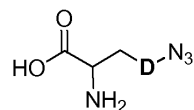
[0006] 지금까지, 폴리펩타이드에 분자 실드 및 표지물질 등의 분자 페이로드와 같은 분자체를 결합시키는 기법은, 이들이 폴리펩타이드에 결합되는 수준과 위치에 있어서의 이중성, 낮은 수율 및 활성 감소로 인해 제한적이다. 전형적인 접합 부위는 폴리펩타이드 상의 랜덤 위치, 예컨대 아미노산 측쇄 상의 랜덤 아민과 특정 폴리펩타이드 체인의 N-말단을 포함한다. 이러한 기법에서, 일부 폴리펩타이드는 어떤 위치에서 접합체에 결합되는 반면, 일부 폴리펩타이드는 다른 위치에서 동일 접합체에 결합되고, 일부 폴리펩타이드는 전혀 결합되지 않을 수 있다.

[0007] 이에, 예를 들어 치료 및 진단에 있어 폴리펩타이드의 추가적인 기대되는 유용성을 위해, 균일성, 수율 및/또는 활성 측면에서 최적화된 부위-특이적인 위치에서 변형된 폴리펩타이드가 요구되고 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 아지도 기를 포함하는 변형된 아미노산, 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체, 및 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 폴리펩타이드, 항체 및 접합체는 치료 방법, 예방 방법, 검출 방법 및 진단 방법에 이용가능하다.

[0009] 일 측면에서, 식 I에 따른 화합물 또는 이의 염이 제공된다:

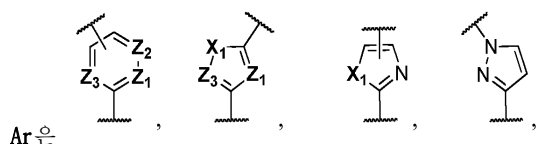


[0010]

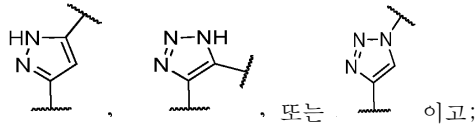
[0011] 식 I

[0012] 상기 식에서:

[0013] D는 $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ 또는 $-\text{W}_1-\text{Y}_1-\text{C}(\text{O})-\text{Y}_2-\text{W}_2-$ 이고;



[0014]



[0015]

[0016]

각각의 W_1 , W_2 및 W_3 는 독립적으로 단일 결합 또는 저급 알킬렌이고; 각각의 X_1 은 독립적으로 -NH-, -O-, 또는 -S-이고; 각각의 Y_1 은 독립적으로 단일 결합, -NH-, 또는 -O-이고; 각각의 Y_2 는 독립적으로 단일 결합, -NH-, -O-, N-연결된 피롤리디닐렌 또는 C-연결된 피롤리디닐렌이고; Z_1 , Z_2 및 Z_3 중 하나는 -N-이고, Z_1 , Z_2 및 Z_3 중 나머지는 독립적으로 -CH-이다.

[0017]

다른 측면에서, 식 I의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드 및 항체가 제공된다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드와 페이로드의 접합체가 제공된다. 추가적인 구현예들에서, 항체와 페이로드의 접합체가 제공된다.

[0018]

다른 측면에서, 식 I의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기로 아미노아실화된 오르소고날 (orthogonal) tRNA가 제공된다. 이와 관련된 측면에서, 식 I의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기로 아미노아실화된 오르소고날 tRNA를 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 폴리펩타이드의 제조 방법이 제공된다.

[0019]

본원에 기술된 식 I의 화합물은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 임의의 폴리펩타이드에 병합될 수 있다. 이러한 폴리펩타이드로는, 비제한적으로, 단백질, 항체, 항체 단편, 효소 및 핵산을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 화합물 (30), (40) 및 (50)과 화합물 (60)의 반응성을 도시한 것이다.

도 2는 화합물 (30), (40) 및 (50)과 화합물 (60)의 반응에서 k_{obs} vs. [아지드] 플롯을 도시한 것이다. 도 2에서, k_{obs} 는 $0 - 0.006 \text{ sec}^{-1}$ 단위의 수직축이며, [아지드]는 $0 - 3 \text{ mM}$ 단위의 수평 축이다. 도 2에서, 화합물 (30)의 결과는 속 빈 원형으로, 화합물 (40)의 결과는 속 채운 삼각형으로, 화합물 (50)의 결과는 속 채운 원형으로 표시된다. 도 2에 제시된 바와 같이, 화합물 (30)과 (40)은 1차 속도 상수 (first order rate constant)가 $1.4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로, 1차 속도 상수가 $0.2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 인 화합물 (50) 보다 약 7배 높다.

도 3은 GFP의 Y50TAG 위치에 pAMF가 병합되는 것을 경시적으로 도시한 그래프이다. 도 3에서, RFU는 수직 축에 $0 - 400000$ 로 표시되며, 시간은 수평 축에 $0 - 600$ 분 단위로 표시된다. 도 3에서, turboGFP의 결과는 속 채운 사각형 (상)으로, pCNFRS D286R pAMF의 결과는 속 채운 다이아몬드형 (중)으로, Y50TAG의 결과는 속 채운 삼각형 (하)으로 제시된다. 도 3에 제시된 바와 같이, turboGFP는 200분에 대략 250,000 RFU이고, pCNFRS D286R pAMF는 200분에 대략 130,000 RFU이고, Y50TAG는 200분에 대략 0 RFU이다. 도 3에 제시된 바와 같이, turboGFP는 400분에 대략 340,000 RFU이고, pCNFRS D286R pAMF는 400분에 대략 160,000 RFU이고, Y50TAG는 400분에 대략 0 RFU이다. 도 3에 제시된 바와 같이, turboGFP는 600분에 대략 370,000 RFU이고, pCNFRS D286R pAMF는 600분에 대략 170,000 RFU이고, Y50TAG는 600분에 대략 0 RFU이다.

도 4는 아미노산 유사체 (30), (1) 및 (2)와의 반응시 DBCO-NH₂ (61) 잔류 분획 vs. 시간 (hour) 그래프를 도시한 것이다. 도 4에서, DBCO-NH₂ (61) 잔류 분획은 수직 축에 단위없는 값 $0 - 1.2$ 로 표시되며, 시간은 수평 축에 $10 - 20$ 시간의 단위로 표시된다. 도 4에서, 화합물 (30)의 결과는 속 채운 다이아몬드형으로 표시되며, 화합물 (1)의 결과는 속 채운 사각형으로 표시되며, 화합물 (2)의 결과는 속 채운 삼각형으로 표시된다. 도 4에 제시된 바와 같이, 화합물 (1)과 (30)은 비슷한 속도로 화합물 (61)과 반응하는 반면, 화합물 (2)와 화합물 (61) 간의 반응 속도는 화합물 (1)과 (61), 그리고 화합물 (30)과 (61) 간의 반응 속도 보다 2배 또는 4배 낮았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

본 발명은 식 I의 화합물, 식 I의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체, 및 식 I의 화합물에 해당되는 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드, 항체 및 접합체의 제조 방법을 제공한다.

- [0022] 정의
- [0023] 본원에 제공된 화합물을 언급하는 경우, 달리 표시되지 않은 한 아래 용어들은 다음과 같은 의미를 가진다. 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용되는 모든 기술 용어와 과학 용어들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에서 용어에 대해 여러 정의가 존재하는 경우, 달리 언급되지 않은 한 그 섹션에 언급된 용어의 정의를 따른다.
- [0024] 용어 "알킬"은, 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 선형 또는 분지형의 포화 탄화수소를 지칭한다. 특정 구현예들에서, 알킬 기는 1차, 2차 또는 3차 탄화수소이다. 특정 구현예들에서, 알킬 기는 탄소 원자를 1-10개 포함하며, 즉 $C_1 - C_{10}$ 알킬이다. 특정 구현예들에서, 알킬 기는 메틸, CF_3 , CCl_3 , $CFC1_2$, CF_2Cl , 에틸, CH_2CF_3 , CF_2CF_3 , 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec부틸, *t*-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실, 3-메틸펜틸, 2,2-다이메틸부틸 및 2,3-다이메틸부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이 용어는 치환된 알킬기와 비치환된 알킬기, 예컨대 할로겐화된 알킬기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 알킬 기는 불화된 알킬기이다. 알킬 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예들은, 예를 들어 Greene, *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991에 교시된, 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 바와 같이, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설푼산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0025] 용어 "저급 알킬"은, 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 탄소 원자 1-6개를 가진 선형 또는 분지형의 포화 탄화수소, 즉, $C_1 - C_6$ 알킬을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 저급 알킬 기는 1차, 2차 또는 3차 탄화수소이다. 이 용어는 치환 및 비치환된 모이어티들을 모두 포함한다.
- [0026] 용어 "사이클로알킬"은, 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 포화된 사이클릭 탄화수소를 지칭한다. 특정 구현예들에서, 사이클로알킬 기는 포화, 및/또는 브릿지된 및/또는 비-브릿지된 및/또는 융합된 이환식 기일 수 있다. 특정 구현예들에서, 사이클로알킬 기는 탄소 원자를 3-10개 포함하며, 즉, $C_3 - C_{10}$ 사이클로알킬이다. 일부 구현예들에서, 사이클로알킬은 3 - 15 (C_{3-15}), 3 - 10 (C_{3-10}), 또는 3 - 7 (C_{3-7})개의 탄소 원자를 가진다. 특정 구현예들에서, 사이클로알킬 기는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥실메틸, 사이클로헵틸, 바이사이클로[2.1.1]헥실, 바이사이클로[2.2.1]헵틸, 데칼리닐 또는 아다만틸이다. 이 용어는 치환 및 비치환된 사이클로알킬 기, 예컨대 할로겐화된 사이클로알킬 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 사이클로알킬 기는 불화된 사이클로알킬 기이다. 사이클로알킬 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설푼산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0027] "알킬렌"은 특히 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 1-11개의 탄소 원자를 포함하는, 포화된 2가 지방족 탄화수소 기를 지칭한다. 특정 구현예들에서, 알킬렌 기는 탄소 원자를 1-10개 포함한다. 이 용어는 치환된 및 비치환된 모이어티 둘다를 포함한다. 이 용어는 메틸렌 ($-CH_2-$), 에틸렌 ($-CH_2CH_2-$), 프로필렌 이성질체 (예로, $-CH_2CH_2CH_2-$ 및 $-CH(CH_3)CH_2-$) 등의 기로 예시된다. 이 용어는 할로겐화된 알킬렌 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 알킬렌 기는 불화된 알킬렌 기이다. 알킬렌 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 알킬아릴, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설푼산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 및 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] "알케닐"은 특정 구현예에서 탄소 원자가 최대 약 11개인, 2-8개 또는 2-6개이며, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있으며, 하나 이상 또는 1-2개의 올레핀 불포화 부위를 가지고 있는, 올레핀 불포화된 일가 탄화수소 기를 지칭한다. 이 용어는 치환된 및 비치환된 모이어티 둘다를 포함한다. 알케닐 기의 예로는 에테닐 (즉, 비닐, 또는 $-CH=CH_2$), *n*-프로페닐 ($-CH_2CH=CH_2$), 이소프로페닐 ($-C(CH_3)=CH_2$) 등을 포함한다. 이 용어는 할로겐화된 알케닐 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 알케닐 기는 불화된 알케닐 기이다. 알케닐 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아

노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 용어 "사이클로알케닐"은, 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 불포화 사이클릭 탄화수소를 지칭한다. 특정 구현예들에서, 사이클로알케닐은 이중 결합을 하나 이상 포함하는 단환식 또는 다환식의 고리 시스템이다. 특정 구현예들에서, 사이클로알케닐 기는 브릿지된, 비-브릿지된, 및/또는 융합된 이환식 기일 수 있다. 특정 구현예들에서, 사이클로알킬 기는 탄소 원자를 3-10개 포함하며, 즉, $C_3 - C_{10}$ 사이클로알킬이다. 일부 구현예들에서, 사이클로알케닐은 3 - 7 (C_{3-10}) 또는 4 - 7 (C_{3-7})개의 탄소 원자를 가진다. 이 용어는 치환 및 비치환된 사이클로알케닐 기를 모두 포함하며, 예로 할로겐화된 사이클로알케닐 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 사이클로알케닐 기는 불화된 사이클로알케닐 기를 포함한다. 사이클로알케닐 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] "알케닐렌"은 특정 구현예에서 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 최대 약 11개, 또는 2-6개의 탄소 원자를 가지며, 하나 이상 또는 1-2개의 올레핀 불포화 부위를 가지고 있는, 올레핀 불포화된 2가 탄화수소 기를 지칭한다. 이 용어는 에테닐렌 ($-CH=CH-$), 프로페닐렌 이성질체 (예로, $-CH=CHCH_2-$, $-C(CH_3)=CH-$ 및 $-CH=C(CH_3)-$) 등의 기로 예시된다. 이 용어는 치환 및 비치환된 알케닐렌 기를 모두 포함하며, 예로, 할로겐화된 알케닐렌 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 알케닐렌 기는 불화된 알케닐렌 기를 포함한다. 알케닐렌 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0031] "알킬"은 특정 구현예에서 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 최대 약 11개 또는 2-6개의 탄소 원자를 포함하며, 하나 이상 또는 1-2개의 알킬 불포화 부위를 가지고 있는, 아세틸렌 불포화된 탄화수소 기를 지칭한다. 알킬 기에 대한 비-제한적인 예로는 아세틸렌, 에틸 ($-C\equiv CH$), 프로파길 ($-CH_2C\equiv CH$) 등을 포함한다. 이 용어는 치환 및 비치환된 알킬 기를 모두 포함하며, 예로 할로겐화된 알킬 기를 포함한다. 특정 구현예들에서, 알킬 기는 불화된 알킬 기를 포함한다. 알킬 기를 치환시킬 수 있는 모이어티에 대한 비-제한적인 예는, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 카르보닐, 설파닐, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 용어 "아릴"은, 본원에서, 달리 언급되지 않은 한, 페닐, 바이페닐 또는 나프틸을 지칭한다. 이 용어는 치환된 및 비치환된 모이어티 둘다를 포함한다. 아릴 기는, 임의의 기술된 모이어티, 예컨대 비제한적인 예로, 당해 기술 분야의 당업자가 알고 있는, 예를 들어, Greene, *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991에 기술된, 필요에 따라 보호 또는 비보호된, 할로겐 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 알킬, 할로알킬, 하이드록실, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 또는 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 모이어티로 치환될 수 있다.

[0033] "알콕시"는 기 $-OR'$ 로서, 여기서 R'은 알킬 또는 사이클로알킬이다. 알콕시 기로는, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, tert-부톡시, sec-부톡시, n-펜톡시, n-헥소시, 1,2-다이메틸부톡시 등을 포함한다.

[0034] "알콕시카르보닐"은 라디칼 $-C(O)-$ 알콕시를 지칭하며, 여기서 알콕시는 본원에 정의된 바와 같이 정의된다.

[0035] "아미노"는 라디칼 $-NH_2$ 를 지칭한다.

[0036] "카르복실" 또는 "카르복시"는 라디칼 $-C(O)OH$ 를 의미한다.

[0037] 용어 "알킬아미노" 또는 "아릴아미노"는 각각 하나 또는 2개의 알킬 또는 아릴 치환기를 가진 아미노 기를 의미한다. 특정 구현예들에서, 알킬 치환기는 저급 알킬이다. 다른 구현예에서, 알킬 또는 저급 알킬은 비치환된다.

[0038] "할로겐" 또는 "할로"는 클로로, 브로모, 플루오로 또는 요오도를 의미한다.

[0039] "티오알콕시"는 R'이 알킬 또는 사이클로알킬인 기 $-SR'$ 을 의미한다.

[0040]

용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클릭"은 하나 이상의 비-방향족 고리를 포함하는 일가 단환식 비-방향족 고리 시스템 및/또는 다환식 고리 시스템을 지칭하는 것으로서, 여기서 하나 이상의 비-방향족 고리 원자는 0, S 또는 N로부터 독립적으로 선택되는 이종원자이며, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 특정 구현예들에서, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클릭 기는 3 - 20, 3 - 15, 3 - 10, 3 - 8, 4 - 7, 또는 5 - 6개의 고리 원자를 가진다. 헤테로사이클릴 기는 비-방향족 고리를 통해 나머지 분자와 결합된다. 특정 구현예들에서, 헤테로사이클릴은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 시스템으로서, 이는 융합 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있으며, 여기서 질소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있으며, 질소 원자는 선택적으로 4급화될 수 있으며, 일부 고리는 일부 또는 전체가 포화되거나 또는 방향족일 수 있다. 헤테로사이클릴은 임의의 이종원자 또는 탄소 원자 위치에서 주 구조체와 결합하여, 안정한 화합물을 구축할 수 있다. 이러한 헤테로사이클릭 라디칼의 예로는, 비제한적으로, 아제피닐, 벤조다이옥사닐, 벤조다이옥솔릴, 벤조푸라노닐, 벤조피라노닐, 벤조피라닐, 벤조테트라하이드로푸라닐, 벤조테트라하이드로티에닐, 벤조티오피라닐, 벤조사지닐, β -카르볼리닐, 크로마닐, 크로모닐, 신놀리닐, 쿠마리닐, 데카하이드로이소퀴놀리닐, 다이하이드로벤조이소티아지닐, 다이하이드로벤조이소사지닐, 다이하이드로푸릴, 다이하이드로이소인돌릴, 다이하이드로피라닐, 다이하이드로피라졸릴, 다이하이드로피라지닐, 다이하이드로피리디닐, 다이하이드로피리미디닐, 다이하이드로피롤릴, 다이옥솔라닐, 1,4-다이티아닐, 푸라노닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 인돌리닐, 이소벤조테트라하이드로푸라닐, 이소벤조테트라하이드로티에닐, 이소크로마닐, 이소쿠마리닐, 이소인돌리닐, 이소티아졸리디닐, 이소사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 옥사졸리디노닐, 옥사졸리디닐, 옥시라닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피롤리디닐, 피롤리닐, 퀴놀리디닐, 테트라하이드로푸릴, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티에닐, 티아모르폴리닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로퀴놀리닐 및 1,3,5-트리티아닐을 포함한다. 특정 구현예들에서, 헤테로사이클릭은 또한 본원에 기술된 바와 같이 선택적으로 치환될 수 있다.

[0041]

용어 "헤테로아릴"은, 하나 이상의 방향족 고리를 포함하며, 상기 하나 이상의 방향족 고리가 고리에 0, S 및 N으로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 이종원자를 포함하는, 일가 단환식 방향족 기 및/또는 다환식 방향족 기를 지칭한다. 헤테로아릴 기는 방향족 고리를 통해 나머지 분자에 결합한다. 헤테로아릴 기의 각 고리는 1 또는 2개의 0 원자, 1 또는 2개의 S 원자 및/또는 1 내지 4개의 N 원자를 포함할 수 있으나, 단, 각 고리에서 이종원자의 총 수는 4개 이하이며, 각각의 고리는 하나 이상의 탄소 원자를 포함한다. 특정 구현예들에서, 헤테로아릴은 5 - 20, 5 - 15 또는 5 - 10개의 고리 원자를 가진다. 단환식 헤테로아릴 기의 예로는, 비제한적으로, 푸라닐, 이미다졸릴, 이소티아졸릴, 이소사졸릴, 옥사다리아졸릴, 옥사다리아졸릴, 옥사졸릴, 피라지닐, 피라졸릴, 피라다지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤릴, 티아다리아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 테트라졸릴, 트리아지닐 및 트리아졸릴을 포함한다. 이환식 헤테로아릴 기의 예로는, 비제한적으로, 벤조푸라닐, 벤조이미다졸릴, 벤조이소사졸릴, 벤조피라닐, 벤조티아다리아졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티에닐, 벤조트리아졸릴, 벤조옥사졸릴, 푸로피리디닐, 이미다조피리디닐, 이미다조티아졸릴, 인돌리지닐, 인돌리닐, 인다졸릴, 이소벤조푸라닐, 이소벤조티에닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀리닐, 이소티아졸릴, 나프티리디닐, 옥사졸로피리디닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 푸리닐, 피리도피리디닐, 피롤로피리디닐, 퀴놀리닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 티아다리아졸로피리미디닐 및 티에노피리디닐을 포함한다. 삼환식 헤테로아릴 기의 예로는, 비제한적으로, 아크리디닐, 벤즈인돌릴, 카바졸릴, 다이벤조푸라닐, 페리미디닐, 페난트롤리닐, 페난트리디닐, 펜아르사지닐, 펜아지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐 및 크산테닐을 포함한다. 특정 구현예들에서, 헤테로아릴은 또한 본원에 기술된 바와 같이 선택적으로 치환될 수 있다.

[0042]

용어 "알킬아릴"은 알킬 치환기를 가진 아릴 기를 지칭한다. 용어 "아랄킬" 또는 "아릴알킬"은 아릴 치환기를 가진 알킬 기를 지칭한다.

[0043]

용어 "보호기"는, 본원에서, 달리 정의되지 않은 한, 추가적인 반응을 방지하거나 또는 다른 목적으로 산소, 질소 또는 인에 부가되는 기를 지칭한다. 매우 다양한 산소 및 질소 보호기들이 유기 합성 분야의 당업자들에게 공지되어 있다.

[0044]

"약제학적으로 허용가능한 염"은 생물학적 특성을 보유하고 있지만, 독성은 아니거나 약제학적 용도로 부적절한 것이 아닌, 본원에 제공된 화합물의 임의의 염을 지칭한다. 이러한 염은 당해 기술 분야에 널리 공지된 다양한 유기 및 무기 반대-이온으로부터 파생될 수 있다. 이러한 염으로는, 비제한적으로, (1) 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 설파산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 프로피온산, 핵산산, 사이클로헥실프로피온산, 글리콜산, 글루타르산, 피루브산, 락산, 말론산, 숙신산, 소르브산, 아스코르브산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 피크릭산, 신남산, 만델산, 프

탈산, 라우르산, 메탄설향산, 에탄설향산, 1,2-에탄-다이설향산, 2-하이드록시에탄설향산, 벤젠설향산, 4-클로로벤젠설향산, 2-나프탈렌설향산, 4-톨루엔설향산, 캄포르산, 캄포르설향산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-oct-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, *tert*-부틸아세트산, 라우릴 설향산, 글루콘산, 벤조산, 글루탐산, 하이드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 사이클로헥실설향산, 퀸산 (quinic acid), 무콘산 등의 유기 산 또는 무기 산과 형성된 산 부가 염; 또는 (2) 모 화합물에 존재하는 산성 프로톤이 (a) 금속 이온, 예컨대, 알칼리 금속 이온, 알칼리토류 이온 또는 알루미늄 이온, 또는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 하이드록사이드, 예컨대, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄, 리튬, 아연, 및 바륨 하이드록사이드, 암모니아로 치환되거나, 또는 (b) 암모니아, 메틸아민, 다이메틸아민, 다이에틸아민, 피콜린, 에탄올아민, 다이에탄올아민, 트리에탄올아민, 에틸렌다이아민, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 콜린, N,N'-다이벤질에틸렌-다이아민, 클로로프로카인, 다이에탄올아민, 프로카인, N-벤질펜에틸아민, N-메틸글루카민 피페라진, 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄, 테트라메틸암모늄 하이드록사이드 등과 같은 지방족, 지환식 또는 방향족 유기아민 등의 유기 염기와의 배위시 형성되는, 염기 부가 염을 포함한다.

[0045]

약제학적으로 허용가능한 염은, 예를 들어, 단지, 비제한적인 예로, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 테트라알킬암모늄 등을 추가로 포함하며, 화합물이 염기성 관능기를 포함하는 경우, 무독성 유기 산 또는 무기 산의 염, 예컨대 하이드로할라이드, 예로, 하이드로클로라이드 및 하이드로브로마이드, 설향염, 포스페이트, 설향염, 나이트레이트, 아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 프로피오네이트, 헥사노에이트, 사이클로헥틸프로피오네이트, 글리콜레이트, 글루타레이트, 피루베이트, 락테이트, 말로네이트, 숙시네이트, 소르베이트, 아스코르베이트, 말레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 타르타레이트, 사이트레이트, 벤조에이트, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조에이트, 피크레이트, 신나메이트, 만델레이트, 프탈레이트, 라우레이트, 메탄설향포네이트 (메실레이트), 에탄설향포네이트, 1,2-에탄-다이설향포네이트, 2-하이드록시에탄설향포네이트, 벤젠설향포네이트 (메실레이트), 4-클로로벤젠설향포네이트, 2-나프탈렌설향포네이트, 4-톨루엔설향포네이트, 캄포레이트, 캄포설향포네이트, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-oct-2-엔-1-카르복실레이트, 글루코헵토네이트, 3-페닐프로피오네이트, 트리메틸아세테이트, *tert*-부틸아세테이트, 라우릴 설향염, 글루코네이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 하이드록시나프토에이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 사이클로헥실설향염, 퀴네이트, 무코네이트 등을 추가로 포함한다.

[0046]

용어 "아실" 또는 "O-연결된 에스테르"는, R'이 알킬 또는 사이클로알킬 (저급 알킬이 포함됨), 아미노산의 카르복실레이트 잔기, 페닐 등의 아릴, 알콕시알킬, 벤질 등의 아릴알킬, 메톡시메틸 등의 알콕시알킬, 아릴옥시알킬, 예컨대 페녹시메틸; 또는 치환된 알킬 (저급 알킬이 포함됨), 클로로, 브로모, 플루오로, 요오도로 선택적으로 치환된 페닐 등의 아릴, C₁ - C₄ 알킬 또는 C₁ - C₄ 알콕시, 설향염 에스테르, 예컨대 알킬 또는 아릴알킬 설향염, 예로, 메탄설향염, 모노, 다이 또는 트리프로스테이트 에스테르, 트리틸 또는 모노메톡시-트리틸, 치환된 벤질, 알콕시알킬, 벤질 등의 아릴알킬, 메톡시메틸 등의 알콕시알킬, 페녹시 메틸 등의 아릴옥시알킬인, 식 C(O)R'의 기를 지칭한다. 에스테르에서 아릴 기는 선택적으로 페닐 기를 포함한다. 특히, 아릴 기로는 아세틸, 트리플루오로아세틸, 메틸아세틸, 사이클로프로필아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 헥사노일, 헵타노일, 옥타노일, 네오-헵타노일, 페닐아세틸, 2-아세톡시-2-페닐아세틸, 다이페닐아세틸, α-메톡시-α-트리플루오로메틸-페닐아세틸, 브로모아세틸, 2-니트로-벤젠아세틸, 4-클로로-벤젠아세틸, 2-클로로-2,2-다이페닐아세틸, 2-클로로-2-페닐아세틸, 트리메틸아세틸, 클로로다이플루오로아세틸, 퍼플루오로아세틸, 플루오로아세틸, 브로모다이플루오로아세틸, 메톡시아세틸, 2-티오펜아세틸, 클로로설향염아세틸, 3-메톡시페닐아세틸, 페녹시아세틸, *tert*-부틸아세틸, 트리클로로아세틸, 모노클로로-아세틸, 다이클로로아세틸, 7H-도데카플루오로-헵타노일, 퍼플루오로-헵타노일, 7H-도데카-플루오로헵타노일, 7-클로로도데카플루오로-헵타노일, 7-클로로-도데카플루오로-헵타노일, 7H-도데카플루오로헵타노일, 7H-도데카-플루오로헵타노일, 노나-플루오로-3,6-다이옥사-헵타노일, 노나-플루오로-3,6-다이옥사헵타노일, 퍼플루오로헵타노일, 메톡시벤조일, 메틸 3-아미노-5-페닐티오펜-2-카르복실, 3,6-다이클로로-2-메톡시-벤조일, 4-(1,1,2,2-테트라플루오로-에톡시)-벤조일, 2-브로모-프로피오닐, omega-아미노카프릴, 데카노일, n-펜타데카노일, 스테아릴, 3-사이클로헥틸-프로피오닐, 1-벤젠-카르복실, 0-아세틸만델릴, 피발로일 아세틸, 1-아다만탄-카르복실, 사이클로헥산-카르복실, 2,6-피리딘다이카르복실, 사이클로프로판-카르복실, 사이클로부탄-카르복실, 퍼플루오로사이클로헥실 카르복실, 4-메틸벤조일, 클로로메틸 이속사졸릴 카르보닐, 퍼플루오로사이클로헥실 카르복실, 크로토닐, 1-메틸-1H-인다졸-3-카르보닐, 2-프로페닐, 이소발레릴, 1-피롤리딘카르보닐, 4-페닐벤조일을 포함한다.

[0047]

용어 "아미노산"은 천연 및 합성의, α, β, γ 또는 δ 아미노산을 의미하며, 비제한적인 예로, 단백질에서 발견되는 아미노산, 즉, 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린,

트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르테이트, 글루타메이트, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함한다. 특정 구현예들에서, 아미노산은 L-배위이다. 다른 예로, 아미노산은 알라닌, 발리닌, 루시닌, 이소루시닌, 프롤리닌, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 글리시닌, 세리닌, 트레오닌, 시스테인, 티로시닌, 아스파라기닌, 글루타미닌, 아스파르토일, 글루타로일, 라이시닌, 아르기닌, 히스티딘, β -알라닌, β -발리닌, β -루시닌, β -이소루시닌, β -프롤리닌, β -페닐알라닌, β -트립토판, β -메티오닌, β -글리시닌, β -세리닌, β -트레오닌, β -시스테인, β -티로시닌, β -아스파라기닌, β -글루타미닌, β -아스파르토일, β -글루타로일, β -라이시닌, β -아르기닌 또는 β -히스티딘의 유도체일 수 있다.

[0048] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 호환적으로 사용되며, 아미노산 잔기로 된 폴리머를 지칭한다. 즉, 폴리펩타이드에 대한 설명은 펩타이드에 대한 설명 및 단백질에 대한 설명과 동일하게 적용되며, 그 역도 가능하다. 용어는 천연 아미노산 폴리머 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된 아미노산인 아미노산 폴리머에도 적용된다. 아울러, 상기한 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 전장 단백질 등의 임의 길이의 아미노산 체인을 포함하며, 이 때 아미노산 잔기들은 펩타이드 공유 결합에 의해 결합된다.

[0049] 뉴클레오시드 조성물에 대한 용어 "실질적으로 없는" 또는 "실질적으로 존재하지 않는"은 뉴클레오시드의 지정된 거울상 이성질체를 적어도 85 또는 90 중량%, 특정 구현예에서, 95 중량%, 98 중량%, 99 중량% 또는 100 중량%로 포함하는 뉴클레오시드 조성물을 의미한다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 방법과 화합물에서, 화합물에는 거울상 이성질체가 실질적으로 없다.

[0050] 마찬가지로, 뉴클레오시드 조성물에 대한 용어 "분리된"은 뉴클레오시드를 적어도 85 중량%, 90 중량%, 95 중량%, 98 중량%, 99 중량% - 100 중량%로 포함하며, 잔량으로 다른 화학종 또는 거울상 이성질체를 포함하는, 뉴클레오시드 조성물을 지칭한다.

[0051] "용매화물"은, 비-공유적인 분자간 힘에 의해 화학량론적 함량 또는 비-화학량론적 함량으로 용매가 결합된, 본원에 제공된 화합물 또는 그의 염을 지칭한다. 용매가 물이면, 용매화물은 수화물이다.

[0052] "동위원소 조성"은 소정의 원소에 대해 존재하는 각 동위원소의 양을 지칭하는 것이며, "천연 동위원소 조성"은 소정의 원자에 대한 천연적인 동위원소 조성 또는 존재율 (abundance)을 의미한다. 천연적인 동위원소 조성을 포함하는 원자는 또한 본원에서 "비-농화" 원자로 언급될 수 있다. 명시되지 않은 한, 본원에 언급된 화합물들의 원자는 그 원자의 임의의 안정적인 동위원소를 지칭하는 의미이다. 예를 들어, 언급되지 않은 한, "H" 또는 "수소"와 같이 위치가 구체적으로 명시된 경우에는, 그 위치에서는 수소를 이의 천연적인 동위원소 조성으로 가지는 것으로 이해된다.

[0053] "동위원소 농화"는 원자의 천연적인 동위원소 존재율이 아니라 분자내 소정의 원자 위치에 특정 동위원소가 상당량 결합된 퍼센트를 의미한다. 예를 들어, 소정의 위치에서 1%의 중수소 농화는, 소정의 샘플에서 분자의 1%가 특정 위치에 중수소를 포함하는 것을 의미한다. 중수소의 자연 분포는 약 0.0156%이기 때문에, 비-농화된 출발 물질을 이용하여 합성한 화합물은 임의의 위치에서의 중수소 농화는 약 0.0156%이다. 본원에 제공되는 화합물의 동위원소 농화는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 통상적인 분석 방법, 예컨대 질량 분광측정 및 핵자기 공명 분광측정을 이용하여 측정할 수 있다.

[0054] "동위원소 농화된"은 원자의 천연적인 동위원소 조성이 아닌 동위원소 조성을 가진 원자를 지칭한다. "동위원소 농화된"은 원자의 천연적인 동위원소 조성이 아닌 다른 동위원소 조성을 가진 하나 이상의 원자를 포함하는 화합물도 지칭한다.

[0055] 본원에서, "알킬", "사이클로알킬", "알케닐", "사이클로알케닐", "알키닐", "아릴", "알콕시", "알콕시카르보닐", "아미노", "카르복실", "알킬아미노", "아릴아미노", "티오알킬옥시", "헤테로사이클릴", "헤테로아릴", "알킬헤테로사이클릴", "알킬헤테로아릴", "아실", "아랄킬", "알크아릴", "퓨린 (purine)", "피리미딘", "카르복실" 및 "아미노산" 기들은 선택적으로, 수소 원자가 존재하는 하나 이상의 위치에 천연적인 동위원소 조성을 벗어난 중수소 조성으로 중수소를 포함한다.

[0056] 또한, 본원에서, "알킬", "사이클로알킬", "알케닐", "사이클로알케닐", "알키닐", "아릴", "알콕시", "알콕시카르보닐", "카르복실", "알킬아미노", "아릴아미노", "티오알킬옥시", "헤테로사이클릴", "헤테로아릴", "알킬헤테로사이클릴", "알킬헤테로아릴", "아실", "아랄킬", "알크아릴", "퓨린", "피리미딘", "카르복실" 및 "아미노산" 기들은 선택적으로 천연적인 동위원소 조성을 벗어난 다른 조성으로 탄소-13을 포함한다.

- [0057] 본원에서, EC_{50} 은 특정 시험 화합물에 의해 유도, 유발 또는 강화되는 특정 반응의 최대 발현의 50%에 해당되는 용량-의존적인 반응을 일으키는 특정 시험 화합물의 용량, 농도 또는 함량을 의미한다.
- [0058] 본원에서, IC_{50} 은 상기한 반응을 측정하는 분석에서 최대 반응의 50% 저해를 달성하는 특정 시험 화합물의 함량, 농도 또는 용량을 의미한다.
- [0059] 용어 "숙주"는, 본원에서, 세포 계통 및 동물 등의, 바이러스가 복제할 수 있는 단세포성 또는 다세포성의 모든 유기체를 의미하며, 특정 구현예들에서, 인간을 의미한다. 다른 예로, 숙주는 바이러스 게놈의 복제 또는 기능을 본원에 기술된 화합물 및 조성물에 의해 변형시킬 수 있는, 바이러스 게놈의 일부를 옮길 수 있다. 용어 숙주는 구체적으로 감염된 세포, 바이러스 게놈 전체 또는 일부로 형질감염된 세포 및 동물, 특히 영장류 (침팬지 포함) 및 인간을 포함한다. 대부분의 동물 용도에서는 숙주가 인간 환자이다. 그러나 특정 증상에 대한 수의 학적인 용도 역시 본원의 내용에 명확하게 포함된다 (예, 침팬지).
- [0060] 본원에서, 용어 "개체" 및 "환자"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 용어 "개체" 및 "개체들"은 영장류를 제외한 포유류 (예, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 랫 및 마우스) 및 영장류 (예, 시노몰구스 원숭이 등의 원숭이, 침팬지 및 인간) 등의 포유류와 같은 동물을 지칭하며, 예로 인간을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 개체는 C형 간염 바이러스 감염에 대한 현행 치료법에 난치성이거나 불응성인 개체이다. 다른 구현예에서, 개체는 농동 동물 (예, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완동물 (예, 개 또는 고양이)이다. 특정 구현예들에서, 개체는 인간이다.
- [0061] 본원에서, 용어 "치료제" 및 "치료제들"은 장애나 이의 한가지 이상의 증상을 치료 또는 예방하는데 사용할 수 있는 모든 물질(들)을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 용어 "치료제"는 본원에 제시된 화합물을 포함한다. 특정 구현예들에서, 치료제는 장애 또는 이의 한가지 이상의 증상을 치료 또는 예방하는데 유용한 것으로 알려져 있거나, 또는 사용된 적 있거나, 또는 현재 사용 중인 물질이다.
- [0062] "치료학적인 유효량"은 질환을 치료하기 위해 개체에게 투여하였을 때, 그 질환에 대한 치료를 달성하는데 충분한 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. "치료학적인 유효량"은 특히 화합물, 질환 및 질환의 중증도, 및 치료받는 개체의 나이, 체중 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0063] 임의의 질환 또는 장애를 "치료하는" 또는 "치료"는, 특정 구현예에서, 개체에 존재하는 질환 또는 장애의 완화를 의미한다. 다른 구현예에서, "치료하는" 또는 "치료"는 개체별로 인식하기 어려울 수 있는 하나 이상의 신체 파라미터의 완화를 포함한다. 또 다른 예로, "치료하는" 또는 "치료"는 신체적으로 (예, 인식할 수 있는 증상의 안정화) 또는 생리적으로 (예, 신체 파라미터의 안정화) 또는 이들 2가지 측면에서 질환 또는 장애를 조절하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애의 발병 지연을 포함한다.
- [0064] 본원에서, 용어 "예방제" 및 "예방제들"은 장애나 이의 한가지 이상의 증상을 예방하는데 사용할 수 있는 모든 물질(들)을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 용어 "예방제"는 본원에 제시된 화합물을 포함한다. 특정 구현예들에서, 예방제는 장애의 발병, 전개, 진전 및/또는 중증도를 예방 또는 방해하는데 유용한 것으로 알려져 있거나, 또는 사용된 적 있거나, 또는 현재 사용 중인 물질이다.
- [0065] 본원에서, 표현 "예방학적인 유효량"은 장애와 관련된 한가지 이상의 증상의 전개, 재발 또는 발병의 예방 또는 감퇴를 달성하는데 (또는 다른 요법제 (예, 다른 예방제)의 예방학적인 효과(들)를 강화 또는 향상시키는데) 충분한 요법제 (예, 예방제)의 양을 지칭한다. "치료학적인 유효량"은 특히 화합물, 질환 및 질환의 중증도, 및 치료받는 개체의 나이, 체중 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0066] 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 조성물과 관련하여, 용어 "실질적으로 순수한"은, 변형된 아미노산 잔기가 조성물의 나머지 부분에 대해 적어도 80, 85, 90 또는 95 중량% 이상인, 또는 특정 구현예에서, 95, 98, 99 또는 100 중량%, 예로 건조 중량%인 조성물을 지칭한다. 중량%는 조성물내 변형된 아미노산 잔기들의 총량에 상대적이거나 또는 조성물내 단백질 총량에 대해 상대적일 수 있다. 순도는 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 방법으로 측정할 수 있다.
- [0067] 용어 "항체"는 당해 기술 분야의 당업자들이 항체로서 인지하는 임의의 거대분자를 지칭한다. 항체는 당해 기술 분야의 당업자들에 의해 인지되는 임의의 면역글로불린 유전자에 의해 코딩될 수 있는 폴리펩타이드와 실질적으로 상동한 하나 이상의 폴리펩타이드 체인과의 결합성 등의 공통된 특성을 공유한다. 면역글로불린 유전자로는, 비제한적으로, κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), δ , ϵ 및 μ 불변부 유전자 뿐만 아니라 면역글로불린 가변부 유전자를 포함한다. 이 용어는 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 전장 항체와 항체 단편을 포함하며, 이의 변이체도 포함한다.

- [0068] 용어 "항체 단편"은 항체가 전장 형태가 이외의 모든 형태를 지칭한다. 본원에서 항체 단편은 전장 항체에 존재하는 보다 작은 구성의 항체 및 조각된 항체를 포괄한다. 항체 단편은, 비제한적으로, Fv, Fc, Fab 및 (Fab')₂, 단쇄 Fv (scFv), 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 2 관능성 하이브리드 항체, CDR1, CDR2, CDR3, CDR들의 조합체, 가변부, 프레임워크 영역, 불변부 등을 포함한다 (Maynard & Georgiou, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-76; Hudson, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:395-402).
- [0069] 용어 "면역글로불린 (Ig)"은 하나의 면역글로불린 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성된 단백질 또는 아미노산 서열이 실질적으로 상동한 단백질을 지칭한다. 면역글로불린은, 비제한적으로, 항체를 포함한다. 면역글로불린은 다양한 구조적인 형태를 취할 수 있으며, 비제한적인 예로, 전장 항체, 항체 단편, 및 개별 면역글로불린 도메인, 예컨대 비제한적인 예로, V_H, C_H1, C_H2, C_H3, V_L 및 C_L을 포함한다.
- [0070] 용어 "면역글로불린 (Ig) 도메인"은 면역글로불린 유전자에 의해 실질적으로 코딩된 폴리펩타이드로 구성된 단백질 도메인을 의미한다. Ig 도메인은, 비제한적으로, V_H, C_H1, C_H2, C_H3, V_L 및 C_L을 포함한다.
- [0071] 항체의 "가변부"라는 용어는 V_H 면역글로불린 도메인, V_L 면역글로불린 도메인, 또는 V_H 및 V_L 면역글로불린 도메인으로 구성된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 가변부는 이를 지칭하거나, 또는 Fv 단편으로서, scFv 단편으로서, 큰 항체 단편내 이러한 영역으로서, 또는 전장 항체 또는 다른 예로 비-항체 스캐폴드 분자에서의 이러한 영역으로서, 분리된 상기한 폴리펩타이드를 지칭하는 것일 수 있다.
- [0072] 용어 "가변성"은 가변성 도메인의 특정 부분이 항체들 간에 서열상 상당히 상이하며, 특정 항원에 대한 각 특이 항원의 결합 특이성을 담당하는 것을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변성 도메인 전체에 균등하게 분포되어 있는 것이 아니다. 경쇄 가변성 도메인과 중쇄 가변성 도메인 둘다에 상보성 결정부 (CDR)이라고 하는 세 그먼트가 3개 몰려 있다. 가변성 도메인의 고도로 보존된 영역을 프레임워크 영역 (FR)이라고 한다. 천연 중쇄와 경쇄의 가변성 도메인들은 각각 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이들 FR 영역들은 루프 커넥팅을 형성하거나 또는 일부 경우에는 β-시트 구조의 일부를 형성하는 3 또는 4개의 CDR에 의해 연결되어 대체적으로 β-시트 배위를 형성한다. 각 체인에서 CDR들은 모두 FR 영역에 매우 근접하게 위치되어 있으며, 다른 쪽 체인의 CDR들과 더불어, 항체의 항원 결합부를 형성하는 역할을 한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).
- [0073] 불변 도메인은 전형적으로는 항원과 항체 결합에 직접 관여하진 않지만, 다양한 작동자 기능을 나타낸다. 이의 중쇄의 불변부의 아미노산 서열에 따라, 항체 또는 면역글로불린은 여러 클래스로 분류될 수 있다. 면역글로불린의 주 유형은 5가지이며: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 이들 중 몇몇은 다시 아종 (이소타입)으로, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 분류된다. 다른 유형의 면역글로불린에 해당되는 중쇄 불변부는 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다. 다양한 인간 면역글로불린 유형들 중에서도, 오직 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgM만 보체를 활성화하는 것으로 알려져 있다.
- [0074] 용어 "접합체 (conjugate)"는 본원에 기술된 변형된 아미노산 잔기에 연결될 수 있는 모든 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "접합체"와 "페이로드"는 상호 호환적으로 사용된다. 접합체는 소분자 또는 거대분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체는, 비제한적인 예로, 단백질, 펩타이드, 활성 핵산 또는 이들의 하이브리드 등의 생활성 분자이다. 일부 구현예에서, 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리머이다. 일부 구현예에서, 접합체는 시판 약물 등의 치료제이다. 일부 구현예에서, 접합체는, 타겟 세포에 유해한 분자 페이로드와 같이, 특정 타겟을 인지하여 결합할 수 있는 표지물질 또는 검출 또는 진단에 유용한 표지물질이다. 일부 구현예에서, 접합체는 변형된 아미노산 잔기에 링커를 통해 결합된다. 일부 구현예에서, 접합체는 변형된 아미노산 잔기에 링커없이 직접 연결된다.
- [0075] 용어 "변이체 단백질 서열"은 다른 유사 단백질 서열과 아미노산 동일성에 차이가 있는 하나 이상의 잔기를 가진 단백질 서열을 의미한다. 상기 유사 단백질 서열은 천연 야생형 단백질 서열 또는 야생형 서열의 다른 변이체일 수 있다. 변이체는 하나 이상의 아미노산의 삽입, 결손 또는 치환을 가진 단백질을 포함한다. 또한, 변이체는 번역후 변형되는 아미노산을 하나 이상 가진 단백질을 포함한다.
- [0076] 용어 "모 항체"는 본원에 제공된 개시내용에 따라 변형된 당해 기술 분야의 당업자들에게 알려져 있는 항체를 지칭한다. 변형은 물리적일 수 있으며, 즉 본원의 범위내에서 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 화학적 또는 생화학적으로 치환하거나 변형시켜 항체를 수득하는 것일 수 있다. 변형은 또한 개념적인 것일 수 있으며, 즉,

모 항체의 하나 이상의 폴리펩타이드 체인의 서열을 이용하여, 본원에 따른 하나 이상의 부위-특이 변형된 아미노산을 포함하는 항체를 설계하는 것일 수 있다. 모 항체는 천연 항체 또는 실험실에서 설계 또는 개발된 항체일 수 있다. 모 항체는 또한 인공 항체 또는 조작된 항체, 예컨대 키메라 항체 또는 인간화된 항체일 수 있다.

[0077] 용어 "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 서열의 보존적인 치환으로 인해 해당 단백질과 차이가 있는 단백질을 지칭한다. 당업자라면, 코딩 서열의 아미노산 하나 또는 소규모의 아미노산들을 변형, 부가 또는 결손시키는, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개개 치환, 결손 또는 부가가, 이러한 변형을 통해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환되는 경우에는, "보존적으로 변형된 변이체"이라는 것을 알 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산들을 표시한 보존적인 치환 표는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 다형성 변이체, 중간 상동체 (interspecies homolog) 및 대립유전자 (allele)를 포함하며, 이를 배제하지 않는다.

[0078] 아래 8가지의 그룹들은 각각 서로 보존적인 치환인 아미노산으로 구성된다:

[0079] 1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0080] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0081] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0082] 4) 아르기닌 (R), 라이신 (K);

[0083] 5) 이소루신 (I), 루신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);

[0084] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);

[0085] 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및

[0086] 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M).

[0087] 예로, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)을 참조한다.

[0088] 2 이상의 폴리펩타이드 서열에서, 용어 "동일한" 또는 "동일성 (identity)"은, 서로 동일한 2 이상의 서열 또는 서브 서열을 의미한다. 다음과 같은 한가지 서열 비교 알고리즘 또는 매뉴얼 정렬 및 육안 검사에 의해 서열을 이용하여 측정하는 바와 같이, 서열을 비교 윈도우나 또는 지정된 영역에서 최대로 대응되게 정렬하여 비교하였을 때, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 퍼센트 (즉, 특정 영역에서 약 60%의 동일성, 선택적으로 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%의 동일성)를 가진다면, 이들 서열은 "실질적으로 동일한" 것이다. 동일성은, 아미노산 또는 뉴클레오타이드 적어도 약 50개 길이인 영역, 또는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 75-100개 길이인 영역, 또는 명시되지 않은 경우에는 서열 또는 폴리펩타이드 전 영역에 대해 존재할 수 있다. 항체의 경우, 동일성은 가변성 CDR 이외의 영역에서 측정할 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 비제한적인 예로, Smith 및 Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c의 로컬 상동성 알고리즘, Needleman 및 Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson 및 Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444의 유사성 검색법, 이들 알고리즘의 전산 이행 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)에 의해; 또는 매뉴얼 정렬 및 육안 검사 (예, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement))에 의해 수행할 수 있다.

[0089] 서열 동일성 %와 서열 유사성 %를 결정하는데 적합한 알고리즘의 예로는 BLAST 알고리즘과 BLAST 2.0 알고리즘을 포함하며, 이들은 각각 Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 및 Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 국립 생물공학 정보센터를 통해 공개적으로 이용가능하다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 감도 (sensitivity)와 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열의 경우)은 디폴트로서 글자 크기 (W) = 11, 기대 (E) = 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 글자 크기 = 3, 기대 (E) = 10을 사용하고, BLOSUM62 스코어링 매트릭스 (Henikoff 및 Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 참조)는 정렬 (B) = 50, 기대 (E) = 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥 비교를 사용한다. BLAST 알고리즘은 전형적으로 "저 복잡성" 필터를 끄고 수행한다. 일부 구현예에서, BLAST 알고리즘은 전형적으로 "저 복잡성" 필터를 동작시켜 수행한다.

[0090] 또한, BLAST 알고리즘은 2개의 서열간의 유사성을 통계학적으로 분석한다 (예, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성 척도는 최소 총합 확률 (smallest sum probability) (P(N))이며, 이는 2종의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 간에 일치되는 경우의 수로서 확률을 나타낸 것이다. 예를 들어, 기준 핵산에 대해 테스트 핵산을 비교하였을 때 최소 총합 확률이 약 0.2 미만, 더 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이라면, 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다.

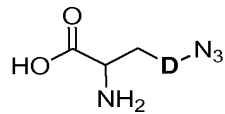
[0091] 용어 "아미노산"은 천연 아미노산 및 비-천연 아미노산 뿐 아니라, 프롤린과 같은 아미노산, 아미노산 유사체 및 천연 아미노산과 비슷한 방식으로 기능하는 아미노산 모방체를 지칭한다.

[0092] 천연 코딩 아미노산은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 단백질을 형성하는 아미노산 (proteinogenic amino acid)이다. 이들은 아미노산 20종 (알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린)과, 빈도가 낮은 피롤라이신 및 셀레노시스테인을 포함한다. 천연 코딩 아미노산은, 프레닐화된 아미노산, 이소프레닐화된 아미노산, 미리소일화된 아미노산, 팔미토일화된 아미노산, N-연결된 당화된 아미노산, D-연결된 당화된 아미노산, 인산화된 아미노산 및 아실화된 아미노산 등의, 22종의 천연 아미노산에 대한 번역후 변이체들을 포괄한다.

[0093] 용어 "변형된 아미노산"은 단백질을 형성하는 아미노산이 아닌 아미노산, 또는 이의 번역 후 변형된 변이체를 지칭한다. 특히, 이 용어는 20종의 일반 아미노산, 피롤라이신 또는 셀레노시스테인에 속하지 않는 아미노산이거나, 또는 이의 번역후 변형된 변이체를 지칭한다.

[0094] 화합물들

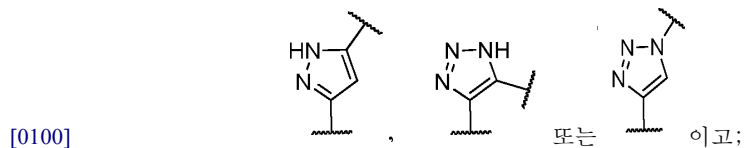
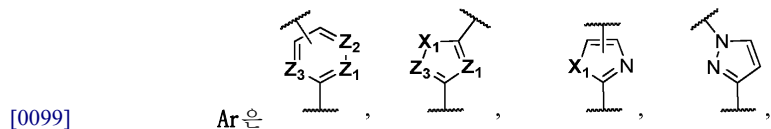
[0095] 본 발명의 식 I에 따른 화합물 또는 그의 염을 제공한다:



[0096] 식 I;

[0097]

[0098] 상기 식에서: D는 $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ 또는 $-\text{W}_1-\text{Y}_1-\text{C}(\text{O})-\text{Y}_2-\text{W}_2-$ 이고;



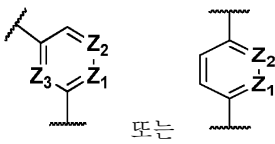
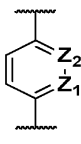
[0101] 각각의 W_1 , W_2 및 W_3 는 독립적으로 단일 결합 또는 저급 알킬렌이고; 각각의 X_1 은 독립적으로 $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, 또는 $-\text{S}-$ 이고;

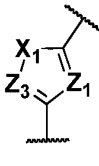
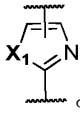
[0102] 각각의 Y_1 은 독립적으로 단일 결합, $-\text{NH}-$, 또는 $-\text{O}-$ 이고;

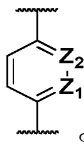
[0103] 각각의 Y_2 는 독립적으로 단일 결합, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, N-연결된 피롤리딘렌 또는 C-연결된 피롤리딘렌이고; 및

[0104] Z_1 , Z_2 , 및 Z_3 중 하나는 $-\text{N}-$ 이고, Z_1 , Z_2 , 및 Z_3 중 나머지는 독립적으로 $-\text{CH}-$ 이다.

[0105] 일 구현예에서, D는 $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ 이고; Ar 및 W_3 는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다. 특정 구현예에서, D는

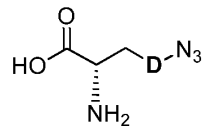
 $-Ar-W_3-$ 이고, Ar은  이고; Ar, Z₁, Z₂, Z₃ 및 W₃는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된

다. 특정 구현예들에서, D는 $-Ar-W_3-$ 이고; Ar은  또는  이고; Ar, Z₁, Z₃, X₁ 및 W₃는 식 I에

서 정의된 바와 같이 정의된다. 특정 구현예들에서, D는 $-Ar-W_3-$ 이고; W₃는 $-CH_2-$ 이고; Ar은  이고, Z₁ 및 Z₂는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다.

[0106] 일 구현예에서, D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고; W₁, W₂, Y₁ 및 Y₂는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다. 특정 구현예에서, D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고; 각각의 Y₁은 독립적으로 $-NH-$ 또는 $-O-$ 이고; W₁, W₂ 및 Y₂는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다. 특정 구현예들에서, D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고; 각각의 Y₂는 독립적으로 N-연결된 또는 C-연결된 피롤리디닐렌이고; 각각의 W₂는 단일 결합이고; W₁ 및 Y₁은 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다. 특정 구현예에서, D는 $-W_1-Y_1-C(O)-Y_2-W_2-$ 이고; 각각의 Y₂는 독립적으로 단일 결합, $-NH-$ 또는 $-O-$ 이고; 및 각각의 W₂는 저급 알킬렌이고; W₁ 및 Y₁은 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다.

[0107] 일 구현예에서, 식 Ia에 따른 화합물이 제공된다:



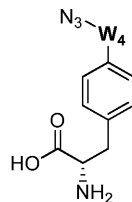
[0108]

[0109] 식 Ia

[0110] 상기 식에서, D는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다.

[0111] 일 구현예에서, 각각의 W₂ 및 W₃가 독립적으로 C₁-C₃ 알킬렌인 식 I 및 식 Ia 중 어느 하나의 화합물이 제공된다. 다른 구현예에서, 각각의 W₂ 및 W₃가 독립적으로 C₁-C₂ 알킬렌인 식 I 및 식 Ia 중 어느 하나의 화합물이 제공된다.

[0112] 일 구현예에서, 식 II에 따른 화합물 또는 그의 염이 제공된다:

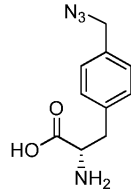


[0113]

[0114] 식 II

[0115] 상기 식에서, W₄는 C₁-C₁₀ 알킬렌이다. 다른 구현예에서, W₄는 C₁-C₅ 알킬렌이다. 일 구현예에서, W₄는 C₁-C₃ 알킬렌이다. 일 구현예에서, W₄는 C₁ 알킬렌이다.

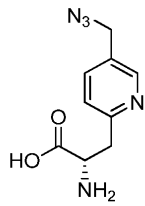
[0116] 일 구현예에서, 식 30에 따른 화합물 또는 그의 염이 제공된다:



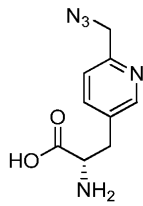
[0117]

[0118] (30).

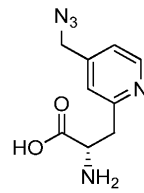
[0119] 일 구현예에서, 식 1-29 및 40 중 임의의 식에 따른 화합물 또는 그의 염이 제공된다:



(1)

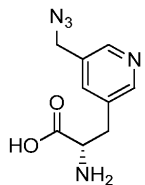


(2)

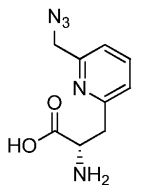


(3)

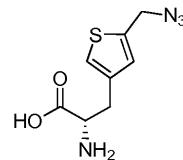
[0120]



(4)

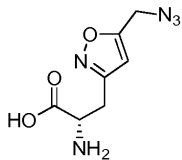


(5)

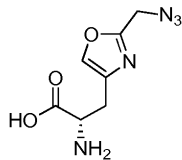


(6)

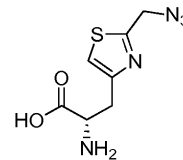
[0121]



(7)

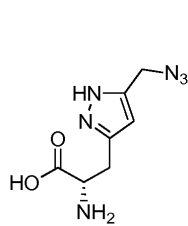


(8)

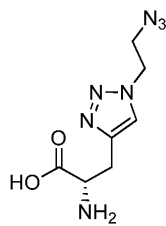


(9)

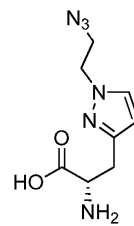
[0122]



(10)

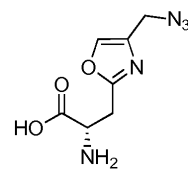


(11)

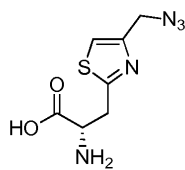


(12)

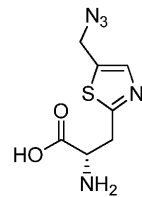
[0123]



(13)

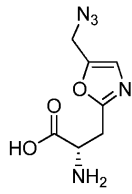


(14)

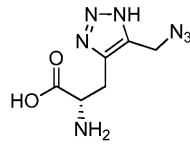


(15)

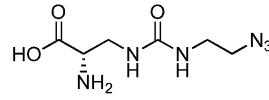
[0124]



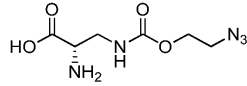
(16)



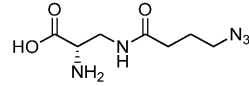
(17)



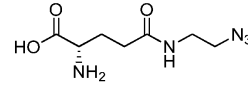
(18)



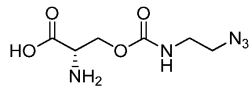
(19)



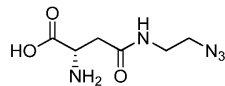
(20)



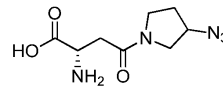
(21)



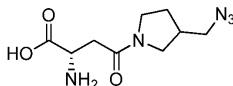
(22)



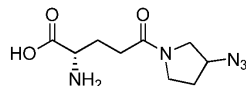
(23)



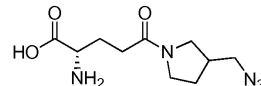
(24)



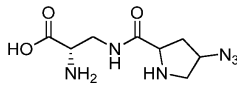
(25)



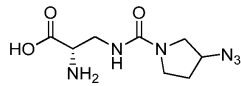
(26)



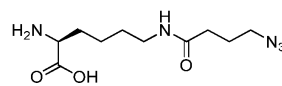
(27)



(28)



(29)



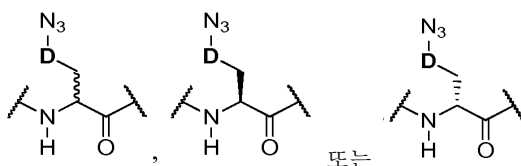
(40);

일 구현예에서, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드가 제공된다. 일 구현예에서, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드와 이에 연결된 페이로드를 포함하는 접합체가 제공되며, 선택적으로는 상기 폴리펩타이드와 페이로드 사이에 연결 모이어티를 포함하는, 접합체가 제공된다.

일 구현예에서, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 항체가 제공된다. 일 구현예에서, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기와 이에 연결된 페이로드를 포함하는 항체를 포함하는 접합체가 제공되며, 선택적으로 상기 항체와 페이로드 사이에 연결 모이어티를 포함하는, 접합체가 제공된다.

일 구현예에서, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기로 아미노아실화된 오르소고날 tRNA가 제공된다. 관련 구현예에서, 아미노산 잔기를 폴리펩타이드로 조립하는데 적합한 조건 하에 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기로 아미노아실화된 오르소고날 tRNA를 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 폴리펩타이드의 제조 방법이 제공된다. 일 측면에서, 오르소고날 tRNA는 정상적으로는 아미노산과 연관성없는 코돈과 염기 쌍을 형성하게 된다. 다른 측면에서, 접촉 단계는, 오르소고날 tRNA를 식 I의 화합물, Ia, II, 1-30 또는 40으로 아미노아실화할 수 있는 tRNA 신테타제를 포함하는 반응 혼합물에서 이루어진다.

특정 구현예들에서, 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드는 D가 식 I에 따라 정의되는 하기 식들 중 임의의 식으로 제시된다:



당해 기술 분야의 당업자라면, 단백질이 일반적으로 L-아미노산으로 구성되어 있다는 것을 알 것이다. 그러나,

본 발명의 방법 및 조성물은, 변형된 아미노산을 이용하므로써, 실무자가 L-, D- 또는 라세믹 변형된 아미노산을 이용할 수 있도록 해준다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 변형된 아미노산은 천연 아미노산의 D-버전과 천연 아미노산의 라세믹 버전을 포함한다.

[0136]

휘스켄 고리부가 반응

[0137]

유익하게는, 본원에 기술된, 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40 중 임의의 식에 따른 화합물과 같이, 아지도 기를 포함하는 변형된 아미노산과 이를 포함하는 폴리펩타이드는, 알킨 기를 포함하는 제2의 화합물과의 선택적이고 효율적인 반응을 촉진한다. 아지도 기와 알킨 기는 1,3-이극성 고리부가 반응으로 반응하여, 제2의 화합물을 변형된 아미노산 (또는 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드)과 연결하는, 1,2,3-트리아졸릴렌 모이어티를 형성하게 된다. 아지도와 알킨 간에 트리아졸을 형성하는 이러한 반응은 일반적으로 당해 기술 분야의 당업자들에게는 휘스켄 고리부가 반응으로 알려져 있다.

[0138]

아지도 관능기와 알킨 관능기의 독특한 반응성은 폴리펩타이드 및 기타 생물 분자들을 선택적으로 변형시키는데 매우 유용하다. 유기 아지도, 특히 지방족 아지도와 알킨은 일반적으로 혼한 반응성 화학 조건에서 안정적이다. 특히, 아지도 관능기와 알킨 관능기 둘다 천연 폴리펩타이드에서 확인되는 20종의 일반적인 아미노산의 측쇄 (즉, R기)에 대해 불활성이다. 그러나, 매우 근접하게 두었을 때에는, 아지도 기와 알킨 기의 "스프링-부하 (spring-loaded)" 특성이 분출되어, 이들은 휘스켄 [3+2] 고리부가 반응을 통해 선택적이고 효율적으로 반응하여, 대응되는 트리아졸이 된다. 예로, Chin J., et al., Science 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)을 참조한다.

[0139]

휘스켄 고리부가 반응은 친핵성 치환이 아닌 선택적인 고리부가 반응을 수반하기 때문에 (Padwa, A., in COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in 1,3-DIPOLAR CYCLADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176), 아지도 및 알킨-함유 측쇄를 보유한 비-천연 코딩 아미노산이 병합되면, 제조된 폴리펩타이드는 비-천연 코딩 아미노산 위치에서 선택적인 변형이 가능해진다. 아지도 또는 알킨-함유 화합물이 참여하는 고리부가 반응은 Cu(II)를 Cu(I)로 환원하는 환원제의 존재 하에 촉매량의 Cu(II) (비제한적인 예로, 촉매량의 CuSO_4 형태)를 인 시추 첨가함으로써, 실온 및 수계 조건에서 수행할 수 있다. 예로, Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)를 참조한다. 환원제의 예로는, 비제한적인 예로, 아스코르베이트, 금속 구리, 퀴닌, 하이드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe^{2+} , Co^{2+} , 및 전기 전위 인가를 포함한다.

[0140]

폴리펩타이드

[0141]

본 발명은 하나 이상의 폴리펩타이드 체인에서 아미노산 서열에 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 부위-특이적인 위치에 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 일 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 폴리펩타이드 체인에서 아미노산 서열에 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 부위-특이적인 위치로 포함하는 항체이다.

[0142]

폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 임의 폴리펩타이드, 즉 모 폴리펩타이드와 높은 서열 동일성을 공유할 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드의 아미노산 서열은, 부위-특이적인 위치에 존재하는 변형된 아미노산을 제외하고는, 모 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 동일하다. 다른 구현예에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는, 부위-특이적인 위치에 존재하는 하나 이상의 변형된 아미노산 이외에도, 모 폴리펩타이드에 비해 하나 이상의 삽입, 결손 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자가 폴리펩타이드로 인지하는 한 고유한 일차 서열을 가질 수 있다. 이러한 구현예에 따른 일 측면에서, 상기 폴리펩타이드는 항체이다.

[0143]

본원에 기술된 조성물 및 방법은 하나 이상의 변형된 아미노산을 폴리펩타이드로 병합하기 위해 제공된다. 변형된 아미노산 서열은 폴리펩타이드의 임의 말단 위치 또는 임의 내부 위치를 비롯하여 폴리펩타이드의 임의 위치에 존재할 수 있다. 바람직하게는, 변형된 아미노산을 폴리펩타이드에 병합하고자하는 목적 중 하나가 활성 및/또는 3차 구조의 파괴가 아닌 한, 변형된 아미노산은 상동적인 천연 아미노산 폴리펩타이드와 비교해 폴리펩타이드의 활성 및/또는 3차 구조를 파괴하지 않는다. 아울러, 변형된 아미노산의 폴리펩타이드로의 병합은 폴리펩타이드의 활성 (예, 폴리펩타이드의 치료학적 효능 조작, 폴리펩타이드의 안전성 프로파일 개선, 폴리펩타이드의 약동성, 약리성 및/또는 약력성 조절 (예, 수용해성 증가, 생체이용성 증가, 혈청내 반감기 증가, 치료학적 반감기 증가, 면역원성 조절, 생물 활성 조절 또는 순화 시간 연장), 폴리펩타이드에 추가적인 기능 제공,

폴리펩타이드로의 테그, 표지물질 또는 검출가능한 신호의 병합, 폴리펩타이드의 분리 특성 용이화, 및 전술한 변형들의 임의 조합) 및/또는 3차 구조를, 상동적인 천연 아미노산 폴리펩타이드와 비교해 어느 정도 변형시킬 수 있지만, 활성 및/또는 3차 구조를 완전히 파괴시키진 않는다. 이러한 활성 및/또는 3차 구조의 변형은, 변형된 아미노산의 폴리펩타이드로의 병합이 또한 상동적인 천연 아미노산 폴리펩타이드와 비교해 폴리펩타이드의 활성 및/또는 3차 구조에 거의 영향을 미치지 않을 수 있지만, 대개는 이런 병합을 실시하는 목적 중 하나이다. 따라서, 변형된 아미노산 폴리펩타이드, 변형된 아미노산 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 상기한 폴리펩타이드와 폴리펩타이드 조성물의 제조 방법, 상기한 폴리펩타이드와 폴리펩타이드 조성물의 정제, 분리 및 특정화 방법, 및 상기한 폴리펩타이드와 폴리펩타이드 조성물의 이용 방법은 본원의 범위내에서 고려된다. 나아가, 본원에 기술된 변형된 아미노산 폴리펩타이드는 또한 다른 폴리펩타이드 (예, 변형된 아미노산 폴리펩타이드 또는 천연 아미노산 폴리펩타이드)와 연결될 수도 있다.

[0144]

본원에 기술된 방법, 조성물, 전략 및 기법은 폴리펩타이드 또는 단백질의 특정 타입, 클래스 또는 패밀리로 한정되지 않는다. 실제, 사실상 임의의 폴리펩타이드는 본원에 기술된 하나 이상의 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 오직 예로서, 폴리펩타이드는 α -1 항트립신, 안지오스타틴, 항용혈성 인자 (antihemolytic factor), 항체, 아포지단백질, 아포단백질, 심방 나트륨이뇨 인자 (atrial natriuretic factor), 심방 나트륨이뇨 폴리펩타이드, 심방 펩타이드, C-X-C 케모카인, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, 칼시토닌 (calcitonin), c-kit 리간드, 사이토카인, CC 케모카인, 단핵세포 주화성 단백질-1, 단핵세포 주화성 단백질-2, 단핵세포 주화성 단백질-3, 단핵세포 염증성 단백질-1 α , 단핵세포 염증성 단백질-1 β , RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, CD40 리간드, c-kit 리간드, 콜라겐, 콜로니 자극 인자 (CSF), 보체 인자 (complement factor) 5a, 보체 저해제, 보체 수용체 1, 사이토카인, 상피 호중구 활성화 펩타이드-78, MIP-16, MCP-1, 상피 성장 인자 (EGF), 상피 호중구 활성화 펩타이드, 에리트로포이에틴 (EPO), 박리 독소 (exfoliating toxin), Factor IX, Factor VII, Factor VIII, Factor X, 섬유모세포 성장인자 (FGF), 피브리노겐, 피브로넥틴, 4중 나선 번들 단백질, G-CSF, glp-1, GM-CSF, 글루코세레브로시다제 (glucocerebrosidase), 고나도트로핀, 성장인자, 성장인자 수용체, grf, hedgehog 단백질, 헤모글로빈, 간세포 성장인자 (hGF), 히루딘 (hirudin), 인간 성장 호르몬 (hGH), 인간 혈청 알부민, ICAM-1, ICAM-1 수용체, LFA-1, LFA-1 수용체, 인슐린, 인슐린-유사 성장인자 (IGF), IGF-I, IGF-II, 인터페론 (IFN), IFN- α , IFN- β , IFN-gamma, 인터루킨 (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, 각질 형성 세포 성장인자 (KGF), 락토페린 (lactoferrin), 백혈병 저해 인자, 루시퍼라제, 뉴르투린 (neurturin), 호중구 저해 인자 (NIF), 온코스타틴 (oncostatin) M, 골형성 단백질, 온코진 산물 (oncogene product), 파라시토닌 (paracitonin), 부갑상선 호르몬, PD-ECSF, PDGF, 펩타이드 호르몬, 플레이오토로핀 (pleiotropin), 단백질 A, 단백질 G, pth, 발열성 외독소 A (pyrogenic exotoxin A), 발열성 외독소 B, 발열성 외독소 C, pyy, 렐락신 (relaxin), 레닌 (renin), SCF, 소형 생합성 단백질, 가용성 보체 수용체 I, 가용성 ICAM 1, 가용성 인터루킨 수용체, 가용성 TNF 수용체, 소마토메딘 (somatomedin), 소마토스타틴 (somatostatin), 소마토포로핀 (somatotropin), 스트렙토키나제, 슈퍼항원, 스타필로코커스 장독소 (staphylococcal enterotoxin), SEA, SEB, SECT, SEC2, SEC3, SED, SEE, 스테로이드 호르몬 수용체, 수퍼옥사이드 디스무타제, 독성 쇼크 증후군 독소 (toxic shock syndrome toxin), 티모신 (thymosin) α 1, 조직 플라즈미노겐 활성화자 (조직 플라즈미노겐 활성화인자), 종양 성장인자 (TGF), 종양 괴사 인자, 종양 괴사 인자 α , 종양 괴사 인자 β , 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR), VLA-4 단백질, VCAM-1 단백질, 혈관 내피 성장인자 (VEGF), 우로키나제, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 테스토스테론 수용체, 알도스테론 수용체, LDL 수용체 및 코르티코스테론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료 단백질과 상동할 수 있다. 이와 관련된 또는 추가적인 구현예에서, 변형된 아미노산 폴리펩타이드는 성장 호르몬 슈퍼유전자 패밀리에 속하는 임의의 폴리펩타이드 구성원과 상동적일 수 있다.

[0145]

특정 구현예들에서, 변형된 아미노산은 폴리펩타이드내 임의 위치 - N-말단, C-말단 또는 폴리펩타이드 내부 - 에 위치할 수 있다. 유익한 구현예에서, 변형된 아미노산의 폴리펩타이드내 선택된 위치에 위치한다. 이들 위치는 변형된 아미노산으로의 치환에 최적의 부위인 것으로 동정된 것이다. 각 부위는, 최적의 구조, 기능 및/또는 폴리펩타이드 제조 방법으로, 변형된 아미노산을 보유할 수 있다.

[0146]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 안정적인 폴리펩타이드를 제공해준다. 안정성은 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 임의의 기법으로 측정할 수 있다.

[0147]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는, 최적의 기능적인 특성을 가진 폴리펩타이드를 제공해준다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 이의 타겟에 대

한 결합 친화성의 소실을 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 강화된 결합성을 나타낼 수 있다. 이러한 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이고, 타겟은 항원이다.

[0148]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는, 유용하게 제조될 수 있는, 폴리펩타이드를 제공해준다. 예를 들어, 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 본원에 논의된 합성 방법에서 유리한 특성을 나타낸다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 위치에 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 생산 수율의 감소를 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 생산 수율 강화를 나타낼 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 본원에 기술된 tRNA 억제 약화를 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 본원에 기술된 tRNA 억제의 강화를 나타낼 수 있다. 이런 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0149]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 유리한 용해성을 가진 폴리펩타이드를 제공해준다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 용해성 감소를 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 강화된 용해성을 나타낼 수 있다. 이러한 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0150]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 발현에 유리한 폴리펩타이드를 제공해준다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 발현 감소를 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 발현 강화를 나타낼 수 있다. 이러한 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0151]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 폴딩 (folding)에 유리한 폴리펩타이드를 제공해준다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 적정 폴딩의 저하를 거의 또는 전혀 나타내지 않을 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 부위-특이적인 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해 강화된 폴딩을 나타낼 수 있다. 이러한 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0152]

특정 구현예들에서, 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 접합하는데 유리할 수 있는 폴리펩타이드를 제공해준다. 본원에 기술된 바와 같이, 수종의 변형된 아미노산들은 직접 또는 링커를 통한 폴리펩타이드의 제2 제제와의 접합을 용이하게 하는 측쇄 또는 관능기를 가지고 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 다른 위치에 동일한 또는 다른 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해, 강화된 접합 효율성을 가질 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 다른 위치에 동일한 또는 다른 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해, 강화된 접합율 (conjugation yield)을 가질 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 다른 위치에 동일한 또는 다른 변형된 아미노산이 없는 폴리펩타이드와 비교해, 강화된 접합 특이성 (conjugation specificity)을 가질 수 있다. 이러한 구현예에 대한 특정 측면에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0153]

특정 구현예들에서, 본 발명은 보존적으로 변형된 폴리펩타이드 변이체와 본원에 기술된 항체를 추가로 제공한다. 폴리펩타이드에 대한 보존적으로 변형된 변이체는, 당해 기술 분야의 당업자가 평가하였을 때, 폴리펩타이드의 구조 및/또는 기능은 파괴하지 않는, 하나 이상의 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 20개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 15개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 10개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 9개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 8개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 7개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 6개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 5개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 4개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 3개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 2개 이하

의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 보존적으로 변형된 변이체는 1개의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 치환은, 본원에 기술된 바와 같이, 동일 클래스에 속하는 아미노산으로 치환되는, 보존적인 치환이다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0154] 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 구조, 안정성 및/또는 활성 조절을 위해 변형될 수 있다. 이러한 구현예에서, 변형은 보존적이거나 또는 보존적 이외의 것일 수 있다. 이러한 변형은 단지 실무자가 본원에 기술된 조성물을 이용하여 본 방법을 수행하는데 적합하여야 한다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드가 항체인 경우, 변형은 항원의 결합 친화성을 감소시키지만, 제거하진 않는다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드가 항체인 경우, 변형은 항원 결합 친화성을 증가시킨다. 특정 구현예들에서, 변형은 폴리펩타이드의 구조 또는 안정성을 강화한다. 특정 구현예들에서, 변형은 폴리펩타이드의 구조 또는 안정성을 감소시키지만, 없애진 않는다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 20개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 15개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 10개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 9개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 8개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 7개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 6개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 5개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 4개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 3개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 2개 이하의 아미노산 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다. 특정 구현예들에서, 변형된 변이체는 1개의 아미노산의 삽입, 결손 또는 치환을 포함한다.

[0155] 또한, 번역 후 변형된 변이체도 본 발명의 범위에 포함된다. 본원에 제공되는 임의의 폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 임의의 방식으로 번역 후 변형될 수 있다. 폴리펩타이드에 대한 전형적인 번역 후 변형으로는, 체인간의 이황화 결합, 체인내 이황화 결합, N-연결된 당화 및 단백질분해를 포함한다. 또한, 본 발명은 인산화, O-연결된 당화, 메틸화, 아세틸화, 지질화 (lipidation), GPI 고정 (GPI anchoring), 미리스토일화 (myristoylation) 및 프레닐화 (prenylation) 등의 변형을 가진 그외 번역 후 변형된 폴리펩타이드를 제공한다. 번역 후 변형은 생산 중에 생체내, 시험관내 또는 그외에서 이루어질 수 있다. 특정 구현예들에서, 번역 후 변형은 실무자에 의한, 예를 들어 본원에 제공된 방법을 이용한 의도적인 변형 (intentional modification)일 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0156] 나아가, 본 발명은 다른 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 융합된 폴리펩타이드를 포함한다. 융합체의 예로는, 비제한적으로, 예컨대, 메티오닌이 폴리펩타이드의 N-말단에 결합되어 재조합 발현시 형성되는 메티오닐 폴리펩타이드, 정제 목적의 융합체 (비제한적인 예로, 폴리-히스티딘 또는 친화성 에피토프), 다른 생물 활성 분자에 연결하기 위한 목적의 융합체, 혈청 알부민 결합 펩타이드와의 융합체, 및 혈청 알부민 등의 혈청 단백질과의 융합체를 포함한다. 폴리펩타이드는 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 폴리펩타이드-결합 도메인 (비제한적인 예로, FLAG 또는 폴리-His) 또는 그외 친화성 기반의 서열 (비제한적인 예로, FLAG, 폴리-His, GST 등)을 포함할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 검출 (비제한적인 예로, GFP를 포함함), 정제 또는 다른 특징을 개선시키는 결합 분자 (비제한적인 예로, 바이오틴)를 포함할 수 있다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 전장 폴리펩타이드의 정제를 용이하게 하는 C-말단 친화성 서열을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기한 C-말단 친화성 서열은 폴리-His 서열, 예로, 6-His 서열이다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0157] 또한, 본 발명은 하나 이상의 접합 모이어티가 접합된 폴리펩타이드를 제공한다. 접합 모이어티는 당해 기술 분야의 당업자에게 유용한 것으로 간주되는 임의의 접합 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 접합 모이어티는, 폴리펩타이드의 시험관내 또는 생체내 안정성을 개선시킬 수 있는, 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리머일 수 있다. 접합 모이어티는 치료학적 활성을 구비할 수 있어, 폴리펩타이드-약물 접합체를 형성할 수 있다. 접합 모이어티는 타겟 세포에 유해한 분자 페이로드일 수 있다. 접합 모이어티는 검출 또는 진단에 사용가능한 표지물질일 수 있다. 특정 구현예들에서, 접합 모이어티는 직접 공유 결합을 통해 폴리펩타이드에 결합된다. 특정 구현예들에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 폴리펩타이드에 결합된다. 유익한 구현예에서, 접합 모이어티 또는 링커는 폴리펩타이드의 하나 이상의 변형된 아미노산을 통해 결합된다. 예시적인 접합 모이어티 및 링커는 본원에 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체이다.

[0158] 모 폴리펩타이드는 비제한적인 예로 당해 기술 분야에 공지되거나, 또는 향후 개발될 임의의 폴리펩타이드일 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체이다. 모 폴리펩타이드는, 비제한적인 예로, 인간, 마우스, 랫,

토끼, 카멜, 라마, 단봉 낙타, 원숭이 등의 임의의 유기체, 특히 포유류, 특히 인간, 특히 마우스와 랫으로부터 유래된 폴리펩타이드 유전자 또는 폴리펩타이드 유전자들에 의해 실질적으로 코딩될 수 있다. 일 구현예에서, 모 폴리펩타이드는, 선택 방법과 커플링된 형질전환 마우스 또는 기타 동물 (항체의 경우, Bruggemann & Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458) 또는 인간 폴리펩타이드 라이브러리 (항체의 경우, Griffiths & Duncan, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:102-108)를 이용함으로써, 예를 들어, 환자 또는 개체로부터 수득되는, 완전한 인간의 것일 수 있다. 모 폴리펩타이드는 인공 또는 천연 등의 임의의 소스로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 모 폴리펩타이드는, 비제한적인 예로, 키메라 폴리펩타이드 및 인간화된 폴리펩타이드 등의 조작된 폴리펩타이드일 수 있거나 (항체의 경우, Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402), 또는 조합 라이브러리로부터 유래될 수 있다. 아울러, 모 폴리펩타이드는 하나 이상의 천연 폴리펩타이드 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 폴리펩타이드에 대한 조작된 변이체일 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 모 폴리펩타이드는 친화성 성숙화에 의해 동정한 폴리펩타이드이다.

[0159]

모 폴리펩타이드는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 폴리펩타이드 또는 비제한적인 예로 당해 기술 분야의 당업자에 의해 개발된 임의의 폴리펩타이드일 수 있다. 항체의 예로는, 비제한적으로, 항-TNF 항체 (미국 특허 6,258,562), 항-IL-12 및/또는 항-IL-12p40 항체 (미국 특허 6,914,128); 항-IL-18 항체 (미국 특허 공개번호 2005/0147610), 항-05, 항-CBL, 항-CD147, 항-gp120, 항-VLA-4, 항-CD11a, 항-CD18, 항-VEGF, 항-CD40L, anti CD-40 (예로, PCT 공개공보 WO 2007/124299) 항-Id, 항-ICAM-1, 항-CXCL13, 항-CD2, 항-EGFR, 항-TGF- β 2, 항-HGF, 항-cMet, 항-DLL-4, 항-NPR1, 항-PLGF, 항-ErbB3, 항-E-selectin, 항-Fact VII, 항-Her2/neu, 항-F gp, 항-CD11/18, 항-CD14, 항-ICAM-3, 항-RON, 항-SOST, 항-CD-19, 항-CD80 (예로, PCT 공개공보 WO 2003/039486, 항-CD4, 항-CD3, 항-CD23, 항- β 2-인테그린, 항- α 4 β 7, 항-CD52, 항-HLA DR, 항-CD22 (예로, 미국 특허 5,789,554), 항-CD20, 항-MIF, 항-CD64 (FcR), 항-TCR α β , 항-CD2, 항-Hep B, 항-CA 125, 항-EpCAM, 항-gp120, 항-CMV, 항-gpIIbIIIa, 항-IgE, 항-CD25, 항-CD33, 항-HLA, 항-IGF1,2, 항-IGFR, 항-VNR인테그린, 항-IL-1 α , 항-IL-1 β , 항-IL-1 수용체, 항-IL-2 수용체, 항-IL-4, 항-IL-4 수용체, 항-IL5, 항-IL-5 수용체, 항-IL-6, 항-IL-8, 항-IL-9, 항-IL-13, 항-IL-13 수용체, 항-IL-17, 항-IL-6R, 항-RANKL, 항-NGF, 항-DKK, 항- α V β 3, 항-IL-17A, 항-IL23p19 및 항-IL-23을 포함한다 (Presta, L. G. (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731-6을 참조함).

[0160]

또한, 모 폴리펩타이드는 임상 실험에서 사용이 승인되었거나 또는 임상 용도로 개발 중인 다양한 치료 폴리펩타이드로부터 선택될 수 있다. 이러한 치료 폴리펩타이드에 대한 항체의 예로는, 비제한적으로, 비-호지킨 림프종의 치료에 대해 승인된 키메라 항-CD20 항체인, 리툽시맵 (rituximab) (Rituxan[®], IDEC/Genentech/Roche) (예, 미국 특허 5,736,137); 미국 특허 5,500,362에 기술된 항-CD20 항체로서 Genmab 사가 현재 개발 중인 항-CD20인, HuMax-CD20, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumalYM (Intracel), 및 PRO70769 (PCT 특허 출원번호 PCT/US2003/040426), 트라스투주맵 (trastuzumab) (Herceptin[®], Genentech) (예, 미국 특허 5,677,171), 유방암 치료용으로 승인된 인간화된 항-Her2/neu 항체인; 퍼투주맵 (pertuzumab) (rhuMab-2C4, Omnitarg[®]), 현재 Genentech사에서 개발 중인; 항-Her2 항체 (미국 특허 4,753,894; 세투시맵 (cetuximab) (Erbix[®], Imclone) (미국 특허 4,943,533; PCT 공개공보 WO 96/40210), 다양한 암들에 대해 임상 실험 중인 키메라 항-EGFR 항체인; ABX-EGF (미국 특허 6,235,883), 현재 Abgenix-Immunex-Amgen사에서 개발 중인; HuMax-EGFr (미국 특허 7,247,301), 현재 Genmab사에서 개발 중인; 425, EMD55900, EMD62000 및 EMD72000 (Merck KGaA) (미국 특허 5,558,864; Murthy, et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck, et al. (1987) J. Cell. Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough, et al. (1991) Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT 공개공보 WO 95/20045; Modjtahedi, et al. (1993) J. Cell. Biophys. 22(I-3): 129-46; Modjtahedi, et al. (1993) Br. J. Cancer 67(2): 247-53; Modjtahedi, et al. (1996) Br. J. Cancer 73(2): 228-35; Modjtahedi, et al. (2003) Int. J. Cancer 105(2): 273-80); TheraCIM hr3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (미국 특허 5,891,996; 미국 특허 6,506,883; Mateo, et al. (1997) Immunotechnol. 3(1): 71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT 공개공보 WO 01/62931A2); 및 SC100 (Scancell) (PCT 공개공보 WO 01/88138); 알렘투주맵 (alemtuzumab) (Campath[®], Millenium), B-세포 만성 림프구성 백혈병의 치료용으로 현재 승인된 인간화된 mAb인; Ortho Biotech/Johnson & Johnson사에 의해 개발된 항-CD3 항체인 뮤로모납(muromonab)-CD3 (Orthoclone OKT3[®]),

IDEC/Schering AG 사에 의해 개발된 항-CD20 항체인 이브리투모맵 티우세탄 (ibritumomab tiuxetan) (Zevalin[®]), Celltech/Wyeth 사에 의해 개발된 항-CD33 (p67 단백질) 항체인 겐투주맵 (gemtuzumab) 오조가미신 (ozogamicin) (Mylotarg[®]), Biogen 사에 의해 개발된 항-LFA-3 Fc 융합체인 알레파셉트 (alefacept (Amevive[®])), Centocor/Lilly 사에서 개발한 압시시맵 (abciximab) (ReoPro[®]), Novartis 사에서 개발한 바실릭시맵 (basiliximab) (Simulect[®]), Medimmune 사에서 개발한 팔리비주맵 (palivizumab) (Synagis[®]), Centocor 사에 의해 개발된 항-TNF α 항체인 인플릭시맵 (infliximab) (Remicade[®]), Abbott 사에 의해 개발된 항-TNF α 항체인 아달리무맵 (adalimumab) (Humira[®]), Celltech 사에 의해 개발된 항-TNF α 항체인 Humicade[®], Centocor 사에 의해 개발된 완전 인간 TNF 항체인 골리무맵 (golimumab) (CNTO-148), Immunex/Angen 사에 의해 개발된 p75 TNF 수용체 Fc 융합체인 에타너셉트 (etanercept) (Enbrel[®]), Roche 사에 의해 기존에 개발된 p55TNF 수용체 Fc 융합체인 이에너셉트 (Ienercept), 항체 Abgenix 사에서 개발 중인 항-CD147 항체인 ABX-CBL, Abgenix 사에서 개발 중인 항-IL8 항체인 ABX-IL8, Abgenix 사에서 개발 중인 항-MUC18 항체인 ABX-MA1, Antisoma 사에서 개발 중인 항-MUC1인 펠투모맵 (Pentumomab) (R1549, 90Y-muHMFg1), Antisoma 사에서 개발 중인 항-MUC1 항체인 테렉스 (Therex) (R1550), Antisoma 사에서 개발 중인 AngioMab (AS1405), Antisoma 사에서 개발 중인 HuBC-1, Antisoma 사에서 개발 중인 티오플라틴 (Thioplatin) (AS1407), Biogen 사에서 개발 중인 항- α -4- β -1 (VLA-4) 및 α -4- β -7 항체인 Antegren[®] (나탈리주맵 (natalizumab)), Biogen 사에서 개발 중인 항-VLA-1 인테그린 항체인 VLA-1 mAb, Biogen 사에서 개발 중인 항-lymphotoxin β 수용체 (LTBR) 항체인 LTBR mAb, Cambridge Antibody Technology 사에서 개발 중인 항-TGF- β 항체인 CAT-152, Abbott 사에서 개발 중인 항-IL-12 p40 항체인 ABT 874 (J695), Cambridge Antibody Technology and Genzyme 사에서 개발 중인 항-TGF β 1 항체인 CAT-192, Cambridge Antibody Technology 사에서 개발 중인 항-Eotaxin1 항체인 CAT-213, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc. 사에서 개발 중인 항-Blys 항체인 LymphoStat-B[®], Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences, Inc. 사에서 개발 중인 항-TRAIL-R1 항체인 TRAIL-R1 mAb, 아바스틴 (AVASTIN)[®] 베박시주맵 (bevacizumab), rhuMab-VEGF), Genentech 사에서 개발 중인 항-VEGF 항체, Genentech 사에서 개발 중인 항-HER 수용체 패밀리 항체, Genentech 사에서 개발 중인 항-Tissue Factor 항체인 항-Tissue Factor (ATF), Genentech 사에서 개발 중인 항-IgE 항체인 Xolair[®] (오말리주맵 (omalizumab)), Genentech 및 Xoma 사에서 개발 중인 항-CD11a 항체인 Raptiva[®] (에팔리주맵 (efalizumab)), Genentech 및 Millenium Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 MLN-02 항체 (종래에는 LDP-02임), Genmab 사에서 개발 중인 항-CD4 항체인 HuMax CD4, Genmab 및 Amgen 사에서 개발 중인 항-IL15 항체인 HuMax-IL15, Genmab 및 Medarex 사에서 개발 중인 HuMax-Inflam, Genmab, Medarex 및 Oxford GcoSciences 사에서 개발 중인 항-Heparanase I 항체인 HuMax-Cancer, Genmab 및 Angen 사에서 개발 중인 HuMax-Lymphoma, Genmab 사에서 개발 중인 HuMax-TAC, IDEC Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 항-CD40L 항체인 IDEC-131, IDEC Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 항-CD4 항체인 IDEC-151 (Clenoliximab), IDEC Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 항-CD80 항체인 IDEC-114, IDEC Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 항-CD23인 IDEC-152, IDEC Pharmaceuticals 사에서 개발 중인 항-대식세포 이동 인자 (MIF) 항체, Imclone 사에서 개발 중인 항-이디오타입 항체인 BEC2, Imclone 사에서 개발 중인 항-KDR 항체인 IMC-1C11, Imclone 사에서 개발 중인 항-flk-1 항체인 DC101, Imclone 사에서 개발 중인 항-VE 카드헤린 항체, Immunomedics 사에 의해 개발 중인 항-암 태아성 항원 (carcinoembryonic antigen: CEA) 항체인 CEA-Cide[®] (Iabetuzumab), Immunomedics 사에서 개발 중인 항-CD22 항체인 LymphoCide[®] (에프라투주맵 (epratuzumab)), Immunomedics 사에서 개발 중인 AFP-Cide, Immunomedics 사에서 개발 중인 MyelomaCide, Immunomedics 사에서 개발 중인 LkoCide, Immunomedics 사에서 개발 중인 ProstaCide, Medarex 사에서 개발 중인 항-CTLA4 항체인 MDX-010, Medarex 사에서 개발 중인 항-CD30 항체인 MDX-060, Medarex 사에서 개발 중인 MDX-070, Medarex 사에서 개발 중인 MDX-018, Medarex 및 Immuno-Designed Molecules 사에서 개발 중인 항-Her2 항체인 Osidem[®] (IDM-1), Medarex 사에서 개발 중인 항-CD4 항체인 HuMax[®]-CD4, Medarex 및 Genmab 사에서 개발 중인 항-IL15 항체인 HuMax-IL15, Medarex 및 Centocor/J&J 사에서 개발 중인 항-TNF α 항체인 CNTO 148, Centocor/J&J 사에서 개발 중인 항-사이토카인 항체인 CNTO 1275, MorphoSys 사에서 개발 중인 항-세포간 유착 분자-1 (ICAM-1) (CD54) 항체인 MOR101과 MOR102, MorphoSys 사에서 개발 중인 항-섬유모세포 성장인자 수용체 3 (FGFR-3) 항체인 MOR201, Protein Design Labs 사에서 개발 중인 항-CD3 항체인 Nuvion[®]

(비실리주맵 (visilizumab)), Protein Design Labs 사에서 개발 중인 항- γ 인터페론 항체인 HuZAF[®], Protein Design Labs 사에서 개발 중인 항- $\alpha 5\beta 1$ 인테그린, Protein Design Labs 사에서 개발 중인 항-IL-12, Xoma 사에서 개발 중인 항-Ep-CAM 항체인 ING-1, Genentech 및 Novartis 사에서 개발된 인간화된 항-IgE 항체인 Xolair[®] (오말리주맵), 및 Xoma 사에서 개발 중인 항- $\beta 2$ 인테그린 항체인 MLN01을 포함한다. 다른 구현예에서, 치료제로는 KRN330 (Kirin); huA33 항체 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (α V 인테그린, Centocor); MEDI-522 (α V $\beta 3$ 인테그린, Medimmune); 볼록시시맵 (volociximab) (α V $\beta 1$ 인테그린, Biogen/PDL); 인간 mAb 216 (B 세포 당화된 에피토프, NCI); BiTE MT103 (2 특이성의 CD19XCD3, Medimmune); 4G7XH22 (2 특이성의 B 세포 X Fc γ 1R, Medarex/Merck KGa); rM28 (2 특이성의 CD28 X MAPG, EP 특허 EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (2 특이성의 CD64 X EGFR, Medarex); 카툼악소맵 (Catumaxomab) (removab) (2 특이성의 EpCAM X 항-CD3, Trion/Fres); 에르툼악소맵 (Ertumaxomab) (2 특이성의 HER2/CD3, Fresenius Biotech); 오레고보맵 (oregovomab) (OvaRex) (CA-125, ViRex); Rencarex[®] (WX G250) (카본 안하이드라제 IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglin), Tracon); BMS-663513 (CD137 작용제, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); 시플리주맵 (siplizumab) (ME다이-507) (CD2, Medimmune); 오파투무맵 (Ofatumumab) (Humax-CD20) (CD20, Genmab); 리툽시맵 (rituximab) (Rituxan) (CD20, Genentech); 벨투주맵 (veltuzumab) (hA20) (CD20, Immunomedics); 에프라투주맵 (epratuzumab) (CD22, Amgen); 루밀리시맵 (lumiliximab) (IDEC 152) (CD23, Biogen); 무로모나-CD3 (muromonab-CD3) (CD3, Ortho); HuM291 (CD3 fc 수용체, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentech); SGN-33 (린투주맵 (lintuzumab)) (CD33, Seattle Genentech); 자놀리무맵 (Zanolimumab) (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentech); 캠퍼스1h (Campath1h) (알렘투주맵 (alentuzumab)) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); 갈릭시맵 (Galiximab) (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (절단된 콜라겐, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); 이필리무맵 (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (DR4TRAIL-R1 작용제, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); 아포맵 (Apomab) (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (렉사투무맵 (lexatumumab)) (DR5TRAIL-R2 작용제, HGS); 세투시맵 (Cetuximab) (에르비투스 (Erbix)) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); 니모투주맵 (nimotuzumab) (EGFR, YM Bio); 파니투무맵 (panitumumab) (Vectabix) (EGFR, Amgen); 잘투투무맵 (Zalutumumab) (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); 아데카투무맵 (adecatumumab) (MT201) (Epcam, Merck); 에드레콜로맵 (edrecolomab) (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (플레이트 수용체 α , Morphotech); KW-2871 (강글리오사이드 GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCgb, Celldex); 트라스투주맵 (trastuzumab) (헤르셉틴 (Herceptin)) (HER2, Celldex); 퍼투주맵 (pertuzumab) (rhuMab 2C4) (HER2 (DI), Genentech); 아폴리주맵 (apolizumab) (HLA-DR β 체인, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); 항-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik- β -1 (IL-2R β (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); 항-KIR (1-7F9) (킬러 세포 Ig-유사 수용체 (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LT β R, Biogen); HuHMF1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (N-연결된 탄수화물 에피토프, Raven); CAL (부갑상선 호르몬-관련 단백질 (PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFR α , Imclone); 바비투시맵 (bavituximab) (포스포타디세린, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 (TGF β (pan) 저해제 (IgG4), Genzyme); 인플리시맵 (Infliximab) (Remicade) (TNF α , Centocor); A27.15 (트랜스페린 수용체, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (트랜스페린 수용체, Salk Institute); 베박시주맵 (bevacizumab) (아바스틴 (AVASTIN)) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, PCT 공개공보 WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone)을 포함한다.

[0161]

특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 부위-특이적인 위치에서 변형된 아미노산을 하나 포함한다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 부위-특이적인 위치에서 변형된 아미노산을 2개 포함한다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 부위-특이적인 위치에서 변형된 아미노산을 3개 포함한다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 부위-특이적인 위치에서 변형된 아미노산

을 4개 포함한다.

[0162] 항체

[0163] 특정 구현예들에서, 본 발명은 본원에 기술된 하나 이상의 변형된 아미노산을 포함하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 항체는 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)를 포함하는 헤테로테트라머이다. 각각의 경쇄는 하나의 이황화 공유 결합에 의해 중쇄와 연결될 수 있다. 각각의 중쇄는 하나 이상의 이황화 공유 결합에 의해 다른 중쇄와 연결될 수 있다. 각각의 중쇄와 각각의 경쇄는 또한 하나 이상의 체인내 이황화 결합을 가질 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 바와 같이, 각각의 중쇄는 전형적으로 가변성 도메인 (V_H)을 포함하며, 그 다음으로 여러개의 불변 도메인을 포함한다. 각각의 경쇄는 전형적으로 한쪽 말단 (V_L)에 위치한 가변성 도메인과 불변 도메인을 포함한다. 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 항체는, 전형적으로 이의 타겟 분자, 즉 항원에 대해 선택적인 친화성을 가진다.

[0164] 본원에 제공되는 항체는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 임의의 폴리펩타이드를 가질 수 있다. 이는 전장이거나 단편일 수 있다. 전장 항체의 예로는 IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM 등을 포함한다. 단편의 예로는 Fv, Fab, Fc, sFv 등을 포함한다.

[0165] 하나 이상의 변형된 아미노산은 항체의 하나 이상의 폴리펩타이드내에 선택된 부위-특이적인 위치에 위치할 수 있다. 폴리펩타이드 체인은 항체의 임의의 폴리펩타이드 체인일 수 있으며, 비제한적인 예로, 경쇄 또는 중쇄를 포함할 수 있다. 부위-특이적인 위치는 임의의 가변성 도메인과 임의의 불변 도메인을 비롯한, 항체의 임의 도메인내일 수 있다.

[0166] 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 폴리펩타이드 명명 시스템으로 기술할 수 있다. 일 구현예에서, 폴리펩타이드가 항체인 경우, 넘버링 시스템은 Kabat 넘버링 시스템일 수 있으며, 이때 부위-특이적인 위치는 중쇄 잔기 H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 및 H438이다. 구체적으로, 본 발명은 Kabat 잔기 H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 하나 이상의 변형된 아미노산을 포함하는 항체를 제공한다.

[0167] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 잔기 H005, H023, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H420, H421 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0168] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 잔기 H005, H084, H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359 및 H389로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0169] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 잔기 H023, H074, H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, H340 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0170] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 잔기 H042, H065, H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243,

H262, H264, H265, H278, H356, H358, H360, H383, H384 및 H436으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0171] 특정 구현예들에서, 본 발명은 H292-H301, H303 및 H305에 해당되는 Kabat 잔기들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0172] Chothia 항체 넘버링 시스템에서, 이들 위치는, 중쇄 잔기 H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 및 H438이다. 구체적으로, 본 발명은, Chothia 잔기 H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0173] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Chothia 잔기 H005, H023, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H420, H421 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0174] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Chothia 잔기 H005, H084, H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359 및 H389로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0175] 특정 구현예들에서, 본 발명은 H292-H301, H303 및 H305에 해당되는 Chothia 잔기로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0176] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Chothia 잔기 H023, H074, H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, H340 및 H438로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0177] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Chothia 잔기 H042, H065, H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H356, H358, H360, H383, H384 및 H436로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0178] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 L22, L7 및 L152로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0179] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 L043, L049, L056, L057, L060, L067, L068, L109, L112, L114, L144, L153, L156, L157, L168, L184, L202, L203 및 L206로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 L043, L049, L056, L057, L060, L067, L068, L109, L112, L114, L144, L153, L156, L168, L184, L202 및 L203로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 L049, L056, L057, L060, L067, L109, L153, L202 및 L203로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.

- [0180] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L138, L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 및 L201로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 minus 1, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 및 L201로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L142, L152, L171, L182, L188 및 L199로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 minus 1, L005, L007, L008, L016, L017, L018, L020, L022, L027, L045, L058, L063, L077, L079, L107, L142, L152, L182, L188 및 L199로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 (-)L001, L016, L063 및 L199로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0181] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L014, L070, L138, L142, L143 및 L152로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0182] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L070, L138, L142, L143, L152 및 L201로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0183] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 22, 7 및 152에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0184] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 138, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 및 201에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0185] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 및 201에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0186] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 152, 171, 182, 188 및 199에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0187] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 5, 7, 8, 16, 17, 18, 20, 22, 27, 45, 58, 63, 77, 79, 107, 142, 152, 182, 188 및 199에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0188] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 16, 63 및 199에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0189] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 7, 8, 16, 22, 63, 14, 70, 138, 142, 143 및 152에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0190] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 minus 1, 7, 8, 16, 22, 63, 70, 138, 142, 143, 152 및 201에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0191] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 114, 144, 153, 156, 157, 168, 184, 202, 203 및 206에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의

위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.

- [0192] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 144, 153, 156, 168, 184, 202 및 203에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0193] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 144, 153, 156, 184, 202 및 203에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0194] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 49, 56, 57, 60, 67, 109, 153, 202 및 203에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0195] 다시 말해, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 폴리펩타이드의 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 193, 225, 19, 52, 71, 117 또는 224로부터 선택되는 하나 이상의 위치와, 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 22, 7 및 152에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0196] 또한, 부위-특이적인 위치는 기준 항체의 폴리펩타이드 체인의 아미노산 서열을 기준으로 표시될 수 있다. 예를 들어, 기준 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 1로 제공된다. 기준 중쇄에서, 부위-특이적인 위치는 잔기 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 423, 424, 439 및 441이다. 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 423, 424, 439 및 441에 해당되는 위치로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0197] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 5, 23, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 242, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 362, 378, 389, 392, 395, 401, 423, 424 및 441에 해당되는 위치들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0198] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 5, 88, 121, 135, 139, 242, 296, 337, 358, 362 및 392에 해당되는 위치들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0199] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 23, 75, 122, 137, 138, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 378, 389, 395, 401, 423, 424 및 441에 해당되는 위치들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0200] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 42, 66, 141, 158, 177, 179, 180, 222, 241, 246, 265, 267, 268, 281, 359, 361, 363, 386, 387 및 439에 해당되는 위치들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0201] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 항체의 292-301, 303 및 305에 해당되는 위치들로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.

- [0202] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 중쇄 또는 중쇄 잔기들 H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52 또는 H70로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0203] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 중쇄 또는 중쇄 잔기들 H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190 및 H222로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0204] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 중쇄 또는 중쇄 잔기들 H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152 및 H136로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0205] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1과 적어도 70%, 80% 또는 90%의 상동성을 가지며, 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 폴리펩타이드의 잔기들 404, 121, 180, 241, 136, 25, 40, 119, 190, 222, 19, 52 또는 70에 해당되는 위치들로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 변형된 아미노산을 가지는, 폴리펩타이드 체인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0206] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2와 적어도 70%, 80% 또는 90%의 상동성을 가지며, 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 잔기들 22, 7 및 152에 해당되는 위치들로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 변형된 아미노산을 가지는, 폴리펩타이드 체인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0207] 특정 구현예들에서, 본 발명은 부위-특이적인 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서, 각각의 변형된 아미노산은 독립적으로 항체의 임의의 폴리펩타이드 체인의 선택적으로 치환가능한 위치들로 이루어진 군으로부터 선택되는 특이적인 부위에 존재한다.
- [0208] 특정 구현예들에서, 항체는 단일 경쇄 폴리펩타이드에 부위-특이적인 변형된 아미노산을 2 이상 포함한다. 특정 구현예들에서, 항체는 단일 중쇄 폴리펩타이드에 부위-특이적인 변형된 아미노산을 2 이상 포함한다. 특정 구현예들에서, 항체는 경쇄 폴리펩타이드에 부위-특이적인 변형된 아미노산 1개 이상과, 중쇄 폴리펩타이드에 부위-특이적인 변형된 아미노산 1개 이상을 포함한다.
- [0209] 특정 구현예들에서, 항체는 경쇄 폴리펩타이드에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산과 2개의 중쇄 폴리펩타이드 각각에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산을 포함한다. 특정 구현예들에서, 항체는 2개의 경쇄 폴리펩타이드 각각에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산과 중쇄 폴리펩타이드에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산을 포함한다. 특정 구현예들에서, 항체는 2개의 경쇄 폴리펩타이드 각각에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산과 2개의 중쇄 폴리펩타이드 각각에 하나 이상의 부위-특이적인 변형된 아미노산을 포함한다.
- [0210] 특정 구현예들에서, 항체는 부위-특이적인 변형된 아미노산을 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상 포함한다. 특정 구현예들에서, 항체는 변형된 아미노산을 2-6개 포함한다.
- [0211] 치환을 위한 부위-특이적인 위치는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 임의의 항체 명명 시스템으로 기술될 수 있다. Kabat 넘버링 시스템의 경우, 이들 위치는 중쇄 또는 경쇄 잔기 H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 및 H221의 위치이다. 즉, 본 발명은 Kabat 잔기 H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 및 H221로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0212] 일부 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 잔기 H404, H121, H180, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 및 H221로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0213] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 잔기 L22, L7 및 L152로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0214] 특정 구현예들에서, 본 발명은 Kabat 또는 Chothia 넘버링 시스템에 따라 중쇄 또는 경쇄 잔기 H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 또는 H221로부터 선택되는 잔기에 해당되는 서열 위치에 부위-특이적인 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.
- [0215] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 1에 따른 예시적인 중쇄 폴리펩타이드의 잔기 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 193, 225, 19, 52, 71, 117 또는 224로부터 선택되는 잔기에 해당되는 서열 위치에 부위-특이적인 변

형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0216] 특정 구현예들에서, 본 발명은 서열번호 2에 따른 예시적인 경쇄 폴리펩타이드의 잔기 22, 7 또는 152로부터 선택되는 잔기에 해당되는 서열 위치에 부위-특이적인 변형된 아미노산을 2 이상 포함하는 항체를 제공한다.

[0217] 항체는 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 임의의 항체 형태를 취할 수 있다. 항체는 단일 폴리펩타이드 체인 - 단일 중쇄 또는 단일 경쇄 - 을 포함할 수 있다. 또한, 항체는 호모다이며, 헤테로다이며, 호모멀티머 및 헤테로멀티머 등의 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 멀티머를 형성할 수도 있다. 이들 멀티머는 연결되거나 또는 연결되지 않을 수 있다. 적용가능한 연결은 폴리펩타이드 분자에 전형적인 체인간의 이황화 결합을 포함한다. 또한, 멀티머는 본원에 기술된 변형된 아미노산 등의 다른 아미노산에 의해 연결될 수도 있다. 항체는 IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgM 등의 임의 클래스 또는 서브클래스의 면역글로불린일 수 있다. 항체는 Fv, Fc, Fab, (Fab')₂ 및 scFv 등의 임의의 항체 단편 형태의 것일 수 있다.

[0218] 모 항체는 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있거나 향후 개발될 임의의 항원에 대해 친화성을 가질 수 있다. 실제, 모든 물질이 모 항체 또는 본원의 항체에 대한 항원일 수 있다. 유용 항원의 예로는, 비제한적으로, α-1 항트립신, 안지오스타틴, 항용혈성 인자 (Antihemolytic factor), 폴리펩타이드, 아포지단백질, 아포 단백질, 심방 나트륨이뇨 인자, 심방 나트륨이뇨 폴리펩타이드, 심방 펩타이드, C-X-C 케모카인 (예, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), 칼시토닌, CC 케모카인 (예, 단핵세포 주화성 단백질-1, 단핵세포 주화성 단백질-2, 단핵세포 주화성 단백질-3, 단핵세포 염증성 단백질-1 α, 단핵세포 염증성 단백질-1 β, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), CD40 리간드, C-kit 리간드, 콜라겐, 콜로니 자극 인자 (CSF), 보체 인자 5a, 보체 저해제, 보체 수용체 1, 사이토카인, (예로, 상피 호중구 활성화 펩타이드-78, GRO/MGSA, GRO, GRO, MIP-1, MIP-1, MCP-1), 상피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 ("EPO"), 박리 독소 A 및 B, factor IX, factor VII, factor VIII, factor X, 섬유모세포 성장인자 (FGF), 피브리노겐, 피브로넥틴, G-CSF, GM-CSF, 글루코세레브로시다제, 고나도트로핀, 성장인자, hedgehog 단백질 (예로, Sonic, Indian, Desert), 헤모글로빈, 간세포 성장인자 (HGF), 히루딘, 인간 혈청 알부민, 인슐린, 인슐린-유사 성장인자 (IGF), 인터페론 (예로, IFN-α, IFN-β, IFN-γ), 인터루킨 (예로, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 등), 각질 형성 세포 성장인자 (KGF), 락토페린, 백혈병 저해 인자, 루시퍼라제, 뉴르투린 (neurturin), 호중구 저해 인자 (NIF), 온코스타틴 M, 골형성 단백질, 부갑상선 호르몬, PD-ECSF, PDGF, 펩타이드 호르몬 (예, 인간 성장 호르몬), 플레이오토로핀, 단백질 A, 단백질 G, 발열성 외독소 A, B 및 C, 렐라신, 레닌, SCF, 용해성 보체 수용체 I, 용해성 I-CAM 1, 용해성 인터루킨 수용체 (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), 용해성 TNF 수용체, 소마토메딘 (somatomedin), 소마토스타틴, 소마토트로핀, 스트렙토키나제, 슈퍼항원, 즉, 스태필로코커스 장독소 (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), 수퍼옥사이드 디스무타제, 독성 쇼크 중후군 독소 (TSST-1), 티모신 α 1, 조직 플라스미노겐 활성화인자, 종양 괴사 인자 (TNF β), 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR), 종양 괴사 인자-α (TNF α), 혈관 내피 성장인자 (VEGF), 우로키나제 등을 포함한다. 이들 항원은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 방법으로, 예를 들어, 상업적인 소스나 공개된 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 (예, Genbank)로부터 입수할 수 있다.

[0219] 추가적인 항원으로, 비제한적으로, 전사 및 발현 활성화인자를 포함한다. 전사 및 발현 활성화인자의 예로는, 세포의 증식, 분화, 조절 등을 조절하는 유전자 및 단백질을 포함한다. 발현 및 전사 활성화인자는 원핵생물, 바이러스, 및 진균, 식물 및 동물 등의 진핵동물, 예컨대 포유류에서 발견되며, 매우 다양한 치료학적 타겟을 제공해 준다. 발현 및 전사 활성화인자는 여러가지 기전에 의해, 예를 들어, 수용체에 결합하거나, 신호 전이 캐이케이드를 자극하거나, 전사 인자의 발현을 조절하거나, 프로모터 및 인핸서에 결합하거나, 프로모터와 인핸서에 결합하는 단백질에 결합하거나, DNA를 풀거나 (unwinding), pre-mRNA를 스플라이싱하거나, RNA를 폴리아데닐화하거나, 그리고 RNA를 분해함으로써, 전사를 조절한다. 항원은, 비제한적으로, 사이토카인 등의 발현 활성화인자, 염증성 분자, 성장인자, 이의 수용체, 및 온코진 산물, 예컨대 인터루킨 (예, IL-1, IL-2, IL-8, 등), 인터페론, FGF, IGF-I, IGF-II, FGF, PDGF, TNF, TGF-α, TGF-β, EGF, KGF, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4VCAM-1, ICAM-1/LFA-1, 및 히알루린 (hyalurin)/CD44; 신호 전이 분자 및 대응되는 온코진 산물, 예 Mos, Ras, Raf 및 Met; 및 전사 활성화인자 및 억제인자, 예, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, 및 스테로이드 호르몬 수용체, 예로, 에스트로겐, 프로게스테론, 테스토스테론, 알도스테론의 수용체, LDL 수용체 리간드 및 코르티코스테론을 포함한다.

[0220] 백신 단백질은 항원일 수 있으며, 비제한적인 예로, 감염성 진균, 예, 아스페질러스 (*Aspergillus*), 칸디다

(*Candida*) 종; 병원성 박테리아의 모델로서 이용될 뿐만 아니라 스탕필로코커스 (예, 아우레우스) 또는 스트렙토코커스 (예, 퓨모니에)와 같이 의학적으로 중요한 박테리아의 모델로 사용되는, 박테리아, 특히 *E. coli*; 원생 동물, 예, 포자충류 (sporozoa) (예, 플라스모디아 (*Plasmodia*)), 근족충류 (rhizopod) (예, 엔타모에바 (*Entamoeba*)) 및 편모충류 (flagellate) (트립파노소마 (*Trypanosoma*), 리슈마니아 (*Leishmania*), 트리코모나스 (*Trichomonas*), 지아르디아 (*Giardia*) 등); 바이러스, 예컨대 (+) RNA 바이러스 (예로 폭스바이러스, 예컨대 백시니아; 피코르나바이러스, 예컨대 폴리오; 토가바이러스, 예컨대 루벨라; 플라비바이러스, 예컨대 HCV; 및 코로나바이러스를 포함함), (-) RNA 바이러스 (예, 랍도바이러스, 예컨대, VSV; 파라믹소바이러스, 예컨대, RSV; 오르소믹소바이러스, 예컨대, 인플루엔자; 분야바이러스; 및 아레나바이러스), dsDNA 바이러스 (예를 들어, 레오바이러스), RNA - DNA 바이러스, 즉, 레트로바이러스, 예, HIV 및 HTLV, 및 특정 DNA - RNA 바이러스, 예로 간염 B로부터 유래된 단백질을 포함한다.

[0221] 항원은 효소일 수 있으며, 효소는 비제한적인 예로, 아미다제, 아미노산 락세마제, 아실라제, 데할로게나제, 다이옥시다제, 다이아틸프로판 퍼옥시다제, 에피머라제, 에폭사이드 하이드롤라제, 에스테라제, 이소머라제, 키나제, 글루코스 이소머라제, 글리코시다제, 글리코실 트랜스퍼라제, 할로퍼옥시다제, 모노옥시게나제 (예, p450), 리파제, 리그닌 퍼옥시다제, 니트릴 하이드라타제, 니트릴라제, 프로테아제, 포스포타제, 셉틸리신, 트랜스아미나제 및 뉴클레아제를 포함할 수 있다.

[0222] 곤충 내성 단백질 (예, Cry 단백질) 등의 농업 관련 단백질, 전분 및 지질 생산 효소, 식물 및 곤충 독소, 독소-내성 단백질, 미코톡신 해독 단백질, 식물 성장 효소 (예, 리불로스 1,5-비스포스페이트 카르복실라제/옥시게나제, "RUBISCO"), 리폭시게나제 (LOX) 및 포스포에놀피루베이트 (PEP) 카르복실라제 역시 항원일 수 있다.

[0223] 예를 들어, 항원은 질환-관련 분자, 예컨대 B 세포 이디오타입, 악성 B 세포 상의 CD20, 백혈병모세포 (leukemic blast) 상의 CD33 및 유방암 상의 HER2/neu와 같은 종양 표면 항원일 수 있다. 다른 예로, 항원은 성장인자 수용체일 수 있다. 성장인자의 예로는, 비제한적으로, 상피 성장 인자 (EGF), 트랜스페린, 인슐린-유사 성장인자, 형질전환 성장인자 (TGF), 인터루킨-1 및 인터루킨-2를 포함한다. 예를 들어, EGF 수용체의 고발현성은 매우 다양한 인간 상피 원발성 종양들에서 확인되고 있다. TGF- α 는 암 세포의 오토크린 자극 경로를 매개하는 것으로 확인되고 있다. 수종의 무라인 단일클론 항체는 EGF 수용체에 결합하고, EGF 수용체로의 리간드 결합을 차단하고, 배양 및 이중이식 모델에서 다양한 인간 암 세포주들의 증식을 저해할 수 있는 것으로 확인된 바 있다. Mendelsohn and Baselga (1995) Antibodies to growth factors and receptors, in Biologic Therapy of Cancer, 2nd Ed., J B Lippincott, Philadelphia, pp 607-623을 참조한다. 즉, 항체는 다양한 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0224] 또한, 항원은 혈소판 당단백질 IIb/IIIa 수용체와 같은 관상 동맥 질환과 관련된 세포 표면 단백질 또는 수용체, CD4와 같은 자가면역 질환과 관련된 세포 표면 단백질 또는 수용체, CAMPATH-1 및 그람 음성 박테리아 리포폴리사카라이드의 리피드 A 영역일 수 있다. CD4에 대한 인간화된 항체는 균상 식균종 (mycosis fungoides), 전신성 농포 건선 (generalized pustular psoriasis), 중증 건선 및 류마티스 관절염 환자를 치료하는 임상 실험에서 테스트되고 있다. 그람 음성 박테리아 리포폴리사카라이드의 리피드 A 영역은 패혈증 쇼크를 치료하는데 임상적으로 테스트되고 있다. 또한, CAMPATH-1에 대한 항체 역시 불응성 류마티스 관절염을 치료하는데 임상적으로 테스트되고 있다. 따라서, 본원에 제공되는 항체는 다양한 자가면역 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0225] 또한, 유용 항원으로는 인간 알레르기성 질환과 관련된 단백질 또는 펩타이드, 예컨대 염증 매개 단백질, 예로, 인터루킨-1 (IL-1), 종양 괴사 인자 (TNF), 루코트리엔 수용체 및 5-리폭시게나제, 및 유착 분자, 예로 V-CAM/VLA-4를 포함한다. 아울러, IgE는 천식과 같이 1형의 즉각적인 과민성 알레르기 반응에 매우 중요한 역할을 하기 때문에, IgE 역시 항원으로서 이용할 수 있다. 연구를 통해, 혈청내 총 IgE 수준이 질환, 특히 천식의 중증도와 연관성 경향이 있는 것으로 확인되었다. Burrows et al. (1989) "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens" New Engl. J. Med. 320:271-277. 따라서, IgE에 대해 선정된 항체를 사용하여, 정상적인 면역 기능에 실질적인 영향을 미치지 않으면서 알레르기성 질환의 치료시 IgE의 수준을 낮추거나 또는 비만 세포 및 호염기성 세포에 대한 IgE 결합을 차단할 수 있다.

[0226] 또한, 항원은 숙주의 면역 반응을 촉발시키기 위한 항원으로서 이용할 수 있는 바이러스 표면 또는 코어 단백질 일 수 있다. 이들 바이러스 단백질의 예로는, 비제한적으로, 당단백질 (또는 표면 항원, 예컨대, GP120 및 GP41) 및 캡시드 단백질 (또는 구조 단백질, 예컨대, P24 단백질); A, B, C, D 또는 E형 간염 바이러스의 표면 항원 또는 코어 단백질 (예, B형 간염 바이러스의 소형 표면 항원 (SHBsAg) 및 C형 간염 바이러스의 코어 단백질

질, NS3, NS4 및 NS5 항원); 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)의 당단백질 (G-단백질) 또는 융합 단백질 (F-단백질); 헤르페스 심플렉스 바이러스 HSV-1 및 HSV-2의 표면 및 코어 단백질 (예, HSV-2의 당단백질 D)를 포함한다.

[0227]

또한, 항원은 자신의 종양 억제 기능을 상실한 돌연변이된 종양 억제자 유전자 산물일 수 있으며, 그래서 세포에게 암에 대한 보다 높은 감수성을 부여할 수 있다. 종양 억제자 유전자는 세포 증식 및 분열 주기를 저해하는 기능을 가진 유전자이므로, 신생물의 발생을 예방한다. 종양 억제자 유전자에서의 돌연변이는 세포가 저해 신호 네트워크의 하나 이상의 구성 요소를 무시하고, 세포 주기의 체크 포인트를 극복하여, 통제된 세포 증식-암 비율을 높이게 유발한다. 종양 억제자 유전자의 예로는, 비제한적으로, DPC-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 및 BRCA2를 포함한다. DPC-4는 췌장암에 관여하며, 세포 분열을 저해하는 세포질 경로에 참여한다. NF-1은 세포질 저해 단백질인 Ras를 저해하는 단백질을 코딩한다. NF-1은 신경계의 신경 섬유종과 갈색세포종 및 골수성 백혈병에 관여한다. NF-2는 수막종, 신경초종 및 신경계의 상의세포종에 관여하는 핵 단백질을 코딩한다. RB는 세포 주기의 주류 저해제인 핵 단백질 pRB 단백질을 코딩한다. RB는 망막모세포종 뿐만 아니라 골암, 방광암, 소세포성 폐암 및 유방암에 관여한다. p53은 세포 분열을 조절하며 세포자살을 유발할 수 있는 p53 단백질을 코딩한다. 매우 다양한 암들에서 p53의 돌연변이 및/또는 무활동성이 확인된다. WT1은 신장의 윌름 종양에 관여한다. BRCA1은 유방암과 난소암에 관여하며, BRCA2는 유방암에 관여한다. 따라서, 항체는 종양 발병 및 발생 경로에서 다른 단백질 또는 생화학적 물질들과 유전자 산물의 상호작용을 차단하는데 사용될 수 있다.

[0228]

항원은, 비제한적인 예로, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3시그마, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 α , CD8 β , CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD110-113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, CD129, CDw130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 및 TCR ζ 등의 CD 분자일 수 있다. 항원은 VEGF, VEGF 수용체, EGFR, Her2, TNF α , TNFRI 수용체, GPIIb/IIIa, IL-2R α 체인, IL-2R β 체인, RSV F 단백질, α 4 인테그린, IgE, IgE 수용체, 디곡신 (digoxin), 카펫 독사독 (carpet viper venom), 보체 C5, OPGL, CA-125 종양 항원, 스태필로코커스 단백질, 스태필로코커스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*) 단백질, 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 단백질, 스태필로코커스 (비제한적인 예로, 스태필로코커스 아우레우스 및 스태필로코커스 에피더미디스) 감염에 관여하는 단백질, IL-6 수용체, CTLA-4, RSV, IL-2 수용체의 Tac 서브유닛, IL-5 및 EpCam일 수 있다. 항원은 분자의 단편일 수 있다.

[0229]

유용한 2 특이성의 모 항체로는, 비제한적으로, 종양 세포 항원에 대한 항체와 항-Fc γ RI/항-CD 15, 항-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), 항-CD3/항-악성 B-세포 (1D10), 항-CD3/항-p185^{HER2}, 항-CD3/항-p97, 항-CD3/항-신장 세포 암종, 항-CD3/항-OVCAR-3, 항-CD3/L-D1 (항-대장암), 항-CD3/항-멜라노사이트 자극 호르몬 유사체, 항-EGF 수용체/항-CD3, 항-CD3/항-CAMA1, 항-CD3/항-CD19, 항-CD3/MoV18, 항-신경 세포 유착 분자 (NCAM)/항-CD3, 항-폴레이트 결합 단백질 (FBP)/항-CD3, 항-pan 암종 관련 항원 (AMOC-31)/항-CD3 등의 세포 독성 촉발제 분자에 대한 항체를 구비한, 2 특이성 항체; 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체와 항-사포린/항-Id-1, 항-CD22/항-사포린, 항-CD7/항-사포린, 항-CD38/항-사포린, 항-CEA/항-리신 A 체인, 항-인터페론- α (IFN- α)/항-하이브리도마 이디오타입, 항-CEA/항-빈카 알카로이드 등의 독소에 결합하는 다른 항체를 구비한, 2 특이성 항체; 항-CD30/항-알칼라인 포스파타제 (이것은 미토마이신 (mitomycin) 포스페이트 프로드럭의 미토마이신 알코올로의 변환을 촉매함) 등의 프로드럭을 활성화하는 변환 효소에 대한 2 특이성 항체; 항-피브린/항-조직 플라스미노겐 활성인자 (tPA), 항-피브린/항-우로키나제-타입의 플라스미노겐 활성인자 (uPA) 등의 피브린분해제로서 사용될 수 있는 2 특이성 항체; 항-저밀도 지단백질 (LDL)/항-Fc 수용체(예, Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII) 등의 세

포 표면 수용체로 면역 복합체를 타겟팅하는 2 특이성 항체; 항-CD3/항-헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV), 항-T-세포 수용체:CD3 복합체/항-인플루엔자, 항-Fc γ R/항-HIV 등의 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 2 특이성 항체; 항-CEA/항-EOTUBE, 항-CEA/항-DPTA, 항- 항-p185^{HER2}/항-헵텐 등의 시험관내 또는 생체내에서 종양을 검출하기 위한 2 특이성 항체; 백신 보강제로서의 2 특이성 항체 (Fanger, M W et al., Crit Rev Immunol. 1992; 12(34):101-24, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨); 및 항-토끼 IgG/항-페리틴, 항-호스 라디시 퍼옥시다제 (HRP)/항-호르몬, 항-소마토스타틴/항-물질 P, 항-HRP/항-FITC, 항-CEA/항- β -갈락토시다제 등의 진단 도구로서의 2 특이성 항체 (Nolan, O et R. O'Kennedy, Biochim Biophys Acta. 1990 Aug. 1; 1040(1):1-11, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)를 포함한다. 3중 특이성 항체의 예로는 항-CD3/항-CD4/항-CD37, 항-CD3/항-CD5/항-CD37 및 항-CD3/항-CD8/항-CD37을 포함한다.

[0230] 링커 및 페이로드

[0231] 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같이 반응성 기를 가진 변형된 아미노산을 포함한다. 당해 기술 분야의 당업자는 반응성 기를 사용하여, 폴리펩타이드를, 변형된 아미노산과 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 분자체에, 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 식 I, Ia, II, 1-30 또는 40의 화합물에 해당되는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드와 이에 연결된 페이로드를 포함하며, 선택적으로 폴리펩타이드와 페이로드 간의 연결 모이어티를 포함하는, 접합체를 제공한다.

[0232] 유용한 링커로는 본원에 기술된 것을 포함한다. 특정 구현예들에서, 링커는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 2가 또는 다가 링커이다. 일반적으로, 링커는 변형된 아미노산의 기능성 모이어티와 α 탄소에 공유 결합을 형성할 수 있다. 유용한 2가 링커로는 결합, 알킬렌, 치환된 알킬렌, 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌 및 치환된 헤테로아릴렌을 포함한다. 특정 구현예들에서, 링커는 C₁₋₁₀ 알킬렌 또는 C₁₋₁₀ 헤테로알킬렌이다.

[0233] 분자 페이로드는 당해 기술 분야의 당업자가 폴리펩타이드에 접합시키길 원하는 임의의 분자체일 수 있다. 특정 구현예들에서, 페이로드는 치료 모이어티이다. 이러한 구현예에서, 폴리펩타이드 접합체를 이용하여, 치료 모이어티를 이의 분자 타겟으로 타겟팅할 수 있다. 특정 구현예들에서, 페이로드는 표지성 모이어티이다. 이러한 구현예에서, 폴리펩타이드 접합체를 사용하여 폴리펩타이드의 이의 타겟으로의 결합을 검출할 수 있다. 특정 구현예들에서, 페이로드는 세포독성 모이어티이다. 이러한 구현예에서, 접합체는 질환에 걸린 세포, 예컨대 암 세포에 세포독성 모이어티를 타겟팅하여, 세포의 파괴 또는 제거를 개시할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 다른 분자 페이로드를 포함하는 접합체는 본원에 기술된 접합체의 범위에 포함된다.

[0234] 특정 구현예들에서, 접합체는 표지물질, 염료, 폴리머, 수용성 폴리머, 폴리메틸렌 글리콜, 폴리메틸렌 글리콜의 유도체, 광가교제 (photocrosslinker), 세포독성 화합물, 방사성 핵종 (radionuclide), 약물, 친화성 표지물질, 광친화성 표지물질, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이트, 조인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 수용성 덴드리머, 사이클로덱스트린, 저해성 리보핵산, 바이오물질, 나노입자, 스핀 표지물질, 형광단, 금속-함유 모이어티, 방사성 모이어티, 신규한 관능기, 다른 분자와 공유 결합으로 비-공유 결합으로 상호작용하는 기, 광케이지 (photocaged) 모이어티, 광이성체화성 모이어티, 바이오틴, 바이오틴의 유도체, 바이오틴 유사체, 중원자 (heavy atom)가 병합된 모이어티, 화학 절단성 기 (chemically cleavable group), 광 절단성 기 (photocleavable group), 연장된 측쇄, 탄소-연결된 당, 레독스-활성제 (redox-active agent), 아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소 표지된 모이어티, 생물물리학적 프로브 (biophysical probe), 형광성 기, 화학발광성 기, 전자 고밀도 기 (electron dense group), 자기성 기 (magnetic group), 인터칼레이팅 기 (intercalating group), 발색단, 에너지 전달제 (energy transfer agent), 생물학적 활성 물질, 검출가능한 표지물질, 소분자 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 페이로드를 가질 수 있다. 일 구현예에서, 페이로드는 표지물질, 염료, 폴리머, 세포독성 화합물, 방사성핵종, 약물, 친화성 표지물질, 수지, 단백질, 폴리펩타이드, 폴리펩타이드 유사체, 항체, 항체 단편, 금속 킬레이터, 조인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 펩타이드, 형광단 또는 탄소-연결된 당이다. 다른 구현예에서, 페이로드는 표지물질, 염료, 폴리머, 약물, 항체, 항체 단편, DNA, RNA 또는 펩타이드이다.

[0235] 유용한 약물 페이로드로는 임의의 세포독성제, 세포분열 억제제 또는 면역조절제를 포함한다. 세포독성제 또는 면역조절제의 유용한 부류로는, 예를 들어, 항튜불린제 (antitubulin agent), 아우리스타틴 (auristatin), DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 복제 저해제, 알킬화제 (예, 백금 복합체, 예컨대, 시스플라틴, 모노(백금), 비스

(백금) 및 트리-뉴클레어 (tri-nuclear) 백금 복합체 및 카보플라틴 (carboplatin), 안트라사이클린 (anthracycline), 항생제, 항엽산제 (antifolate), 항-대사산물제, 칼모둘린 저해제, 화학요법 감작제 (chemotherapy sensitizer), 두오카르마이신 (duocarmycin), 에토포시드 (etoposide), 불화 피리미딘, 이오노포어 (ionophore), 렉시트로핀 (lexitropsin), 메이탄시노이드 (maytansinoid), 니트로소우레아, 플라티놀 (platinol), 포어-형성 화합물 (pore-forming compound), 퓨린 항-대사산물제, 푸로마이신 (puromycin), 방사능 감작제 (radiation sensitizer), 라파마이신 (Rapamycin), 스테로이드, 탁산, 토포이소머라제 저해제, 빈카알칼로이드 등을 포함한다.

[0236]

개개 세포독성제 또는 면역조절제로는, 예를 들어, 안드로젠, 안트라마이신 (anthramycin, AMC), 아스파라기나제, 5-아자시티딘, 아자티오프린 (azathioprine), 블레오마이신 (bleomycin), 부설판 (busulfan), 부티오닌 설펍시민 (buthionine sulfoximine), 칼리케아미신 (calicheamicin), 칼리케아미신 유도체, 캄프토테신 (camptothecin), 카보플라틴 (carboplatin), 카르무스틴 (carmustine) (BSNU), CC-1065, 클로람부실 (chlorambucil), 시스플라틴 (cisplatin), 콜히친 (colchicine), 사이클로포스파미드, 시타라빈 (cytarabine), 시티딘 아라비노시드 (cytidine arabinoside), 시토크알라신 B (cytochalasin B), 다카르바진 (dacarbazine), 닥티노마이신 (dactinomycin) (종래의 액티노마이신임), 다우노루비신 (daunorubicin), 데카바진 (decabazine), DM1, DM4, 독세탁셀 (docetaxel), 독소루비신, 에토포시드, 에스트로젠, 5-플루오르데옥시우리딘, 5-플루오로우라실, 겐시타빈 (gemcitabine), 그라미시딘 D (gramicidin D), 하이드록시우레아, 이다루비신 (idarubicin), 이포스파미드 (ifosfamide), 이리노테칸 (Irinotecan), 로무스틴 (lomustine) (CCNU), 메이탄신, 메클로르에타민 (mechlorethamine), 멜팔란 (melphalan), 6-머캅토피린, 메토티렉세이트, 미트라마이신 (mithramycin), 미토마이신 (mitomycin) C, 미톡산트론 (mitoxantrone), 니트로이미다졸, 파클리탁셀, 펠리톡신 (palytoxin), 필카마이신 (plicamycin), 프로카비진 (procarbazine), 리족신 (rhizoxin), 스트렙토조톡신 (streptozotocin), 테노포시드 (tenoposide), 6-티오구아닌, 티오테파 (thiotepa), 토포테칸 (topotecan), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 비노렐빈 (vinorelbine), VP-16 및 VM-26을 포함한다.

[0237]

일부 구현예들에서, 적합한 세포독성제로는, 예를 들어, DNA 마이너 그루브 결합제 (예, 엔다이인 및 렉시트로핀 (lexitropsin), CBI 화합물; 또한, 미국 특허 6,130,237을 참조함), 두오카마이신 (duocarmycin), 탁산 (예, 파클리탁셀 및 독세탁셀 (docetaxel)), 푸로마이신 (puromycin), 빈카 알칼로이드, CC-1065, SN-38, 토포테칸 (topotecan), 모르폴리노-독소루비신, 리족신 (rhizoxin), 시아노모르폴리노-독소루비신, 에키노마이신 (echinomycin), 콤브레타스타틴 (combretastatin), 네트로핀 (netropsin), 에포틸론 (epothilone) A 및 B, 에스트라무스틴 (estramustine), 크립토피신 (cryptophycin), 세마도틴 (cemadotin), 메이탄시노이드 (maytansinoid), 디스코더몰라이드 (discodermolide), 엘루테로빈 (eleutherobin) 및 미톡산트론 (mitoxantrone)을 포함한다.

[0238]

일부 구현예들에서, 페이로드는 항-튜블린제이다. 항-튜블린제의 예로는, 비제한적으로, 탁산 (예로, Taxol[®] (파클리탁셀), Taxotere[®] (독세탁셀), T67 (Tularik) 및 빈카 알칼로이드 (예로, 빈크리스틴 (vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈데신 (vindesine) 및 비노렐빈 (vinorelbine))을 포함한다. 기타 항튜블린제로는, 예를 들어, 바카틴 유도체, 탁산 유사체, 에포틸론 (epothilone) (예로, 에포틸론 (epothilone) A 및 B), 노코다졸 (nocodazole), 콜히친 및 콜시미드 (colcimid), 에스트라무스틴 (estramustine), 크립토피신, 세마도틴, 메이탄시노이드, 콤브레타스타틴, 디스코더몰라이드 및 엘루테로빈을 포함한다.

[0239]

특정 구현예들에서, 세포독성제는 다른 그룹의 항-튜블린제인 메이탄시노이드이다. 예를 들어, 구체적인 구현예에서, 메이탄시노이드는 메이탄신 또는 DM-1일 수 있다 (ImmunoGen, Inc.; see also Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

[0240]

일부 구현예들에서, 페이로드는 아우리스타틴 E 또는 이의 유도체 등의 아우리스타틴이다. 예를 들어, 아우리스타틴 E 유도체는 아우리스타틴 E와 케토산 간에 에스테르가 형성될 수 있다. 예를 들어, 아우리스타틴 E는 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응하여, 각각 AEB 및 AEVB를 형성할 수 있다. 다른 전형적인 아우리스타틴 유도체로는 AFP, MMAF 및 MMAE를 포함한다. 아우리스타틴 유도체의 합성 및 구조는 미국 특허 공개공보 2003-0083263, 2005-0238649 및 2005-0009751; 국제 특허 공개공보 WO 04/010957, 국제 특허 공개공보 WO 02/088172, 및 미국 특허 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; 및 4,486,414에 기술되어 있다.

[0241]

일부 구현예들에서, 페이로드는 방사성 동위원소가 아니다. 일부 구현예들에서, 페이로드는 방사성 물질이 아

니다.

[0242] 일부 구현예들에서, 페이로드는 항대사산물이다. 항대사산물은, 예를 들어, 퓨린 길항제 (예로, 아조티오프린 (azothioprine) 또는 미코페놀레이트 모페틸 (mycophenolate mofetil), 다이하이드로폴레이트 리덕타제 저해제 (예로, 메토티렉세이트), 어사이클로비르 (acyclovir), 강사이클로비르 (gangcyclovir), 지도부딘 (zidovudine), 비다라빈 (vidarabine), 리바바린 (ribavarin), 아지도티미딘 (azidothymidine), 시티딘 아라비노시드 (cytidine arabinoside), 아만타딘 (amantadine), 다이데옥시우리딘, 요오도데옥시우리딘, 포스카르넷 (poscarnet), 또는 트리플루리딘 (trifluridine)을 포함한다.

[0243] 다른 구현예들에서, 페이로드는 타크롤리무스 (tacrolimus), 사이클로스포린 (cyclosporine), FU506 또는 라파마이신이다. 추가적인 구현예들에서, 약물은 알데스루킨 (aldesleukin), 알렘투주맵 (alemtuzumab), 알리트레티오인 (alitretinoin), 알로푸리놀 (allopurinol), 알트레타민 (altretamine), 아미포스틴 (amifostine), 아나스트로졸 (anastrozole), 비소 트리옥사이드, 벅사로텐 (bexarotene), 칼루스테론 (calusterone), 카페시타빈 (capecitabine), 셀레코싹 (celecoxib), 클라드리빈 (cladribine), 다르베포에틴 (Darbepoetin) alfa, 데니루킨 디프티톡스 (Denileukin diftitox), 텍스라죽산 (dexrazoxane), 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피루비신 (epirubicin), 에포에틴 (Epoetin) alfa, 에스트라무스틴 (estramustine), 엑세메스탄 (exemestane), 필그라스티 (Filgrastim), 플록스우리딘 (floxuridine), 플루다라빈 (fludarabine), 풀베스트란트 (Fulvestrant), 겐시타빈 (gemcitabine), 겐투주맵 (gentuzumab) 오조가미신 (ozogamicin) (MYLOTARG), 고세렐린 (goserelin), 이다루비신 (idarubicin), 이포스파미드 (ifosfamide), 이마티닙 메실레이트 (Imatinib mesylate), 인터페론 alfa-2a, 이리노테칸 (Irinotecan), 레트로졸 (Letrozole), 루코보린 (Leucovorin), 레바미솔 (levamisole), 메클로르에타민 (meclorothamine) 또는 니트로젠 머스타드 (nitrogen mustard), 메게스트롤 (megestrol), 메스나 (mesna), 메토티렉세이트, 메톡살렌 (methoxsalen), 미토마이신 (mitomycin) C, 미토탄 (mitotane), 난드로론 펜프로피오네이트 (nandrolone phenpropionate), 오프렐베킨 (oprelvekin), 옥살리플라틴 (Oxaliplatin), 파미드로네이트 (pamidronate), 페가데마제 (pegademase), 페가스파르가제 (pegaspargase), 페그필그라스티 (pegfilgrastim), 펜토스타틴 (pentostatin), 피포브로만 (pipobroman), 필카마이신 (plicamycin), 포르피머 (porfimer) 소듐, 프로카바진 (procarbazine), 퀴나크린 (quinacrine), 라스부리카제 (rasburicase), 리툭시맵 (rituximab), 사르그라마스티 (Sargramostim), 스트렙토죽신 (streptozocin), 타목시펜 (tamoxifen), 테모졸로미드, 테니포시드 (teniposide), 테스트라톤, 티오구아닌, 토레미펜 (toremifene), 토시투모맵 (tositumomab), 트라스투주맵 (trastuzumab) (헤르셉틴 (HERCEPTIN)), 트레티노인 (tretinoin), 우라실 머스타드, 발루비신 (valrubicin), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 비노렐빈 (vinorelbine) 또는 졸레드로네이트 (zoledronate)를 포함한다.

[0244] 일부 구현예들에서, 페이로드는 면역조절제이다. 면역조절제는, 예를 들어, 강사이클로비르, 에타너셉트 (etanercept), 타크롤리무스 (tacrolimus), 사이클로스포린, 라파마이신 (Rapamycin), 사이클로포스파미드, 아자티오프린 (azathioprine), 미코페놀레이트 모페틸 또는 메토티렉세이트일 수 있다. 다른 예로, 면역조절제는, 예를 들어, 글루코코르티코이드 (예로, 코르티솔 또는 알도스테론) 또는 글루코코르티코이드 유사체 (예, 프레드니손 (prednisone) 또는 텍사메타손)일 수 있다.

[0245] 일부 구현예들에서, 면역조절제는 항염증제, 예컨대, 아릴카복실릭 유도체, 피라졸-함유 유도체, 옥시캄 유도체 및 니코틴산 유도체이다. 항염증제의 부류로는, 예를 들어, 사이클로옥시게나제 저해제, 5-리폭시게나제 저해제 및 루코트리엔 수용체 길항제를 포함한다.

[0246] 적절한 사이클로옥시게나제 저해제로는 메클로페남산 (meclofenamic acid), 메페남산 (mefenamic acid), 카프로펜 (carprofen), 디클로페낙 (diclofenac), 디플루니살 (diflunisal), 펜부펜 (fenbufen), 페노프로펜 (fenoprofen), 인도메타신 (indomethacin), 케토프로펜 (ketoprofen), 나부메톤 (nabumetone), 설린닥 (sulindac), 테녹시캄 (tenoxicam) 및 톨메틴 (tolmetin)을 포함한다.

[0247] 적절한 리폭시게나제 저해제로는 레독스 저해제 (예로, 카테콜 부탄 유도체, 노르다이하이드로구아이하레트산 (NDGA), 마소프로콜 (masoprocol), 페니돈 (phenidone), 이아노팔렌 (Ilanopalen), 인다졸리논 (indazolinone), 나파자트롬 (naphazatrom), 벤조푸라놀 (benzofuranol), 알킬하이드록실아민), 및 비-레독스 저해제 (예로, 하이드록시티아졸, 메톡시알킬티아졸, 벤조피란 및 이의 유도체, 메톡시테트라하이드로피란, 보스웰산 (boswellic acid) 및 보스웰산의 아세틸화 유도체, 및 사이클로알킬 라디칼로 치환된 퀴놀린메톡시페닐아세트산) 및 레독스 저해제의 전구체를 포함한다.

[0248] 다른 적절한 리폭시게나제 저해제로는 항산화제 (예, 페놀, 프로필 갈레이트, 플라보노이드 및/또는 플라보노이

트를 함유한 천연 물질, 플라본의 하이드록시화된 유도체, 플라보놀, 다이하이드로케르세틴, 루테올린 (luteolin), 갈란긴 (galangin), 오로볼 (orobol), 칼콘의 유도체, 4,2',4'-트리하이드록시칼콘, ortho-아미노페놀, N-하이드록시우레아, 벤조푸라놀, 엡셀렌 (ebselen) 및 환원성 셀레노효소의 활성을 증가시키는 중), 철 킬레이트제 (예로, 하이드록삼산 및 이의 유도체, N-하이드록시우레아, 2-벤질-1-나프톨, 카테콜, 하이드록실아민, 카르노솔 트롤록스 (carnosol trolox) C, 카테콜, 나프톨, 설파살라진 (sulfasalazine), 자일루톤 (zyleuton), 5-하이드록시안트라닐산 및 4-(omega-아릴알킬)페닐알칸산), 이미다졸-함유 화합물 (예로, 케토코나졸 및 이트라코나졸), 페노티아진 (phenothiazine) 및 벤조피란 유도체를 포함한다.

[0249]

또 다른 적절한 리프시게나제 저해제로는, 에이코사노이드의 저해제 (예, 옥타데카테트라에노익산, 에이코사테트라에노익산, 도코사헥사에노익산, 에이코사헥사에노익산 및 이들의 에스테르, PGE1 (프로스타글란딘 E1), PGA2 (프로스타글란딘 A2), 비프로스톨 (viprostol), 15-모노하이드록시 에이코사테트라에노익산, 15-모노하이드록시-에이코사트리에노익산 및 15-모노하이드록시 에이코사헥사에노익산, 및 루코트리엔 B5, C5 및 D5), 칼슘 흐름을 간섭하는 화합물, 페노티아진, 다이페닐부틸아민, 베라파밀 (verapamil), 푸스코사이드 (fuscoside), 커쿠민 (curcumin), 클로로겐산 (chlorogenic acid), 카페인산 (caffeic acid), 5,8,11,14-에이코사테트라에노익산 (ETYA: 5,8,11,14-eicosatetrayenoic acid), 하이드록시페닐레탄아미드, 이오나팔렌 (Ionapalen), 에스쿨린 (esculin), 다이에틸카바마진, 펜안트로린 (phenantroline), 바이칼레인 (baicalein), 프록시크로밀 (proxicromil), 티오에테르, 다이알릴 설파이드 및 다이-(1-프로페닐) 설파이드를 포함한다.

[0250]

루코트리엔 수용체 길항제로는, 칼시트리올, 온타졸라스트 (ontazolast), Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, 엡셀렌 (ebselen), Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitomo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 및 Teijin TEI-1338을 포함한다.

[0251]

그외 유용한 약물 페이로드로는, 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예로는 에를로티닙 (Erlotinib) (TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.), 보르테조미브 (Bortezomib) (VELCADE[®], Millennium Pharm.), 풀베스트란트 (Fulvestrant) (FASLODEX[®], AstraZeneca), 수텐트 (Sutent) (SU11248, Pfizer), 레트로졸 (Letrozole) (FEMARA[®], Novartis), 이마티닙 메실레이트 (GLEEVEC[®], Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), 옥살리플라틴 (Oxaliplatin) (Eloxatin[®], Sanofi), 5-FU (5-플루오로우라실), 루코보린 (Leucovorin), 라파마이신 (Rapamycin) (시물리무스, RAPAMUNE[®], Wyeth), 라파티닙 (lapatinib) (TYKERB[®], GSK572016, Glaxo Smith Kline), 로나파르닙 (Lanaparnib) (SCH 66336), 소라페닙 (Sorafenib) (BAY43-9006, Bayer Labs) 및 게피티닙 (gefitinib) (IRESSA[®], AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), 알킬화제, 예로 티오테파 (thiotepa) 및 CYTOXAN[®] 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예로 부설판 (busulfan), 임프로설판 (improsulfan) 및 피포설판 (piposulfan); 아지리딘, 예로 벤조도파, 카르보쿠온 (carboquone), 메투레도파 (meturedopa), 및 우레도파 (uredopa); 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예로, 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라탁신 (bullatacin) 및 불라탁시논 (bullatacinone)); 캄프토테신 (camptothecin) (합성 유사체 토포테칸 (topotecan)을 포함함); 브리오스타틴 (bryostatins); 칼리스타틴 (callystatins); CC-1065 (이의 아도제레스신 (adozelesin), 카르젤레스신 (carzelesin) 및 바이젤레스신 (bizelesin) 합성 유사체를 포함함); 크립토포신 (특히 크립토포신 (cryptophycin) 1 및 크립토포신 (cryptophycin) 8); 돌라스타틴 (dolastatin); 듀오카르마이신 (duocarmycin) (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함함); 엘루테로빈 (eleutherobin); 판크라티스타틴 (pancratistatin); 사르코딕틴 (sarcodictyin); 스폰기스타틴 (spongistatin); 니트로젠 머스타드, 예컨대 클로람부실 (chlorambucil), 클로마파진 (chlomaphazine), 클로로포스파미드, 에스트라무스틴 (estramustine), 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란

(melphalan), 모뎀비신 (novembichin), 펜에스테린, 프레드무스틴 (prednimustine), 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로우레아, 예로 카르무스틴 (carmustine), 클로로조톡신, 포테무스틴 (fotemustine), 로무스틴 (lomustine), 니무스틴 (nimustine), 및 라넘누스틴 (ranimustine); 항생제, 예로, 엔다이엔 항생제 (예로, 칼리케아미신 (calicheamicin), 특히 칼리케아미신 gammall 및 칼리케아미신 omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); 디네미신 (dynemicin), 예로, 디네미신 (dynemicin) A; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (clodronate); 에스페라미신 (esperamicin); 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 크로모포어 (neocarzinostatin chromophore) 및 관련 크로모프로테인 엔다이엔 항생제 크로모포어), 아클라시노마이신 (aclacinomysin), 액티노마이신 (actinomycin), 오토라마이신 (authramycin), 아자세린, 블레오마이신 (bleomycin), 카티노마이신, 카라비신 (carabycin), 카미노마이신 (caminomycin), 카르지노필린 (carzinophilin), 크로모마이시니스 (chromomycinis), 닥티노마이신 (dactinomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 데토루비신 (detorubicin), 6-다이아조-5-옥소-L-노르루신, ADRIAMYCIN[®] (독소루비신), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피폴리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신, 에피루비신 (epirubicin), 에소루비신 (esorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 마르셀로마이신 (marcellomycin), 미토마이신 (mitomycin), 예로 미토마이신 (mitomycin) C, 미코페놀산, 노갈라마이신 (nogalamycin), 올리보마이신 (olivomycin), 페플로마이신 (peplomycin), 포르피로마이신 (porfiromycin), 푸로마이신 (puromycin), 퀘라마이신 (quelamycin), 로도루비신 (rodorubicin), 스트렙토니그린 (streptonigrin), 스트렙토족신 (streptozocin), 투베르시딘 (tubercidin), 우베니멕스 (ubenimex), 지노스타틴 (zinostatin), 조루비신 (zorubicin); 항-대사산물제, 예로 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴릭산 유사체, 예컨대 데노프테린 (denopterin), 메토크세이트, 프테로프테린 (pteropterin), 트리메토크세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈 (fludarabine), 6-머캅토피린, 티아미프린 (thiamiprine), 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈 (ancitabine), 아자시티딘 (azacitidine), 6-아자우리딘, 카르모푸르 (carmofur), 시타라빈 (cytarabine), 다이데옥시우리딘, 옥시플루리딘, 에노시타빈 (enocitabine), 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대, 칼루스테론 (calusterone), 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날린제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄 (mitotane), 트릴로스탄 (trilostane); 폴릭산 보충제 (replenisher), 예로 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미놀레블린산; 에닐우라실; 암사크린 (amsacrine); 베스트라부실 (bestrabucil); 비스안트렌 (bisantrene); 에다트렉세이트 (edatraxate); 데포파민 (defofamine); 데메콜린 (demecolcine); 다이아지쿠온 (diaziquone); 엘포르미틴 (elformithine); 엘립티늄 아세테이트 (elliptinium acetate); 에토틸론 (epothilone); 에토글루시드 (etoglucid); 갈륨 나이트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난 (lentinan); 로니다이닌 (lonidainine); 메이탄시노이드 (maytansinoid), 예컨대 메이탄신 및 안사미톡신 (ansamitocin); 미토구아존 (mitoguzone); 미톡산트론 (mitoxantrone); 모피단몰 (mopidanmol); 니트라에린 (nitraerine); 펜토스타틴 (pentostatin); 페나메트 (phenamet); 피라루비신 (pirarubicin); 로속산트론 (losoxantrone); 포도필린산 (podophyllinic acid); 2-에틸하이드라지드; 프로카바진 (procarbazine); PSK[®] 다당류 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신 (rhizoxin); 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산 (tenuazonic acid); 트리아지쿠온 (triaziquone); 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (trichothecene) (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘 (anguidine)); 우레탄; 빈데신 (vindesine); 다카르바진 (dacarbazine); 만노무스틴 (mannomustine); 미토브로니톨 (mitobronitol); 미토락톨 (mitolactol); 피포브로만 (pipobroman); 가시토신 (gacytosine); 아라비노시드 (arabinoside) ("Ara-C"); 사이클로포스파미드 (사이클로포스파미드); 티오테파 (thiotepa); 탁소이드, 예컨대, TAXOL[®] (파클리탁셀; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[®] (Cremophor-free), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE[®] (도세탁셀 (doxetaxel); Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실 (chlorambucil); GEMZAR[®] (gemcitabine); 6- 티오구아닌 (티오구아닌); 머캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 (cisplatin) 및 카보플라틴 (carboplatin); 빈블라스틴 (vinblastine); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론 (mitoxantrone); 빈크리스틴 (vincristine); NAVELBINE[®] (비노렐빈 (vinorelbine)); 노반트론 (novantrone); 테니포시드 (teniposide); 에다트렉세이트 (edatrexate); 다우노마이신 (daunomycin); 아미노프테린; 카페시타빈 (capecitabine) (XELODA[®]); 이반드로네이트 (ibandronate); CPT-11; 토포이소머라제 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대, 레티노익산; 및 전술한 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 및 유도체를 포함한다.

[0252]

다른 유용한 페이로드로는, (i) 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 모듈레이터 (SERM)과 같이 종양에 대한 호르몬 작용을 규제 또는 저해하도록 작용하는, 항-호르몬제, 예컨대, 타목시펜 (NOLVADEX[®]; 타목시펜 사이트레이트를 포함함), 랄록시펜 (raloxifene), 드롤록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜 (trioxifene), 케옥시펜 (keoxifene), LY117018, 오나프리스톤 (onapristone) 및 FARESTON[®] (토레미펜 사이트레이트); (ii) 부신에서의 에스트로겐 생산을 규제하는 효소 아로마타제를 저해하는, 아로마타제 저해제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE[®] (메게스테롤 아세테이트), AROMASIN[®] (엑세메스탄 (exemestane); Pfizer), 포르메스타니 (formestane), 파드로졸 (fadrozole), RIVISOR[®] (vorozole), FEMARA[®] (레트로졸 (Letrozole); Novartis), 및 ARIMIDEX[®] (아나스트로졸 (anastrozole); AstraZeneca); (iii) 항-안드로젠제, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 루프롤라이드 및 고세렐린 (goserelin); 뿐 아니라 트록사시타빈 (1,3-다이옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); (iv) 단백질 키나제 저해제; (v) 지질 키나제 저해제; (vi) 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히, 비정상적인 세포 증식과 연루된 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 저해하는 것, 예를 들어, PKC- α , Ralf 및 H-Ras; (vii) 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 저해제 (예로, ANGIOZYME[®]) 및 HER2 발현 저해제; (viii) 백신, 예컨대 치료 백신, 예를 들어, ALLOVECTIN[®], LEUVECTIN[®], 및 VAXID[®]; PROLEUKIN[®] rIL-2; 토포이소머라제 1 저해제, 예컨대 LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] rmRH; (ix) 항-혈관신생제, 예컨대, 베박시주맙 (bevacizumab) (아바스틴 (AVASTIN)[®], Genentech); 및 (x) 전술한 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 및 유도체를 포함한다. 그외 항-혈관신생제로는, MMP-2 (매트릭스-메탈로프로테나제 2) 저해제, MMP-9 (매트릭스-메탈로프로테나제 9) 저해제, COX-II (사이클로옥시게나제 II) 저해제 및 VEGF 수용체 티로신 키나제 저해제를 포함한다. 본 발명의 화합물/조성물과 조합하여 사용할 수 있는 이러한 유용한 매트릭스 메탈로프로테나제 저해제의 예들은 WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606,046, EP 931,788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, 미국 특허 5,863,949, 미국 특허 5,861,510, 및 EP 780,386에 기술되어 있으며, 이들 문헌들 모두 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. VEGF 수용체 티로신 키나제 저해제의 예로는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474; WO 01/32651의 실시예 2), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171; WO 00/47212의 실시예 240), 바탈라닙 (vatalanib) (PTK787; WO 98/35985) 및 SU11248 (서니티닙; WO 01/60814)과, PCT 특허 공개정보 WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856, 및 WO 98/13354에 기술된 것과 같은 화합물)을 포함한다.

[0253]

특정 구현예들에서, 페이로드는 항체 또는 항체 단편이다. 특정 구현예들에서, 페이로드 항체 또는 단편은 당해 기술 분야의 당업자들이 면역글로불린 유전자로 인지하는 것들 중 임의의 것에 의해 코딩될 수 있다. 면역글로불린 유전자로는, 비제한적으로, κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), δ , ω 및 μ 불변부 유전자 뿐만 아니라 면역글로불린 가변부 유전자를 포함한다. 이 용어는 당해 기술 분야의 당업자들이 인지하는 전장 항체 및 항체 단편을 포함한다. 단편의 예로는, 비제한적으로, Fv, Fc, Fab, 및 (Fab')₂, 단쇄 Fv (scFv), 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 2 기능성 하이브리드 폴리펩타이드, CDR1, CDR2, CDR3, CDR들의 조합물, 가변부, 프레임워크 영역, 불변부 등을 포함한다.

[0254]

특정 구현예들에서, 페이로드는 하나 이상의 수용성 폴리머이다. 매우 다양한 마크로분자 폴리머 및 기타 분자들을 본원에 기술된 폴리펩타이드와 연결함으로써, 폴리펩타이드의 생물 특성을 조절하거나, 및/또는 폴리펩타이드에 새로운 생물 특성을 부여할 수 있다. 이들 마크로분자 폴리머는 천연 코딩 아미노산, 비-천연 코딩 아미노산, 천연 아미노산의 임의의 기능적 치환, 변형된 아미노산의 임의의 기능적 치환, 또는 천연 또는 변형된 아미노산에 부가되는 임의의 치환기 또는 관능기를 통해, 폴리펩타이드에 연결될 수 있다. 이 폴리머의 분자량은 매우 광의의 범위일 수 있으며, 비제한적인 예로, 약 100 Da 내지 약 100,000 Da이거나 또는 그 이상을 포함한다.

[0255]

선택되는 폴리머는 이에 결합되는 단백질이 생리학적인 환경과 같은 수계 환경에서 석출되지 않도록, 수용성일 수 있다. 폴리머는 분지형이거나 비-분지형일 수 있다. 바람직하게는, 최종 산물 조제물의 치료학적 이용을 위해, 폴리머는 약제학적으로 허용가능할 것이다.

[0256]

특정 구현예들에서, 폴리에틸렌 글리콜 분자 : 폴리펩타이드 분자의 비율은, 반응 혼합물내 이의 농도로 달라질 것이다. 일반적으로, 최적비 (비반응성 단백질 또는 폴리머의 과잉이 최소인 반응의 효율 측면에서)는 선택되

는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량과 이용가능한 반응성 기의 수에 의해 결정될 수 있다. 분자량, 전형적으로, 폴리머의 분자량이 높을 수록, 단백질에 결합시키는 폴리머 분자의 수는 적을 수 있다. 마찬가지로, 폴리머의 분지 형성 (branching)은 이들 파라미터를 최적화하는 경우를 고려하여야 한다. 일반적으로, 분자량이 높을 수록 (또는 분지 수가 많을 수록), 폴리머:단백질 비가 높아진다.

[0257] 수용성 폴리머는 비제한적인 예로 선형, 포크형 또는 분지형 등의 임의의 구조 형태를 취할 수 있다. 전형적으로, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)와 같이 폴리(알킬렌 글리콜)이지만, 다른 수용성 폴리머도 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG를 사용하여 특정 구현예를 기술한다.

[0258] PEG는, 상업적으로 구입가능하거나 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법에 따라 에틸렌 글리콜의 개환 중합에 의해 제조할 수 있는, 널리 공지된 수용성 폴리머이다 (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, ACADEmic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). 용어 "PEG"는 광의적으로는 크기 또는 PEG의 말단 변형과의 무관하게 모든 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포괄하며, 식: $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ 에 의해 폴리펩타이드에 연결되는 것으로 표시될 수 있으며, 여기서 n 은 2 - 10,000이고, X 는 H 또는 말단 변형, 비제한적인 예로, C_{1-4} 알킬이다.

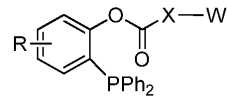
[0259] 일부 경우에, PEG는 한쪽 말단이 하이드록시 또는 메톡시로 종결되며, 즉, X 는 H 또는 CH_3 ("메톡시 PEG")이다. 다른 예로, PEG는 반응성 기로 종결되어, 2가지 기능의 폴리머를 형성할 수 있다. 전형적인 반응성 기로는, 통상적으로 20종의 일반 아미노산들에서 확인되는 관능기 (비제한적인 예로, 말레이미드 기, 활성화된 카보네이트 (비제한적인 예로, p-니트로페닐 에스테르), 활성화된 에스테르 (비제한적인 예로, N-하이드록시숙신이미드, p-니트로페닐 에스테르) 및 알데하이드)와 반응하는데 사용되는 반응성 기, 뿐만 아니라 비천연 코딩 아미노산에 존재하는 상보적인 관능기와 특이적으로 반응하지만 20종의 일반 아미노산에 대해서는 불활성인 관능기 (비제한적인 예로, 아지드 기, 알킨 기)들을 포함할 수 있다. 상기 식에서 Y로 표시되는 PEG의 다른 쪽 말단은, 직접, 또는 천연 코딩 아미노산 또는 비-천연 코딩 아미노산을 통해 폴리펩타이드에 간접적으로 부착될 것으로 언급된다. 예를 들어, Y는 폴리펩타이드의 아민 기 (비제한적인 예로, N-말단 또는 라이신의 엡실론 아민)에 대한 연결일 수 있다. 다른 예로, Y는 티올 기 (비제한적인 예로, 시스테인의 티올 기)에 대한 말레이미드 연결일 수 있다. 다른 예로, Y는 20종의 일반 아미노산을 통해서는 통상적으로 입수하기 어려운 잔기에 대한 연결일 수 있다. 예를 들어, PEG의 아지드 기는 폴리펩타이드의 알킨 기와 반응하여, 휘스젠 (3+2) 고리부가 산물을 형성할 수 있다. 다른 예로, PEG의 알킨 기는 본원에 기술된 변형된 아미노산과 같이 비천연 코딩 아미노산에 존재하는 아지드 기와 반응하여, 유사한 산물을 형성할 수 있다. 일부 구현예들에서, 강력한 친핵기 (비제한적인 예로, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민, 세미카바지드)는 비천연 코딩 아미노산에 존재하는 알데하이드 또는 케톤 기와 반응하여, 적용가능한 경우에 따라 하이드라존, 옥심 또는 세미카바존을 형성할 수 있으며, 일부 경우에는 이들은 적절한 환원제로 처리하여 추가로 환원시킬 수 있다. 다른 예로, 강력한 친핵기는 비천연 코딩 아미노산을 통해 폴리펩타이드에 병합될 수 있으며, 이를 이용하여 수용성 폴리머에 존재하는 케톤 또는 알데하이드 기와 우선적으로 반응시킬 수 있다.

[0260] PEG의 경우, 실무적인 필요에 따라, 비제한적인 예로, 약 100 달톤 (Da) - 100,000 Da 또는 적절한 경우 그 이상 (비제한적인 예로, 때때로 0.1-50 kDa 또는 10-40 kDa) 등의, 임의의 분자량이 사용될 수 있다. 비제한적인 예로, 각 체인의 MW 범위가 1-100 kDa (비제한적인 예로, 1-50 kDa 또는 5-20 kDa)인 PEG 분자 등의, 분지형 체인 PEG도 사용될 수 있다. 비제한적인 예로, Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog 등의, 매우 다양한 PEG 분자들이 개시되어 있으며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0261] 통상적으로, PEG 분자의 하나 이상의 말단이 비천연 코딩 아미노산과의 반응에 이용가능하다. 예를 들어, 아미노산 측쇄와의 반응을 위해 알킨 모이어티 및 아지드 모이어티를 가지고 있는 PEG 유도체를 이용하여, 본원에 기술된 비천연 코딩 아미노산에 PEG를 부착시킬 수 있다. 비천연 코딩 아미노산이 아지드를 포함한다면, PEG는 전형적으로 [3+2] 고리부가 산물 형성을 이행하기 위한 알킨 모이어티, 또는 아미드 결합의 형성을 이행하기 위한 포스핀 기를 함유한 활성화된 PEG 중 (즉, 에스테르, 카보네이트) 중 어느 하나를 함유할 것이다. 다른 예로, 비천연 코딩 아미노산이 알킨을 포함한다면, PEG는 전형적으로 [3+2] 휘스젠 고리부가 산물의 형성을 이행하기 위해 아지드 모이어티를 함유할 것이다. 비천연 코딩 아미노산이 카르보닐 기를 포함한다면, PEG는 전형적으로 대응되는 하이드라존, 옥심 및 세미카바존 연결을 각각 형성하기 위해, 강력한 친핵기 (비제한적인 예로, 하이드라지드, 하이드라진, 하이드록실아민 또는 세미카바지드 관능기)를 함유할 것이다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 반응성 기의 방향성 (orientation)의 역전이 적용될 수 있으며, 즉, 비천연 코딩 아미노산의 아지드 모이어티가 알킨을 함유한 PEG 유도체와 반응할 수 있다.

- [0262] 일부 구현예들에서, PEG 유도체를 가진 폴리펩타이드 변이체는 비천연 코딩 아미노산의 측쇄에 존재하는 화학적 관능기와 반응하는 화학적 관능기를 포함한다.
- [0263] 특정 구현예들에서, 페이로드는, 평균 분자량이 약 800 Da - 약 100,000 Da인 수용성 폴리머 백본을 포함하는, 아지드- 또는 아세틸렌-함유 폴리머이다. 수용성 폴리머의 폴리머 백본은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 비제한적인 예로, 폴리(에틸렌)글리콜 및 그외 관련 폴리머, 비제한적인 예로 폴리(텍스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜) 등의, 매우 다양한 수용성 폴리머들도, 사용하기 적합할 수 있으며, 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 사용은 이러한 분자들을 모두 망라하며 포괄하는 의도로, 이해되어야 한다. 용어 PEG는, 이의 모든 형태의 폴리(에틸렌 글리콜), 예컨대, 2관능성의 PEG, 멀티암의 PEG, 유도체화된 PEG, 포크형의 PEG, 분지형의 PEG, 펜던트형의 PEG (즉, PEG 또는 폴리머 백본에 하나 이상의 관능기가 펜던트화된 관련 폴리머), 또는 내부에 분해가능한 결합이 존재하는 PEG를 포함하나, 이들로 한정되지 않는다.
- [0264] 폴리머 백본은 선형이거나 분지형일 수 있다. 분지형 폴리머 백본은 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 분지형 폴리머는 중심 분지 코어 (central branch core) 모이어티와 이 중심 분지 코어에 연결된 복수의 폴리머 직쇄들을 가진다. PEG는 통상적으로는 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 펜타에리트리톨 및 소르비톨 등의 다양한 폴리올에 에틸렌 옥사이드를 부가함으로써 제조될 수 있는, 분지화된 형태로 사용된다. 상기 중심 분지 모이어티는 또한 라이신과 같은 몇몇 아미노산으로부터 유래될 수 있다. 분지형 폴리(에틸렌 글리콜)은 일반적으로 $R(-PEG-OH)_m$ 으로 표시될 수 있으며, R은 글리세롤, 글리세롤 올리고머 또는 펜타에리트리톨 등의 코어 모이어티로부터 유래되며, m은 암 (arm) 갯수이다. 미국 특허 5,932,462 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; 미국 특허 출원번호 2003/0143596; WO 96/21469; 및 WO 93/21259에 기술된 분자 등의 멀티-암의 PEG 분자는 폴리머 백본으로 사용될 수 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 그 전체가 포함된다.
- [0265] 또한, 분지형 PEG는 $PEG(-YCH_2)_n$ 으로 표시되는 포크형 PEG 형태일 수 있으며, 여기서 Y는 연결 기이고, Z는 지정된 길이의 원자 체인에 의해 CH에 연결된 활성화된 말단 기이다.
- [0266] 또 다른 분지형 형태, 펜던트형 PEG는, PEG 체인의 말단을 제외한 PEG 백본 전역에서 카르복실과 같은 반응성기를 가진다.
- [0267] 이러한 형태의 PEG 외에도, 폴리머는 백본에 약한 연결 또는 분해성 연결을 가지게 제조될 수 있다. 예를 들어, PEG는 가수분해될 수 있는 에스테르 연결을 폴리머 백본에 가지도록 제조될 수 있다. 본원에 도시된 바와 같이, 이들 가수분해를 통해 폴리머는 저 분자량의 단편으로 절단된다: $-PEG-CO_2-PEG-H_2O \rightarrow PEG-CO_2H+HO-PEG-$. 당해 기술 분야의 당업자라면, 용어 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG가, 비제한적인 예로, 본원에 기술된 것을 비롯하여, 당해 기술 분야에 공지된 모든 형태를 의미하거나 또는 포함한다는 것으로 숙지하고 있다.
- [0268] 또한, 다른 수많은 폴리머들도 사용에 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 2 - 약 300 termini의 수용성인 폴리머 백본이 특히 바람직하다. 적합한 폴리머의 예로는, 비제한적으로, 기타 폴리(알킬렌 글리콜), 예로, 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 이의 코폴리머 (비제한적인 예로, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 코폴리머), 이의 터폴리머, 이의 혼합물 등을 포함한다. 폴리머 각 체인의 백본의 분자량은 달라질 수 있지만, 전형적으로는 약 800 Da - 약 100,000 Da, 대개는 약 6,000 Da - 약 80,000 Da의 범위에 분포한다.
- [0269] 당해 기술 분야의 당업자라면, 전술한 실질적으로 수용성인 백본들은 이것만을 의미하지 아니며 주로 예로 기술된 것이며, 본원에 기술된 질적 특성을 갖춘 폴리머 물질들 모두 사용하기 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.
- [0270] 일부 구현예들에서, 폴리머 유도체는 "다관능성"이며, 이는 폴리머 백본이 2개 이상의 말단을 가지고 있으며, 가능하게는 관능기로 관능화되거나 활성화된 약 300개의 말단을 가진다는 것을 의미한다. 다관능성 폴리머 유도체로는, 비제한적으로, 각 말단에 동일하거나 상이할 수 있는 관능기가 결합되어 있는 말단 2개를 가진 선형 폴리머를 포함한다.
- [0271] 아지드 관능기는 선택적으로 아릴 에스테르를 함유하며 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화된 페이로드 모이어티와 반응하여, 아미드 결합을 형성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 인 시추에서 아지드를 환원시키며, 제조되는 아민은 이후 부근의 에스테르 결합과 효과적으로 반응하여 대응되는 아미드를 형성한다. 예로, E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)을 참조한다. 일부 구현예들에서, 아지드-함유 아미노산은 알킬 아지드 (비제한적인 예로, 2-아미노-6-아지도-1-헥사노익산) 또는 아릴 아지드 (p-아지도-페닐알라닌)이다.

[0272] 아릴 에스테르 및 포스핀 모이어티를 함유한 페이로드 모이어티의 예는 하기와 같이 표시될 수 있다:



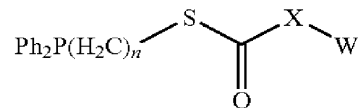
[0273]

[0274]

상기 식에서, X는 -O-, -NH-, -S- 또는 단일 결합이고, Ph는 페닐이고, W는 페이로드 모이어티이고, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기이다. R 기의 예로는, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -할로젠, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN 및 -NO₂를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''은 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 비제한적인 예로, 할로젠 1-3개로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬 기이다. 본원에 기술된 화합물이 R 기를 2 이상 포함한다면, 예를 들어, R 기 각각은, R', R'', R''' 및 R'''' 기들 중 2 이상이 존재하는 경우에는 각각의 R', R'', R''' 및 R'''' 기로서 선택된다. R' 및 R''이 동일한 질소 원자에 결합된 경우, 이들은 질소 원자와 조합하여, 5-, 6- 또는 7-원성 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R''은 1-피롤리딘 및 4-모르폴리닐을 포함하는 의미이지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 전술한 치환기 설명으로부터, 당해 기술 분야의 당업자는, 용어 "알킬"이 할로알킬 (비제한적인 예로, -CF₃ 및 -CH₂CF₃) 및 아실 (비제한적인 예로, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등) 등의 수소 기 이외의 다른 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 의미하는 것으로 이해할 것이다.

[0275]

또한, 아지드 관능기는 선택적으로 티오에스테르를 함유하며 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화된 페이로드 모이어티와 반응하여, 아마이드 결합을 형성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 아지드를 인 시추에서 환원시키며, 형성된 아민은 이후 티오에스테르 결합과 효율적으로 반응하여, 대응되는 아마이드를 형성한다. 티오에스테르와 포스핀 모이어티를 함유한 수용성 폴리머의 예는 다음과 같이 표시될 수 있다 :



[0276]

[0277]

상기 식에서, n은 1-10이고; X는 O, N, S이거나 또는 부재하며, Ph는 페닐이고, W는 페이로드 모이어티이다.

[0278]

일 구현예에서, 폴리머 유도체는 구조: X-A-PAY-B-알킬닐을 가지며, 여기서 B는 연결 모이어티로서, 이는 존재하거나 부재할 수 있으며; PAY는 페이로드 모이어티이고; A는 연결 모이어티로서 존재 또는 부재할 수 있으며, B와 동일하거나 상이할 수 있으며; X는 제2 관능기이다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 예로는 탄소 원자를 최대 18개, 더 바람직하게는 1-10개 포함하는 다-관능화된 알킬 기를 포함하나, 이들로 한정되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 이종원자도 알킬 체인과 함께 포함될 수 있다. 또한, 알킬 체인은 이종원자에서 분지화될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예로는, 탄소 원자를 최대 10개, 더 바람직하게는 5-6개 포함하는, 다관능화된 아릴 기를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 아릴 기는 하나 이상의 탄소, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기에 대한 다른 예로는 미국 특허 5,932,462; 5,643,575; 및 미국 특허 공개공보 2003/0143596에 기술된 연결 기가 있으며, 상기 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 당해 기술 분야의 당업자는, 연결 모이어티에 대한 상기한 리스트는 유일한 것이 아니며, 단지 예를 든 것이며, 본원에 기술된 질적 특성을 구비한 모든 연결 모이어티들이 사용하기 적합한 것으로 간주됨을 알 것이다.

[0279]

X로 사용하기 적합한 관능기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스테르, 예, N-하이드록시숙신이미드 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 카보네이트, 예, N-하이드록시숙신이미드 카보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 하이드레이트, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 설폰, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복시산, 보호된 카르복시산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설폰, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아미드, 에폭사이드, 글리옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄 및 케톤이 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 당해 기술 분야의 당업자들이 이해하는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는 알킬닐 기와의 반응이 이루어지지 않도록 알킬닐 기기와 양립가능하여야 한다. 알킬닐-함유 폴리머 유도체는 호모 2관능성일 수 있는데, 이는 제2 관능기 (즉, X) 역시도 알킬닐 모이어티라는 의미이며, 또한 상기 알킬닐-함유 폴리머 유도체는 헤테로 2관능성일 수 있는데, 이는 제2 관능기가 다른 관능

기라는 의미이다.

[0280] 용어 "보호된"은 특정 반응 조건에서 화학적으로 반응성인 관능기의 반응을 방지시키는 보호기 또는 모이어티가 존재한다는 의미이다. 보호기는 보호되는 화학적 반응성 기의 타입에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 만일 화학적 반응성 기가 아민 또는 하이드라지드이라면, 보호기는 tert-부틸옥시카르보닐 (t-Boc) 및 9-플루오레닐 메톡시카르보닐 (Fmoc)의 군으로부터 선택될 수 있다. 만일 화학적 반응성 기가 티올이라면, 보호기는 오르소 피리달다이설파이드일 수 있다. 만일 화학적 반응성 기가 부탄산 및 프로피온산과 같은 카르복시산 또는 하이드록시 기이라면, 보호기는 벤질, 또는 메틸, 에틸 또는 tert-부틸 등의 알킬 기일 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 다른 보호기들도 사용될 수 있다.

[0281] 문헌들에 기술된 말단 관능기에 대한 구체적인 예로는, N-숙신이미딜 카보네이트 (미국 특허 5,281,698, 5,468,478), 아민 (예, Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplisky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), 하이드라지드 (예컨대, Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), 숙신이미딜 프로피오네이트 및 숙신이미딜 부타노에이트 (예컨대, Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zaplisky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; 미국 특허 5,672,662), 숙신이미딜 숙시네이트 (예컨대, Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) and Joppich et al. Macrolol. Chem. 180:1381 (1979), 숙신이미딜 에스테르 (예컨대, 미국 특허 4,670,417), 벤조 트리아졸 카보네이트 (예컨대, 미국 특허 5,650,234), 글리시딜 에테르 (예컨대, Pitha et al. Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), 옥시카르보닐이미다졸 (예, Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)), p-니트로페닐 카보네이트 (예, Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), 알데하이드 (예, Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), 미국 특허 5,824,784, 미국 특허 5,252,714), 말레이미드 (예, Goodson et al. Bio/Technology 8:343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptide and Protein 2:29 (1984)), and Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), 오르소피리달-다이설파이드 (예, Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), 아크릴롤 (예, Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)), 비닐설폰 (예, 미국 특허 5,900,461)이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 전술한 참조문헌들과 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0282] 특정 구현예들에서, 폴리머 유도체는 구조: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ 알킬닐의 폴리머 백본을 포함하며, 여기서 X는 본원에 기술된 관능기이고; n은 약 20 - 약 4000이다. 다른 구현예에서, 폴리머 유도체는 구조: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-$ 알킬닐을 가진 폴리머 백본을 포함하며, 여기서 W는 탄소 원자를 1-10개 포함하는 지방족 또는 방향족 링커 모이어티이고; n은 약 20 - 약 4000이고; X는 본원에 기술된 관능기이고; m은 1 - 10이다. 적절한 관능기의 예로는, 비제한적으로, 하이드록실, 보호된 하이드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복시산, 보호된 카르복시산, 말레이미드, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 및 케톤을 포함한다.

[0283] 알킬닐-함유 PEG 유도체는 당해 기술 분야에 공지되거나 및/또는 본원에 기술된 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 알킬닐-함유 폴리머 유도체의 제조 방법에서, 알킬닐 관능기를 가지고 있는 연결 물질을 페이로드 모이어티와 접촉시키는데, 이때 연결 물질은 PEG 폴리머에 화학적 관능기와 선택적으로 반응하게 될 화학적 관능기를 가지고 있어, 알킬닐-함유 폴리머 유도체 산물을 형성하게 되고, 알킬닐은 연결 기에 의해 폴리머 백본으로부터 분리된다.

[0284] 반응식의 예를 본원에 나타낸다: $X-PEG-M+N-$ 링커-알킬닐- > $PG-X-PEG-$ 링커-알킬닐, 여기서 PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 알콕시 등의 캡핑기 또는 본원에 기술된 관능기이고; M은 알킬닐 관능기와는 반응하지 않지만, N 관능기와는 효율적이고 선택적으로 반응하게 되는, 관능기이다. 적절한 관능기에 대한 예로는, n이 아민인 경우, M은 카르복시산, 카보네이트 또는 활성 에스테르이고; n이 하이드라지드 또는 아미노옥시 모이어티인 경우 M은 케톤이고; n이 친핵기인 경우 M인 이탈기인 경우를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0285] 조산물의 정제는, 비제한적으로, 산물을 석출시킨 후 필요에 따라 크로마토그래피를 수행하는 등의, 공지 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0286] 보다 구체적인 예는, PEG 다이아민의 경우에 대해서 본원에 기술되며, 이 경우 아민 기 하나는 tert-부틸-Boc 등의 보호기 모이어티로 보호되며, 제조되는 모노-보호된 PEG 다이아민은 알킬닐 관능성을 가지고 있는 연결 모이어티: $BocHN-PEG-NH_2+HO_2C-(CH_2)_3-$ 알킬닐과 반응시킨다. 이 경우, 아민 기는 티오닐 클로라이드 또는 카르보

디이미드 시약 등의 다양한 활성화제와 N-하이드록시숙신이미드 또는 N-하이드록시벤조트리아졸을 이용하여 카르복시산 기와 커플링시켜, 모노아민 PEG 유도체와 알킬닐-함유 링커 모이어티 사이에 아마이드 결합을 형성시킬 수 있다. 아마이드 결합을 성공적으로 형성시킨 후, 제조된 N-tert-부틸-Boc-보호된 알킬닐-함유 유도체를 바로 사용하여 생활성 분자를 변형시키거나, 또는 추가로 조작하여 다른 유용한 관능기를 탑재할 수 있다. 예를 들어, N-t-Boc 기는 강산 처리에 의해 가수분해하여, 오메가-아미노-PEG-아지드를 형성할 수 있다. 수득되는 아민은 합성 핸들로서 사용하여, 말레이미드 기, 활성화된 다이설파이드, 활성화된 에스테르 및 유용한 헤테로 2 관능성 시약 구축을 위한 기 등의 다른 유용 관능기를 탑재할 수 있다.

[0287]

다른 구현예에서, 폴리머 유도체는 구조: $X-A-PAY-B-C\equiv C-R$ 를 가지며, 여기서 R은 H 또는 알킬, 알켄, 알킬옥시, 또는 아릴 또는 치환된 아릴 기일 수 있으며; B는 연결 모이어티로서, 존재하거나 존재하지 않을 수 있으며; PAY는 페이로드 모이어티이고; A는 연결 모이어티로서, 존재하거나 존재하지 않을 수 있으며, B와 동일하거나 상이할 수 있으며; X는 제2 관능기이다.

[0288]

A 및 B에 대한 연결 모이어티의 예로는 탄소 원자를 최대 18개, 더 바람직하게는 1-10개 포함하는 다-관능화된 알킬 기를 포함하나, 이들로 한정되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 이종원자도 알킬 체인과 함께 포함될 수 있다. 또한, 알킬 체인은 이종원자에서 분지화될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예로는, 탄소 원자를 최대 10개, 더 바람직하게는 5-6개 포함하는, 다관능화된 알릴 기를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 아릴 기는 하나 이상의 탄소, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기에 대한 다른 예로는 미국 특허 5,932,462; 5,643,575; 및 미국 특허 공개공보 2003/0143596에 기술된 연결기가 있으며, 상기 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 당해 기술 분야의 당업자는, 연결 모이어티에 대한 상기한 리스트는 유일한 것이 아니며, 단지 예를 든 것이며, 본원에 기술된 질적 특성을 구비한 매우 다양한 연결 모이어티들이 사용가능한 것으로 간주됨을 알 것이다.

[0289]

X로 사용하기 적합한 관능기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성화 에스테르, 예, N-하이드록시숙신이미드 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 카보네이트, 예, N-하이드록시숙신이미드 카보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 하이드레이트, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성화 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복시산, 보호된 카르복시산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아미드, 에폭사이드, 글리옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아세틸렌이 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 이해되는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는 아세틸렌 기와의 반응이 이루어지지 않도록 아세틸렌 기와 양립가능하여야 한다. 아세틸렌-함유 폴리머 유도체는 호모 2관능성일 수 있는데, 이는 제2 관능기 (즉, X) 역시도 아세틸렌 모이어티라는 의미이며, 또한 상기 알킬닐-함유 폴리머 유도체는 헤테로 2관능성일 수 있는데, 이는 제2 관능기가 다른 관능기라는 의미이다.

[0290]

다른 구현예에서, 폴리머 유도체는 구조 $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ 의 폴리머 백본을 포함하며, 여기서 X는 본원에 기술된 관능기이고; n은 약 20 - 약 4000이고; m은 1 - 10이다. 각각의 헤테로 2중 기능의 PEG 폴리머의 예들은 본원에 기술되어 있다.

[0291]

아세틸렌-함유 PEG 유도체는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 방법 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 한가지 방법으로, 제1 말단이 제1 관능기와 결합되어 있고 제2 말단이 적합한 친핵성 기와 결합되어 있는, 평균 분자량이 약 800 Da - 약 100,000 Da인 수용성 폴리머 백본을, PEG 상의 친핵성 기와의 반응에 적합한 이탈기 및 아세틸렌 관능기 둘다를 가지고 있는 화합물과 반응시킨다. 친핵성 모이어티를 가지고 있는 PEG 폴리머와 이탈기를 가지고 있는 분자가 결합하면, 이탈기는 친핵성 치환에 의해 친핵성 모이어티로 치환되어, 바람직한 아세틸렌-함유 폴리머: $X-PEG-Nu+L-A-C\rightarrow X-PEG-Nu-A-C\equiv CR'$ 가 된다.

[0292]

공지된 바와 같이, 상기 반응에 사용하기 바람직한 폴리머 백본은 식 $X-PEG-Nu$ 를 가지며, 여기서 PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, Nu는 친핵성 모이어티이고, X는 Nu, L 또는 아세틸렌 관능기와 반응하지 않는 관능기이다.

[0293]

Nu의 예로는, 비제한적으로, SN2-타입의 기전을 통해 주로 반응하는, 아민, 알콕시, 아릴옥시, 설프하이드릴, 이미노, 카르복실레이트, 하이드라지드, 아미노옥시 기들을 포함한다. Nu 기에 대한 추가적인 예로는 친핵성 부가 반응을 통해 주로 반응하는 관능기들을 포함한다. L 기의 예로는 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트, 및 친핵성 치환을 수행할 것으로 예상되는 그외의 기들 뿐만 아니라 케톤, 알데하이드, 티오에스테르, 올레핀, $\alpha-\beta$ 불포화 카르보닐 기, 카보네이트 및 그외 친핵기가 부가될 것으로 예상되는 친전자성 기를 포함한다.

- [0294] 다른 구현예에서, A는 탄소 원자가 1-10개인 지방족 링커 또는 탄소 원자 6-14개로 된 치환된 아릴 고리이다. X는 알킬닐 기와 반응하지 않는 관능기이고, L은 적정 이탈기이다.
- [0295] 아세틸렌-함유 폴리머 유도체를 제조하는 다른 방법으로, 평균 분자량이 약 800 Da - 약 100,000 Da이고, 보호된 관능기 또는 하나의 말단에 캡핑 물질 중 어느 하나와 적절한 이탈기를 가지고 있는, PEG 폴리머를, 아세틸렌 음이온과 접촉시킨다.
- [0296] 수용성 폴리머가 폴리펩타이드에 연결될 수 있다. 수용성 폴리머는, 폴리펩타이드에 병합된 비천연 코딩 아미노산을 통해, 또는 비천연 코딩 아미노산 또는 천연 코딩 아미노산의 임의의 관능기 또는 치환기, 또는 비천연 코딩 아미노산 또는 천연 코딩 아미노산에 부가된 임의의 관능기 또는 치환기를 통해, 연결될 수 있다. 일 구현예에서, 비천연 코딩 아미노산은 본원에 기술된 변형된 아미노산이다. 다른 예로, 수용성 폴리머는 항원-결합성 항체에 연결되어, 비천연 코딩 아미노산에 천연 아미노산 (예, 시스테인, 라이신 또는 N-말단 잔기의 아민기)을 병합시킨다. 일부 경우, 폴리펩타이드는 변형된 아미노산을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 포함하며, 이때 하나 이상의 비천연 코딩 아미노산(들)은 수용성 폴리머(들) (비제한적인 예로, PEG 및/또는 올리고당)과 연결된다. 일부 경우에, 폴리펩타이드는 수용성 폴리머와 결합된 천연 코딩 아미노산(들)을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 수로 더 포함한다. 일부 경우에, 폴리펩타이드는 수용성 폴리머가 결합된 하나 이상의 비천연 코딩 아미노산(들)과 수용성 폴리머가 결합된 하나 이상의 천연 아미노산을 포함한다. 일부 구현예들에서, 수용성 폴리머는 비접합 형태에 비해 폴리펩타이드의 혈청내 반감기를 증가시킨다.
- [0297] 폴리펩타이드에 결합되는 수용성 폴리머의 수 (즉, 폐길화 또는 당화 수준)는 약리학적 특성, 약동성 또는 약력성, 예컨대 생체내 반감기를 변형 (예, 증가 또는 감소)시키기 위해 조절할 수 있다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드의 반감기는 비변형 폴리펩타이드에 비해 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %, 2배, 5배, 10배, 50배, 또는 적어도 약 100배 증가된다.
- [0298] 일 구현예에서, 카르보닐-함유 비천연 코딩 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, PEG 백본과 직접 연결되는, 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카바지드 모이어티를 가진 PEG 유도체로 변형된다.
- [0299] 일부 구현예들에서, 하이드록실아민-말단 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0300] 일부 구현예들에서, 하이드라진- 또는 하이드라지드-함유 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재 또는 부재할 수 있는 카르보닐 기 ($C=O$)이다.
- [0301] 일부 구현예들에서, 세미카바지드-함유 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.
- [0302] 다른 구현예에서, 카르보닐-함유 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 아미드 결합을 이용하여 PEG 백본과 결합하는, 말단 하이드록실아민, 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카바지드 모이어티를 가진 PEG 유도체로 변형된다.
- [0303] 일부 구현예들에서, 하이드록실아민-말단 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0304] 일부 구현예들에서, 하이드라진- 또는 하이드라지드-함유 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ 를 가지며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재 또는 부재할 수 있는 카르보닐 기 ($C=O$)이다.
- [0305] 일부 구현예들에서, 세미카바지드-함유 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ 를 가지며, 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.
- [0306] 다른 구현예에서, 카르보닐-함유 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카바지드 모이어티를 가진 분지형 PEG 유도체로 변형되며, 분지형 PEG의 각 체인은 MW 범위

가 10-40 kDa, 더 바람직하게는, 5-20 kDa이다.

- [0307] 다른 구현예에서, 비천연 코딩 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 분지형 구조를 가진 PEG 유도체로 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예들에서, 하이드라진- 또는 하이드라지드-말단 PEG 유도체는 하기 구조: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 여기서 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재 또는 부재할 수 있는 카르보닐기 (C=O)이다.
- [0308] 일부 구현예들에서, 세미카바지드 기를 함유한 PEG 유도체는 구조: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S 또는 C(O)이거나, 존재하지 않거나, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.
- [0309] 일부 구현예들에서, 하이드록실아민 기를 함유한 PEG 유도체는 구조: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S 또는 C(O)이거나, 존재하지 않거나, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.
- [0310] 폴리펩타이드에 연결되는 수용성 폴리머(들)의 정도 및 위치는 폴리펩타이드의 항원 또는 수용체에 대한 결합성을 조절할 수 있다.
- [0311] 폴리머의 활성화 및 펩타이드의 접합 방법과 화학적 특성은 문헌들에 기술되어 있으며, 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 통상적으로 사용되는 폴리머 활성화 방법으로는, 비제한적으로, 시아노젠 브로마이드, 페리오데이트, 글루타르알데하이드, 바이에폭사이드, 에피클로로하이드린, 다이비닐설펜, 카르보다이미드, 설포닐 할라이드, 트리클로로트리아진, 등을 이용한 관능기의 활성화를 포함한다 (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 et al., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, ACADEMIC Press, N.Y.; Dunn, R. L., et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).
- [0312] PEG의 관능화 및 접합과 관련된 수종의 리뷰와 전공 논문들을 이용할 수 있다. 예, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong et al., Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995).
- [0313] 또한, 폴리머의 활성화 방법도 WO 94/17039, 미국 특허 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, 미국 특허 5,219,564, 미국 특허 5,122,614, WO 90/13540, 미국 특허 5,281,698, 및 WO 93/15189에서 찾아볼 수 있으며, 활성화된 폴리머와 효소 간의 접합 방법도, 비제한적인 예로, 접합 Factor VIII (WO 94/15625), 헤모글로빈 (WO 94/09027), 산소 운반 분자 (미국 특허 4,412,989), 리보뉴클레아제 및 슈퍼옥사이드 디스무타제 (Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)) 등과 같이 문헌에 기술되어 있다. 본원에 인용된 모든 참조 문헌들과 특허는 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0314] p-아지도-L-페닐알라닌과 같은 비천연 코딩 아미노산을 함유한 폴리펩타이드의 폐길화 (PEGylation) (즉, 임의의 수용성 폴리머의 부가)는 임의의 기존 방법에 의해 수행된다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 알킨-말단형 mPEG 유도체로 폐길화된다. 간략하게는, 과량의 고체 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH를 교반하면서, p-아지도-L-Phe-함유 폴리펩타이드의 수용액에 실온에서 첨가한다. 전형적으로, 이 수용액은, 반응이 수행되는 (일반적으로 약 pH 4-10) pH 근처의 pK_a를 가진 완충제로 완충화한다. pH 7.5에서의 폐길화를 위한 적정 완충제의 예로는, 비제한적으로, HEPES, 포스페이트, 보레이트, TRIS-HCl, EPPS 및 TES를 포함한다. pH는 계속적으로 체크하고, 필요에 따라 조절한다. 반응은 전형적으로 약 1-48시간 동안 계속적으로 이루어진다.
- [0315] 그런 후, 반응 산물을 소수성 상호작용의 크로마토그래피에 투입하여, 폐길화된 폴리펩타이드 변이체를 유리형 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH와 양쪽 말단에 비-차단된 PEG가 활성화되어 폴리펩타이드 변이체 분자들이 가교됨으로써 형성될 수 있는, 임의의 고분자량의 폐길화된 폴리펩타이드의 복합체로부터 분리시킨다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 조건은, 유리형 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH는 컬럼에서 통과하지만, 임의의 가교된 폐길화된 폴리펩타이드 변이체 복합체들은 하나 이상의 PEG 기와 접합된 폴리펩타이드 변이체 1분자 형태를 포함하는 원하는

형태가 용출된 이후에 용출되게 하는 조건이다. 적정 조건은 가교된 복합체 대 원하는 집합체의 상대적인 크기에 따라 달라지며, 당해 기술 분야의 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 원하는 집합체가 포함된 용출물은 한외여과에 의해 농축하고, 투석으로 탈염한다.

- [0316] 필요에 따라, 소수성 크로마토그래피에 의해 수득한 폐길화된 폴리펩타이드는, 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 한가지 이상의 공정에 의해 더욱 정제할 수 있으며, 그 예로는, 비제한적으로, 친화성 크로마토그래피; 음이온- 또는 양이온-교환 크로마토그래피 (비제한적인 예로, DEAE SEPHAROSE를 이용함); 실리카 상에서의 크로마토그래피; 역상 HPLC; 겔 여과 (비제한적인 예로, SEPHADEX G-75를 이용함); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기-배제 크로마토그래피, 금속-킬레이트 크로마토그래피; 한외여과/투석 여과; 에탄올 침강; 암모늄 설페이트 침강; 크로마토포커싱 (chromatofocusing); 디스플레이스먼트 (displacement) 크로마토그래피; 전기영동 공정 (비제한적인 예로, 분취용 등전점 포커싱 (preparative isoelectric focusing)), 차별적인 용해도 (비제한적인 예로, 암모늄 설페이트 침강), 또는 추출을 포함한다. 대략적인 분자량은 글로벌 단백질 표준 물질 (PROTEIN PURIFICATION METHODS, PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306)과 비교함으로써 GPC에 의해 추정할 수 있다. 폴리펩타이드-PEG 집합체의 순도는 단백질 분해 공정 (비제한적인 예로, 트립신 절단)을 이행한 후, 질량 분광측정 분석에 의해 분석할 수 있다. Pepinsky B., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).
- [0317] 폴리펩타이드의 아미노산에 연결되는 수용성 폴리머는, 비제한적인 예로, 더욱 유도체화되거나, 또는 치환될 수 있다.
- [0318] 다른 구현예에서, 폴리펩타이드는, 비천연 코딩 아미노산의 측쇄에 존재하는 알킨 모이어티와 반응하게 될 아지드 모이어티를 포함하는 PEG 유도체로 변형된다. 일반적으로, PEG 유도체는 1-100 kDa 범위의, 일부 구현예들에서, 10-40 kDa 범위의 평균 분자량을 가질 것이다.
- [0319] 일부 구현예들에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0320] 다른 구현예에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0321] 다른 구현예에서, 알킨-함유 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 분지형 PEG의 각각의 체인이 10-40 kDa, 더 바람직하게는, 5-20 kDa 범위의 MW를 가지며, 말단 아지드 모이어티를 포함하는, 분지형 PEG 유도체로 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예들에서, 아지드-말단 PEG 유도체는 하기 구조: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-N_3$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 각각의 경우에 존재하거나 부재할 수 있으며, 선택적으로 O, N, S 또는 카르보닐 기 (C=O)이다.
- [0322] 다른 구현예에서, 폴리펩타이드는, 본원에 기술된 변형된 아미노산 등의 비천연 코딩 아미노산의 측쇄에 존재하는 아지드 모이어티와 반응하게 될, 알킨 모이어티를 함유한 PEG 유도체로 변형된다.
- [0323] 일부 구현예들에서, 알킨-말단 PEG 유도체는 하기 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다 (즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0324] 다른 구현예에서, 알킨-함유 비천연 코딩 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 아마이드 결합을 이용하여 PEG 백본과 연결되는 말단 아지드 또는 말단 알킨 모이어티를 포함하는, PEG 유도체로 변형된다.
- [0325] 일부 구현예들에서, 알킨-말단 PEG 유도체는 하기 구조: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이다.
- [0326] 다른 구현예에서, 아지드-함유 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는, 분지형 PEG의 각각의 체인이 10-40 kDa, 더 바람직하게는, 5-20 kDa 범위의 MW를 가지며, 말단 알킨 모이어티를 포함하는, 분지형 PEG 유도체로 변형된

다. 예를 들어, 일부 구현예들에서, 알킨-말단 PEG 유도체는 하기 구조: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pC\equiv CH$ 를 가지게 될 것이며, 여기서, R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등)이고, m은 2-10이고, p는 2-10이고, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 O, N, S 또는 카르보닐 기 ($C=O$)이거나 생략된다.

[0327]

다른 구현예에서, 폴리펩타이드는, 비천연 코딩 아미노산의 측쇄에 존재하는 아지드 모이어티와 반응하게 될 아릴 포스핀 기를 추가로 포함하는 활성화된 관능기 (비제한적인 예로, 에스테르, 카보네이트)를 함유한, PEG 유도체로 변형된다. 일반적으로, PEG 유도체는 1-100 kDa, 일부 구현예들에서, 10-40 kDa 범위의 평균 분자량을 가질 것이다.

[0328]

폴리펩타이드에 연결시킬 수 있는 PEG 분자에 대한 다른 예와, 폐길화 방법으로는, 예컨대, 미국 특허 공개공보 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0027217; 2001/0021763; 미국 특허 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564; 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 5,382,657; 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461; 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339; 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,612,460; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860; 5,980,948; 6,004,573; 6,129,912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 및 EP 154 316에 언급된 것을 포함하며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 본원에 기술된 PEG 분자들 모두, 비제한적인 예로, 단쇄, 분지쇄, 멀티암 체인, 1관능성, 2관능성, 다관능성 또는 이들의 임의 조합 등의 임의 형태로 사용될 수 있다.

[0329]

특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 변형된 아미노산과 반응할 수 있는 하나 이상의 링커를 이용하여 페이로드와 연결시킬 수 있다. 하나 이상의 링커는 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 임의의 링커일 수 있다. 용어 "링커"는 본원에서 화학 반응의 결과로서 통상적으로 형성되며, 전형적으로 공유 결합인, 결합 또는 기를 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결은, 연결이 실질적으로 수중에서 안정적이어서, 사용가능한 pH 값, 예컨대 생리학적 조건에서 장기가, 아마도 심지어 무한정 물과 반응하지 않는다는 의미이다. 가수분해에 불안정하거나 분해성 연결은, 이 연결이 수중 또는 수용액 중에서, 예컨대, 혈중에서 분해될 수 있다는 의미이다. 효소적으로 불안정한 또는 분해성 연결은, 이 연결이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 의미이다. 당업계에 인지되는 바와 같이, PEG 및 관련 폴리머는 폴리머 백본이나 또는 폴리머 백본과 하나 이상의 폴리머 분자의 말단 관능기 사이에 존재하는 링커 기에 분해성 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, PEG 카르복시산 또는 활성화된 PEG 카르복시산과, 생물학적인 활성 물질의 알코올 기 간의 반응을 통해 형성되는 에스테르 연결은, 일반적으로, 생리 조건에서 가수분해되어, 상기 활성 물질이 분리된다. 그외 가수분해에 의해 분해가능한 연결로는, 비제한적으로, 카보네이트 연결; 아민과 알데하이드의 반응에 의해 형성되는 이민 연결; 알코올과 포스페이트 기의 반응에 의해 형성되는 포스페이트 에스테르 연결; 하이드라지드와 알데하이드의 반응 산물인 하이드라존 연결; 알데하이드와 알코올의 반응 산물인 아세탈 연결; 포스메이트와 알코올의 반응 산물인 오르소에스테르 연결; 비제한적인 예로 PEG 등이 폴리머 말단에 위치한 아민 기와 펩타이드의 카르복시 기에 의해 형성되는 펩타이드 연결; 및 비제한적인 예로, 폴리머의 말단에 위치한 포스포르아미디트 기와 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록시 기에 의해 형성되는 올리고뉴클레오타이드 연결을 포함한다. 분지형 링커도 폴리펩타이드에 사용될 수 있다. 다수의 다양한 절단성 링커들이 당해 기술 분야의 당업자에게 알려져 있다. 미국 특허 4,618,492; 4,542,225 및 4,625,014를 참조한다. 이들 링커 기술로부터 물질을 해리시키는 기전으로는, 예를 들어, 광취약성 결합의 보사 및 산-촉매화된 가수분해를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 4,671,958은, 생체내 타겟 부위에서 환자의 보체 시스템의 단백질분해 효소에 의해 절단되는 링커를 포함하는 면역접합체에 대한 내용을 포함할 수 있다. 이 링커의 길이는 폴리펩타이드와 이에 연결되는 분자 간의 바람직한 공간적인 상관성에 따라 선택되거나 또는 미리 결정될 수 있다. 다양한 방사성진단 화합물, 방사성치료 화합물, 약물, 독소 및 기타 물질을 폴리펩타이드에 결합시키는 보고된 매우 다양한 방법들에 비추어, 당해 기술 분야의 당업자들은 폴리펩타이드에 소정의 물질을 부착시키는 적합한 방법을 정할 수 있을 것이다.

- [0330] 임의의 헤테로- 또는 호모-2관능성의 링커를 사용하여, 접합체를 연결시킬 수 있다. 이러한 링커는 매우 다양한 범위의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. 폴리펩타이드와 연결되는 물질 간에 바람직한 공간적 상관성 또는 배위를 제공하도록, 분자량이 더 크거나 또는 작은 링커도 사용할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드와 연결되는 물질 간의 바람직한 공간 또는 유연성을 제공하기 위해, 분자량 길이가 더 길거나 또는 짧은 링커도 사용할 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩타이드가 이의 타겟에 도달하기 전 또는 도달한 이후에, 폴리펩타이드 또는 연결된 물질에 특수 형상 또는 배위를 부여하기 위해, 특정한 형상 또는 배위를 가진 링커를 이용할 수 있다. 링커의 각 말단에 존재하는 관능기는 폴리펩타이드 또는 페이로드가 원하는 조건에서 해리되도록 선택될 수 있다. 이러한 폴리펩타이드와 연결된 물질 간의 공간적인 상관성을 최적화함으로써, 분자에 새로운, 조절된 또는 바람직한 특성을 제공할 수 있다.
- [0331] 일부 구현예들에서, 본 발명은, a) 폴리머 백본의 적어도 제1 말단에 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민 또는 카르보닐-함유 모이어티; 및 b) 폴리머 백본의 제2 말단에 적어도 제2 관능기를 포함하는, 덤벨 구조를 가진 수용성의 2관능성 링커를 제공한다. 상기 제2 관능기는 제1 관능기와 동일하거나 상이할 수 있다. 제2 관능기는, 일부 구현예에서, 제1 관능기와 반응하지 않는다. 일부 구현예들에서, 1암 이상의 분지형 분자 구조를 포함하는 수용성 화합물이 제공된다. 예를 들어, 분지형 분자 구조는 수지상 구조 (dendritic structure)일 수 있다.
- [0332] 폴리펩타이드 조성물
- [0333] 본원에 기술된 폴리펩타이드는 당해 기술 분야에서 이용가능한 방법과 본원에 기술된 방법을 이용하여 조성물로 제형화할 수 있다. 본원에 기술된 임의의 화합물은 적절한 약학 조성물로 제공되어, 적정 투여 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0334] 특정 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드 조성물은, 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함한다. 담체는 약학 조성물과 함께 투여되는, 희석제, 부형제 또는 비히클일 수 있다. 이러한 약제학적 담체는 살균 액체, 예컨대 물 및 오일, 예로, 페트롤류, 동물, 식물 또는 합성 기원, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등일 수 있다. 염수 용액 (Saline solution), 텍스트로스 수용액 및 글리세롤 수용액도 액체 담체로서, 특히 주사용 용액으로서 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 슈크로스, 젤라틴, 말트, 라이스, 밀가루, 초크 (chalk), 실리카 겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 소듐 클로라이드, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은, 필요에 따라, 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충화제도 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용액제, 현탁제, 유제, 정제, 환제, 캡슐제, 산제, 서방형 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 경구 제형은 약제 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카보네이트 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예들은 E.W. Martin, 1990, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co에 기술되어 있다.
- [0335] 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 인간 개체에게 투여하기 적합한 형태로 제공된다. 일부 구현예들에서, 약학 조성물은, 환자에게 적절한 투여 형태를 제공하기 위해, 적량의 담체를 예방학적 또는 치료학적 유효량의 폴리펩타이드와 함께 포함할 것이다. 제형은 투여 방식에 적합하여야 한다.
- [0336] 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 정맥내 투여에 적합한 형태로 제공된다. 전형적으로, 정맥내 투여에 적합한 조성물은 무균 등장성의 수계 완충제 중의 용액이다. 필요에 따라, 조성물은 가용화제와, 그리고 주사 부위에 통증 약화를 위해 리그노카인 등의 국소 마취제를 함유할 수 있다. 그러나, 이들 조성물은 정맥내 투여 이외의 다른 경로로도 투여될 수 있다.
- [0337] 특정 구현예에서, 약학 조성물은 피하 투여에 적합할 수 있다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 근육내 투여에 적합할 수 있다.
- [0338] 약학 조성물의 성분들은, 예를 들어 동결건조시킨 건조 분말 또는 무수 농축물 (water free concentrate)과 같이, 분리되어 제공되거나 또는 단위 투약 형태로 혼합되어 제공될 수 있다. 조성물을 주입에 의해 투여하는 경우에는, 무균성의 약학 등급의 물 또는 염수가 든 주입 바틀로 분배될 수 있다. 조성물을 주사에 의해 투여하는 경우에는, 무균성의 주사용수 또는 염수가 든 앰플로 제공될 수 있으며, 투여하기 전에 성분들을 혼합할 수 있다.
- [0339] 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 개체에게 투여하는데 적합한 농도로 재구성할 수 있는 동결건조한 무균성 건조 분말로서 제공된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드는 무수 농축물로서 제공된다. 일부 구현예들에서,

폴리펩타이드는 적어도 0.5 mg, 적어도 1 mg, 적어도 2 mg, 적어도 3 mg, 적어도 5 mg, 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 30 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 적어도 60 mg 또는 적어도 75 mg의 단위 용량 (unit dosage)의 무균성 건조 분말로서 제공된다.

[0340] 다른 구현예에서, 약학 조성물은 액체 형태로 제공된다. 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 액체 형태로 제공되며, 계면활성제 및/또는 무기 염기가 실질적으로 함유되지 않는다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드는 단위 용량 적어도 0.1 mg/ml, 적어도 0.5 mg/ml, 적어도 1 mg/ml, 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 3 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/ml, 적어도 25 mg/ml, 적어도 30 mg/ml 또는 적어도 60 mg/ml으로, 액체 형태로 제공된다.

[0341] 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 염 형태로 제형화된다. 약제학적으로 허용가능한 염으로는 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 음이온과 같은 음이온과 형성된 염, 그리고 소듐, 포타슘, 암모늄, 칼슘, 패릭 하이드록사이드, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 양이온과 같은 양이온과 형성된 염을 포함한다.

[0342] 치료학적 용도에서, 실무자는 예방적 또는 치유적 처치와, 그리고 연령, 체중, 감염 단계 및 치료받게 될 개체의 다른 특이 인자에 따라, 가장 적절한 약량을 결정하게 될 것이다. 특정 구현예들에서, 투여량은 성인의 경우 1일 당 약 1 - 약 1000 mg이거나, 또는 성인의 경우 1일 당 약 5 - 약 250 mg, 또는 약 10 - 50 mg이다. 특정 구현예들에서, 투여량은 성인의 경우 1일 당 약 5 - 약 400 mg 또는 25 - 200 mg이다. 특정 구현예들에서, 약 50 - 약 500 mg/1일의 투약 비율도 고려된다.

[0343] *치료 또는 예방을 위한 이용 방법*

[0344] 본원에 제공되는 특정 폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자가 적합하다고 여겨지는 임의의 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 통상적으로, 치료 또는 예방 방법은 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 조성물을 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위해 이를 필요로 하는 개체에게 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0345] 폴리펩타이드 또는 이의 조성물의 치료학적 유효량은 특정 질환 또는 병태의 중증도, 지속 기간 및/또는 증상을 완화하는데 효과적인 함량이다. 특정 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 완화에 치료학적으로 효과적인 폴리펩타이드 또는 이의 조성물의 양은 표준 임상 기법으로 결정할 수 있다. 폴리펩타이드 또는 이의 조성물의 정확한 투여량은 부분적으로는 특정 질환 또는 병태의 투여 경로와 중증도에 따라 결정되지만, 실무자의 판단과 각 개체의 상황에 따라 결정되어야 한다.

[0346] 일부 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드의 유효량은 인간 개체의 체중 1 kg 당 약 0.025 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg이다. 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 인간 개체에게 약 1000 mg/(체중) kg 이하, 약 950 mg/(체중) kg 이하, 약 900 mg/(체중) kg 이하, 약 850 mg/(체중) kg 이하, 약 800 mg/(체중) kg 이하, 약 750 mg/(체중) kg 이하, 약 700 mg/(체중) kg 이하, 약 650 mg/(체중) kg 이하, 약 600 mg/(체중) kg 이하, 약 550 mg/(체중) kg 이하, 약 500 mg/(체중) kg 이하, 약 450 mg/(체중) kg 이하, 약 400 mg/(체중) kg 이하, 약 350 mg/(체중) kg 이하, 약 300 mg/(체중) kg 이하, 약 250 mg/(체중) kg 이하, 약 200 mg/(체중) kg 이하, 약 150 mg/(체중) kg 이하, 약 100 mg/(체중) kg 이하, 약 95 mg/(체중) kg 이하, 약 90 mg/(체중) kg 이하, 약 85 mg/(체중) kg 이하, 약 80 mg/(체중) kg 이하, 약 75 mg/(체중) kg 이하, 약 70 mg/(체중) kg 이하, 또는 약 65 mg/(체중) kg 이하의 양으로 투여된다.

[0347] 일부 구현예들에서, 본원에 제공되는 폴리펩타이드의 유효량은 인간 개체의 체중 1 kg 당 약 0.025 mg/kg 내지 약 60 mg/kg 이다. 일부 구현예들에서, 본원에 제공되는 약학 조성물의 폴리펩타이드의 유효량은 약 0.025 mg/kg 이하, 약 0.05 mg/kg 이하, 약 0.10 mg/kg 이하, 약 0.20 mg/kg 이하, 약 0.40 mg/kg 이하, 약 0.80 mg/kg 이하, 약 1.0 mg/kg 이하, 약 1.5 mg/kg 이하, 약 3 mg/kg 이하, 약 5 mg/kg 이하, 약 10 mg/kg 이하, 약 15 mg/kg 이하, 약 20 mg/kg 이하, 약 25 mg/kg 이하, 약 30 mg/kg 이하, 약 35 mg/kg 이하, 약 40 mg/kg 이하, 약 45 mg/kg 이하, 약 50 mg/kg 또는 약 60 mg/kg 이하이다.

[0348] 본 방법의 약학 조성물은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 약학 조성물은 근육내, 진피내, 복막내, 정맥내, 피하 투여, 또는 이들의 임의 조합으로 투여할 수 있다. 일부 구현예들에서, 약학 조성물은 피하로 투여된다. 일부 구현예들에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 구현예들에서, 조성물은 근육내로 투여된다.

- [0349] 검출 또는 진단을 위한 사용 방법
- [0350] 본원에 제공되는 폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자에게 적합하다고 여겨지는 임의의 질환 또는 병태를 진단하거나 또는 임의의 타겟을 검출하는데 사용할 수 있다. 본 방법은 적정 위치에서, 예를 들어, 적절한 신체, 조직 또는 세포에서 폴리펩타이드의 타겟과의 결합을 검출하는 것을 포함한다. 본 방법에서, 폴리펩타이드와 타겟 간의 복합체 형성은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그 예로는, 검출을 위해 2차 시약을 사용하는 분석, ELISA 분석, 면역침강 분석 및 응집 (agglutination) 분석을 포함한다. 이들 분석들에 대한 상세 설명은, 예를 들어, Harlow and Lane, Polypeptides: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612, W096/13590 to Maertens and Stuyver, Zrein et al. (1998) 및 W096/29605에 제시되어 있다.
- [0351] 인 시추 진단의 경우, 폴리펩타이드는, 폴리펩타이드와 아밀로이드 단백질의 에피토프 간의 특이적인 결합이 이루어질 수 있도록, 예를 들어 정맥내, 비강내, 복막내, 뇌내, 동맥내 주사와 같이, 당해 기술 분야에 공지된 방법으로 개체에게 투여할 수 있다. 폴리펩타이드/타겟 복합체는 폴리펩타이드에 부착되는 표지물질들을 통해 또는 임의의 다른 공지된 최신 검출 방법으로 쉽게 검출할 수 있다.
- [0352] 아울러, 본 발명은 검출 또는 진단용 키트를 제공한다. 예시적인 키트는 본원에 제공되는 하나 이상의 폴리펩타이드, 및 하나 이상의 폴리펩타이드와 이의 타겟 간의 복합체를 검출하는데 사용가능한 하나 이상의 시약을 포함한다.
- [0353] 변형된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드의 제조
- [0354] 본원에 기술된 폴리펩타이드는 비제한적인 예로 당해 기술 분야의 당업자에게 명확한 임의의 기법으로 제조할 수 있다. 사용가능한 제조 기법으로는, 예를 들어, 변형된 tRNA 및 tRNA 신테타제를 이용한 생체내 합성, 예를 들어 변형된 tRNA 및 tRNA 신테타제를 이용한 비-세포성 합성, 고상 폴리펩타이드 합성 및 액상 폴리펩타이드 합성을 포함한다. 기법의 예들은 이 섹션과 본원의 실시예들에 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드는 항체 또는 항체 단편이다.
- [0355] 특정 방법에서, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로부터 번역 및/또는 전사된다. 이에, 본 발명은, 하나 이상의 폴리펩타이드 체인내 부위-특이적인 위치에 변형된 아미노산을 하나 이상 가진 폴리펩타이드를 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 특정 구현예들에서, 폴리뉴클레오티드는, 변형된 아미노산의 부위-특이적인 폴리펩타이드 위치에 해당되는 폴리뉴클레오티드 위치에 존재하는 아미노산과 정상적으로 관련되지 않는 코돈을 포함한다. 상기한 코돈의 예로는 정지 코돈, 4 bp 코돈, 5 bp 코돈 등을 포함한다. 반응 혼합물은 전형적으로 상기 코돈과 상보적인 (상기 코돈을 억제하는) tRNA를 제조할 수 있는 tRNA 신테타제를 포함한다. 억제자 코돈의 위치에서 폴리펩타이드로 조합시키는 것을 용이하게 하기 위해, 이들 억제자 tRNA에 변형된 아미노산이 연결된다.
- [0356] 폴리펩타이드는, 폴리뉴클레오티드의 발현 분야의 당업자에게 공지된 기법에 의해 제조하여, 변형된 아미노산을 폴리펩타이드의 부위 특이적인 위치에 병합시킬 수 있다. 이러한 기법들은, 예를 들어, 미국 특허 제 7,045,337 및 7,083,970, 미국 특허 공개공보 2008/0317670, US 2009/0093405, US 2010/0093082, US 2010/0098630, US 2008/0085277, 및 국제 특허 공개공보 WO 2004/016778 A1 및 WO 2008/066583 A2에 기술되어 있으며, 이들 문헌은 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0357] 특정 구현예들에서, 폴리펩타이드는 변형된 아미노산으로 아미노아실화된 오르소고날 tRNA를 하나 이상 포함하는 비-세포성 반응 혼합물 중에서 제조할 수 있으며, 이때 오르소고날 tRNA는 정상적으로는 아미노산과 연관성이 없는 코돈, 예컨대 정지 코돈; 4 bp 코돈 등과 염기 쌍을 형성한다. 또한, 반응 혼합물은 변형된 아미노산으로 오르소고날 tRNA를 아미노아실화할 수 있는 tRNA 신테타제를 포함한다. 사용될 수 있는 tRNA 신테타제 한 가지는 미국 특허 공개공보 2008/0233611에서 서열번호 55 및 56으로 표시된다. 야생형 티로실 *m. janashcii* tRNA도 사용될 수 있다. 통상적으로, 박테리아 세포 추출물에 존재하는 프로테아제에 의한 분해에 감수성인 오르소고날 tRNA 신테타제를 외인적으로 합성하고, 이를 폴리펩타이드 합성 개시 전에 반응 믹스에 첨가한다. 오르소고날 tRNA는 세포 추출물을 수득하는 박테리아 세포에서 합성할 수 있거나, 폴리펩타이드 합성 반응 중에 신규 (de novo) 합성할 수 있거나, 또는 반응 믹스에 외부에서 첨가할 수 있다.
- [0358] 특정 구현예들에서, 선택적으로, 반응 혼합물에, 변형된 아미노산의 삽입 및 단백질 삽입 또는 폴딩 (folding)에 영향을 미치는 구성 성분을 첨가한다. 이들 구성 성분은, 방출 인자 1 및 2의 효과를 최소화하고, 오르소고날 구성 성분의 농도를 추가로 최적화하기 위해, 번역 인자들을 증가된 농도로 포함한다. 단백질 샤페론 (옥시

도리덕나테 및 이소머라제의 Dsb 시스템, GroES, GroEL, DNAJ, DNAK, Skp 등)을 반응 혼합물에 외부에서 첨가하거나, 또는 세포 추출물 제조에 사용되는 소스 세포에서 과발현시킬 수 있다. 반응은 대규모 반응기, 소규모 반응기를 이용하거나, 또는 복수의 동시 합성을 수행하기 위해 멀티플렉스(multiplex)화할 수 있다. 연속 반응들은 시약의 흐름을 도입하기 위해 공급 메커니즘을 이용할 것이며, 프로세스의 일부로서 최종 산물을 분리할 수 있다. 배치 시스템도 또한 대상이며, 이 경우 추가적인 시약들을 투입하여 활성 합성 기간을 지속시킬 수 있다. 반응기는 배치, 확장형 배치, 세미-배치, 반-연속식, 피드-배치식 및 연속식 등의 임의 방식으로 운영될 수 있으며, 본 출원 목적에 따라 선택될 것이다. 반응은 임의 체적의 반응, 소규모, 통상 약 1 μ l 이상 약 15 μ l 이하, 또는 규모 확장식 반응일 수 있으며, 이 경우 반응 체적은 약 15 μ l 이상, 통상 약 50 μ l 이상, 통상 약 100 μ l 이상이며, 500 μ l 이상, 1000 μ l 이상일 수 있다. 원칙적으로, 반응은 필요시 충분한 산소 (또는 다른 전자 어셉터)가 공급되는 한 임의의 규모로 수행할 수 있다.

[0359] 하나 이상의 변형된 아미노산을 연장시 폴리펩타이드 가닥에 도입하는 유용한 합성 방법으로는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: (I) 비-세포성 반응에, 외래 정제된 오르소고날 신테타제, 변형된 아미노산, 및 오르소고날 tRNA의 첨가, (II) 반응 혼합물에 외래 정제된 오르소고날 신테타제 및 변형된 아미노산의 첨가, 비-세포성 반응시에는 오르소고날 tRNA로 전사함, (III) 반응 혼합물에 외래 정제된 오르소고날 신테타제 및 변형된 아미노산의 첨가, 오르소고날 tRNA는 세포 추출 소스 유기체에 의해 합성됨. 특정 구현예들에서, 오르소고날 구성 성분들은 제어가능한 프로모터에 의해 구동되며, 그래서 첨가 또는 특이적인 절단 (specific digestion)에 의한 관련 DNA 주형의 레벨 조절 등의 같은 다른 조치들이 사용될 수 있지만, 합성 수준은 조절될 수 있다.

[0360] 특정 구현예들에서, tRNA 합성은 외부에서 합성되어, 비-세포성 반응 믹스에 첨가된다. 특정 구현예들에서, 반응 믹스는 ompT가 불활성화되거나 또는 천연적으로 불활성인 박테리아 세포에서 준비된다. ompT는 tRNA 신테타제 등의 반응 혼합물의 구성 성분을 분해하는 것으로 생각된다.

[0361] 무-세포성 추출물, 유전자 주형 및 아미노산 등의 상기한 구성 성분들 외에도, 단백질 합성에 특히 필요한 물질들이 반응에 첨가될 수 있다. 이들 물질로는 염, 폴린산, 사이클릭 AMO, 단백질 또는 핵산 분해 효소의 저해제, 단백질 합성의 저해제 또는 조절제, 산화/환원 전위(들)의 조절제, 비-변성 계면활성제, 완충제 구성 성분, 스페르민, 스페르미딘, 푸트레신 (putrescine) 등을 포함한다.

[0362] 상기 염은, 바람직하게는, 포타슘 염, 마그네슘 염 및 암모늄 염 (예, 아세트산 또는 글루탐산의 염)을 포함한다. 이들 염들 중 하나 이상은 반대 음이온으로서 대체 아미노산을 가질 수 있다. 이온 종들 간에는 농도 최적화를 위해 상호 의존성이 존재한다. 이들 이온 종들은 전형적으로 단백질 생산에 대해 최적화된다. 반응 매질의 특정 구성 성분의 농도를 바꾸었을 때, 다른 구성 성분의 농도도 그에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 등의 수종의 구성 성분의 농도 및 에너지 소스 화합물의 농도는 다른 구성 성분의 농도 변화에 따라 동시에 조절될 수 있다. 또한, 반응기내 구성 성분들의 농도 수준은 경시적으로 달라질 수 있다. 산화/환원 전위의 조절제는 다이티오프레이톨, 아스코르브산, 글루타티온 및/또는 이의 산화된 형태일 수 있다.

[0363] 특정 구현예들에서, 반응은 투석 방식, 투석여과 배치 방식, 피드-패치 방식 또는 반-연속식 조작 방식으로 진행될 수 있다. 특정 구현예들에서, 공급 용액은 멤브레인 또는 주입 유닛을 통해 반응기로 공급될 수 있다. 합성된 폴리펩타이드는 반응기에 축적될 수 있으며, 이후 시스템 작동 완료 후 분리 또는 정제할 수 있다. 폴리펩타이드를 함유한 베지클 (vesicle)도 연속적으로 분리할 수 있으며, 예를 들어 인 시추에서 또는 반응 유체가 흡착 매트릭스를 통과하도록 펌핑되는 순환 루프에서 반응 혼합물로부터 친화성 흡착에 의해 연속 분리할 수 있다.

[0364] 반응기에서 단백질을 합성하는 동안엔, 원하는 단백질을 선택적으로 분리하는 단백질 분리 수단은 합성된 원하는 단백질을 흡착하기 위한 폴리펩타이드 분자 또는 기타 분자로 코팅된 입자가 충전된 유닛을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 단백질 분리 수단은 교차 사용가능한 2개의 컬럼을 포함한다.

[0365] 수득되는 폴리펩타이드는 표준 기법으로 정제 또는 분리할 수 있다. 기법의 예는 본원에 실시예에 제시된다.

[0366] 분석 방법

[0367] 폴리펩타이드는 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 임의의 분석에 의해 이의 예상 활성 또는 새로운 활성에 대해 분석할 수 있다. 수득되는 폴리펩타이드는 기능 분석에서 활성을 분석하거나 또는 비-기능 분석, 예컨대 면역염색, ELISA, 또는 코마시 또는 은 염색 겔에서의 정량화로 존재하는 단백질의 양을 정량하고, 총 단백질에 대한 생물 활성 단백질의 비율을 결정함으로써, 분석할 수 있다.

[0368] 번역 반응에서 생산되는 단백질의 양은 다양한 방식으로 측정할 수 있다. 한가지 방법은 번역되는 특정 단백질

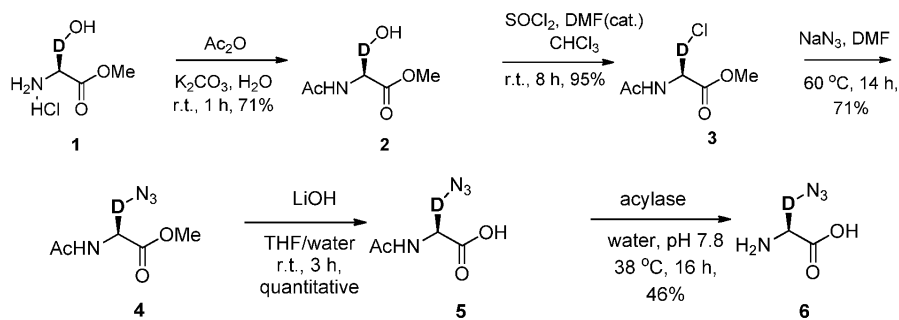
의 활성을 측정하는 분석의 이용성에 좌우된다. 단백질 활성을 측정하는 분석의 일 예는 루시퍼라제 분석 시스템 또는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 분석 시스템이다. 이들 분석은 번역 반응에서 생산된 기능적으로 활성인 단백질의 양을 측정한다. 활성 분석은 단백질의 잘못된 폴딩 또는 단백질 활성에 필요한 그외 번역 후 변형 결핍으로 인해 불활성인 전장 단백질은 측정하지 못 할 것이다.

[0369] 커플링된 시험관내 전사 및 번역 반응에서 생산되는 단백질의 양을 측정하는 다른 방법은, ^{35}S -메티오닌, ^3H -루신 또는 ^{14}C -루신 등의 방사성 표지된 아미노산의 기지량을 이용하여 반응을 수행한 다음, 새롭게 번역된 단백질에 병합된 방사성 표지된 아미노산의 양을 측정하는 것이다. 병합 분석은, 절단된 단백질 산물을 비롯하여, 시험관내 번역 반응에서 생산되는 모든 단백질에서 방사성 표지된 아미노산의 양을 측정하게 될 것이다. 방사성 표지된 단백질은 추가로 단백질 겔 상에서 분리시키고, 방사선 자동 촬영법에 의해, 그 산물이 적정 크기를 가지는지, 이차적인 단백질 산물이 생산되지 않았는지를 검증할 수 있다.

[0370] 변형된 아미노산의 제조

[0371] 본 발명에 제공되는 화합물은, 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 임의의 방법으로 제조, 분리 또는 수득할 수 있다. 본 발명에 제공되는 화합물은 본원에 제시된 일반 제조 공정에 따라 제조할 수 있다. 일반 제조 공정에 제시되지 않은 반응 조건, 단계 및 반응산물들은 당해 기술 분야의 당업자에게 자명하며 공지되어 있을 것이다.

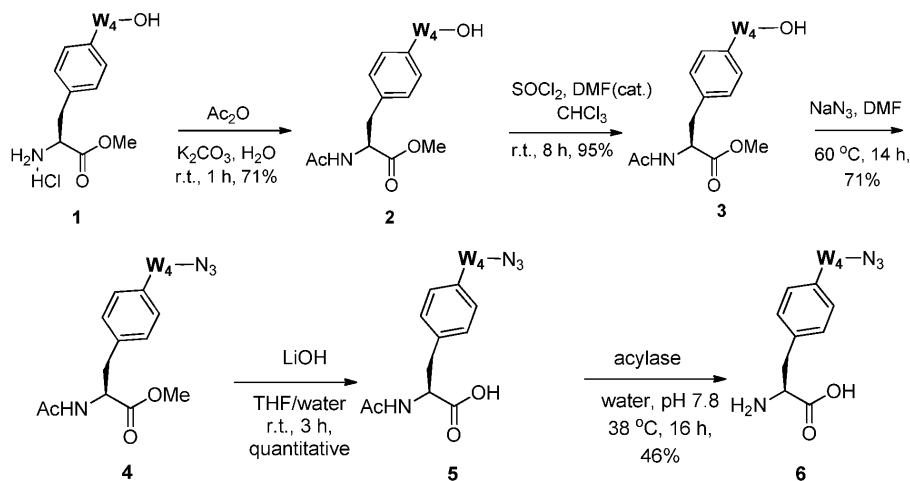
[0372] 일반 제조 공정 1a



[0373]

[0374]

일반 제조 공정 1b



[0375]

[0376] 일반 제조 공정 1a에서, D는 식 I에 기술된 바와 같이 정의된다. 일반 제조 공정 1b에서, W₄는 식 II에 기술된 바와 같이 정의된다.

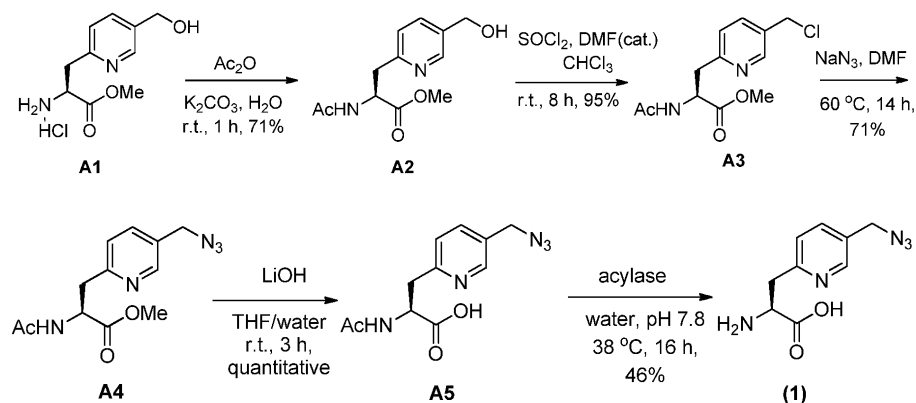
[0377] 실시예

[0378] 본원에서, 공정, 반응 및 실시예들에서 사용되는 기호 및 관용어들은, 특정 약어들이 구체적으로 정의되었는지 여부와 상관없이, 당대 과학 문헌, 예컨대 the Journal of Biological Chemistry에 사용되는 바와 일치된다.

하기 전체 실시예들에서, 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지된 표준 워크-업 및 정제 방법들이 이용될 수 있다. 달리 언급되지 않은 한, 온도들은 모두 ℃ (섭씨)로 표시된다. 방법들 모두 달리 언급되지 않은 한 실온에서 수행된다.

실시예 1

2-아미노-3-(5-아지도메틸-피리딘-2-일)-프로피온산 (1)



화합물 A2의 제조

무수 아세트산 (0.42 mL, 4.5 mmol, 1.1 eq)을 **A1** (HCl 염, 1.0 g, 4.1 mmol, 1 eq)과 K_2CO_3 (1.18 g, 8.6 mmol, 2.1 eq)의 수용액 (20 mL)에 실온에서 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 회전식 증발기에서 물을 제거하고, 잔류물에 메탄올을 처리하였다. 고형물은 여과 제거하였다. 메탄올 용액을 농축하고, 잔류물을 FCC (MeOH/DCM = 1/10)로 정제하여, 아세트아미드 **A2** (0.73 g, 71%)를 백색 고형물로서 수득하였다. LCMS m/z : 253 (M+1).

화합물 A3의 제조

티오닐 클로라이드 (0.32 mL, 4.3 mmol, 1.5 eq)를 아세트아미드 **A2** (0.73 g, 2.9 mmol, 1 eq)와 DMF (22 μL , 0.29 mmol)의 CHCl_3 (25 mL) 용액에 실온에서 서서히 첨가하였다. 4시간 후, 추가의 SOCl_2 (80 μL , 1.1 mmol)를 첨가한 다음, 혼합물을 다시 4시간 교반하였다. 반응 혼합물을 CHCl_3 (50 mL)로 희석한 다음, 포화 NaHCO_3 로 행구었다. 수층을 CHCl_3 로 2회 추출하였다. 유기 층을 조합하여 MgSO_4 상에서 건조하였다. 조산물 **A3** (0.74 g, 95%)는 다음 반응에 바로 사용하였다. LCMS m/z : 271 (M+1).

화합물 A4의 제조

DMF (20 mL) 중의 클로라이드 **A3** (1.33 g, 4.9 mmol, 1 eq), NaN_3 (0.64 g, 9.8 mmol, 2 eq) 및 NaI (73 mg, 0.49 mmol, 0.1 eq) 혼합물을 60°C 에서 15시간 동안 교반하였다. 그런 후, 반응 혼합물을 농축하여 건조시켰다. 이 조산물을 FCC (EA)로 정제하여, 아지도-산물 **A4** (0.95 g, 71%)를 수득하였다. LCMS m/z : 278 (M+1).

화합물 A5의 제조

$\text{THF}/\text{물}$ (6 mL / 3 mL) 중의 메틸 에스테르 **A4** (0.95 g, 3.4 mmol, 1 eq) 및 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.29 g, 6.8 mmol, 2 eq) 혼합물을 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 혼합물을 1 N HCl 을 사용하여 pH 7로 중화한 다음, 농축시켜 건조하였다. 조산물 **A5** (~0.91 g, 정량)는 다음 반응에 바로 사용하였다. LCMS m/z : 264 (M+1), 262 (M-1).

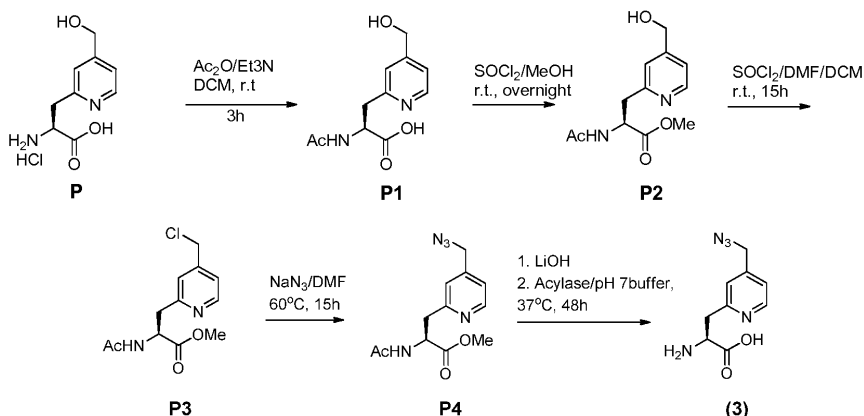
화합물 (1)의 제조

아실라제 I (100 mg, Sigma, A3010, Grade I)을 아세트아미드 **A5** (0.91 g, 3.4 mmol) 수용액 (60 mL)에 첨가하였다. 이 용액의 pH를 7.8로 1 N 수성 리튬 하이드록사이드 용액을 사용하여 조정하였다. 반응 혼합물을 38°C 에서 16시간 교반하였다. 활성 탄소 (2 g)를 첨가하여, 용액을 10분 간 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하였다. 여과물을 약 20 mL로 농축하고, 바로 HPLC에 의한 정제에 사용하였다. 순수 산물 **(1)**이 포함

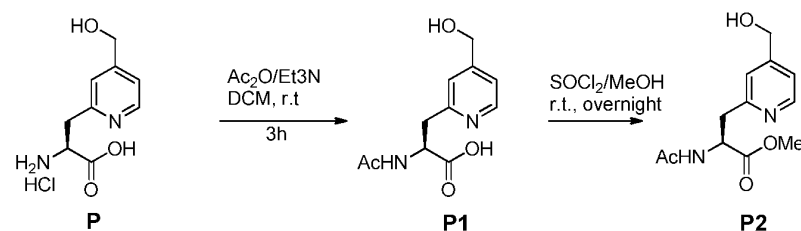
된 분획들을 합하여, 농축시켜 건조하였다. 최종 샘플은 동결건조에 의해 건조하여, 아미노-산 (1) (0.35 g, 46%)을 백색 분말로서 수득하였다. LCMS m/z : 222 (M+1), 220 (M-1). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 8.36 (s, 1H), 7.71 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.36(s, 2H), 3.98 (dt, J = 2.7 and 6.5 Hz, 1H), 3.32-3.16 (m, 2H).

실시예 2

화합물 (3)의 제조

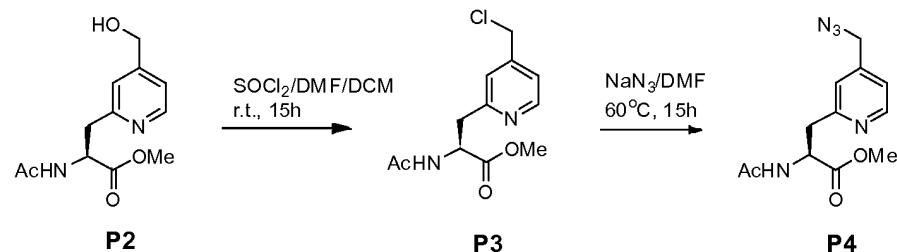


화합물 (3)의 일반 제조 공정



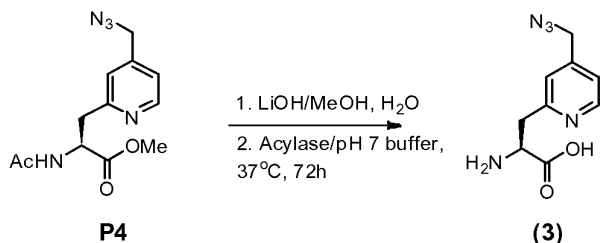
DCM 중의 피리딘 치환된 아미노산 **P** (2 g, 8.6 mmol, 1.0 eq) 용액에, 트리에틸아민 (3 mL, 21.5 mmol, 2.5 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음조에서 0°C 로 냉각시키고, 5분에 걸쳐 무수 아세트산 (0.974 mL, 10.3 mmol, 1.2 eq)을 점적 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온하고, 3시간 교반하였다. 모든 용매와 휘발성 물질들을 제거하고, 잔류물 (조산물 **P1**)을 진공 건조한 다음, 추가적인 정제없이 다음 단계에 사용하였다.

상기 조산물 **P1**을 무수 메탄올 (20 mL)에 용해하고, 얼음조에서 0°C 로 냉각하였다. 여기에 10분에 걸쳐 티오닐 클로라이드 (1.87 mL, 25.8 mmol, 3.0 eq)를 점적 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온하여, 밤새 교반하였다. 용매를 제거하고, 에틸 아세테이트/ NaHCO_3 (3 x)에 용해한 다음 Na_2SO_4 상에서 건조 및 농축하여, 조산물 **P2**를 수득하였으며, 이는 실리카 겔 컬럼 (DCM:MeOH = 9:1)에서 정제하여 **P2** (550 mg, 25%)를 수득하였다.



클로로포름 (10mL) 중의 **P2** (550 mg, 2.18 mmol, 1.0 eq) 용액에, DMF 2 방울을 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음조에서 0°C 로 냉각시키고, 티오닐 클로라이드 ($634 \mu\text{L}$, 8.72 mmol, 4 eq)를 5분에 걸쳐 점적 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온하고, 밤새 교반하였다. 반응물을 DCM/ NaHCO_3 로 워크-업하였다. 유기 상은 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 실리카 겔 컬럼 (DCM: MeOH = 9:1)으로 정제하여, 산물 **P3** (450 mg, 76%)를 수득하였다.

[0403] DMF (10mL) 중의 **P3** (450 mg, 1.67 mmol, 1.0 eq) 용액에, NaN_3 (217 mg, 3.34 mmol, 2.0 eq)와 NaI (25 mg, 0.167 mmol, 0.1 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 60°C에서 열처리하였다. 반응물을 DCM/ NaHCO_3 로 워크업하였다. 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, prep HPLC로 정제하여, 산물 **P4** (400 mg, 86%)를 수득하였다.



[0404]

[0405] MeOH (5 mL) 중의 **P4** (400 mg, 1.44 mmol, 1.0 eq) 용액에, LiOH (303 mg, 7.2 mmol, 5 eq, H_2O 5mL 중의 용액임)를 첨가하였다. 반응물을 rt에서 2시간 교반하였다. 용매를 제거한 다음, 잔류물을 추가로 정제하지 않고 다음 단계에 바로 사용하였다.

[0406]

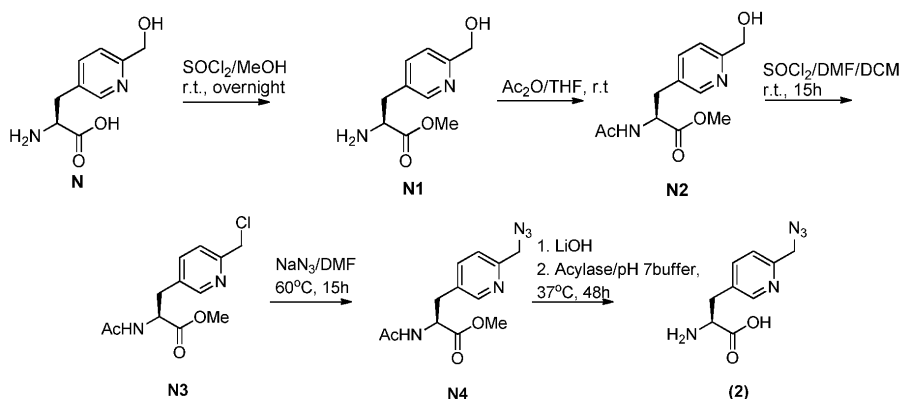
소량의 DMSO 및 50 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 완충제 (20 mL) 중의 상기 잔류물 용액에 아실라제 (100 mg)를 5 mL 완충제 중에 첨가하였다. 혼합물을 72시간 동안 37°C로 가열하였다. 차콜 (200 mg)을 반응물에 첨가하고, 실온에서 10분간 교반한 다음, 셀라이트 패드로 여과하였다. 여과물을 농축하고, prep-HPLC로 정제하여, 산물 **(3)** (85 mg)를 HCl 염으로서 수득하였다. LC-MS (ESI): 222 (M+1), 220 (M-1). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.50 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.27 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.42 (dd, 1H, J = 3.6 and 12.0 Hz, 1H), 3.27 (m, 2H).

[0407]

실시예 3

[0408]

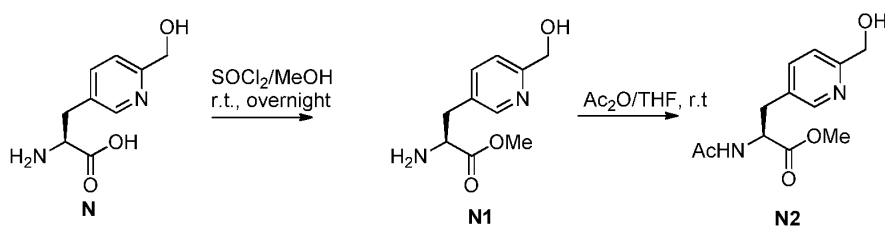
화합물 (2)의 제조



[0409]

[0410]

화합물 (2)의 일반 제조 공정



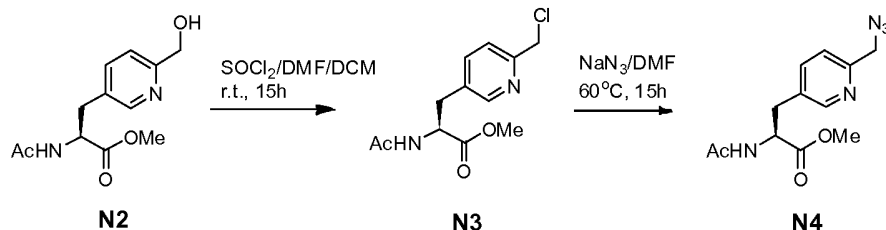
[0411]

[0412]

메탄올 (20 mL) 중의 피리딘 치환된 아미노산 **N** (2 g, 8.6 mmol, 1.0 eq) 용액에, 0°C에서, 10분에 걸쳐, 티오닐 클로라이드 (1.25 mL, 17.82 mmol, 2.0 eq)를 점적 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 제거하여 잔류물 (조산물 **N1**)을 수득하고, 이를 진공 건조한 다음 추가적인 정제없이 다음 단계에 사용하였

다.

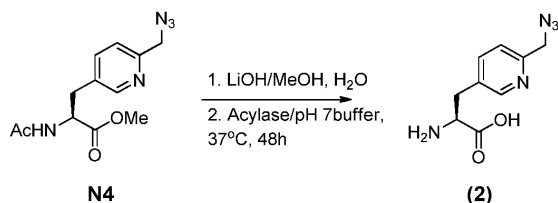
[0413] 0℃에서, THF (20 mL) 중의 조산물 **N1** 및 트리에틸아민 (4.8 mL, 34.4 mmol, 4.0 eq) 용액에, 무수 아세트산 (1.22 mL, 12.9 mmol, 1.5 eq)을 10분에 걸쳐 점적 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 교반하였다. 반응물을 DCM으로 희석하고, NaHCO₃ (3x)로 세척한 다음 Na₂SO₄ 상에서 건조 후 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 (DCM: MeOH = 9:1), 산물 **N2** (1.0 g, 46%)를 수득하였다.



[0414]

[0415] 클로로포름 (20mL) 중의 **N2** (2 g, 7.94 mmol, 1.0 eq) 용액에 DMF 4 방출을 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음 조에서 0℃로 냉각시키고, 10분에 걸쳐 티오닐 클로라이드 (2.3 mL, 31.76 mmol, 4 eq)를 점적 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응물을 DCM/NaHCO₃로 워크 업하였다. 유기 상을 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 (DCM: MeOH = 9:1), 산물 **N3** (1 g, 47%)를 수득하였다.

[0416] DMF (20mL) 중의 **N3** (1 g, 3.7 mmol, 1.0 eq) 용액에, NaN₃ (481 mg, 7.4 mmol, 2.0 eq)와 NaI (55.5 mg, 0.37 mmol, 0.1 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 오일 조에서 60℃에서 밤새 열처리하였다. 반응물을 DCM으로 희석하였다. 유기 층을 NaHCO₃로 행구고, Na₂SO₄ 상에서 건조한 다음, 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 (DCM:MeOH = 9:1), 산물 **N4** (1.8 g, 98%)를 노란색 오일로 수득하였다.



[0417]

[0418] MeOH (20 mL) 중의 **N4** (1g, 3.6 mmol, 1.0 eq) 용액에 LiOH (757 mg, 18 mmol, 5 eq, 물 10 mL)를 첨가하였다. 반응물을 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 제거한 다음, 잔류물을 추가적으로 정제하지 않고 다음 단계에 바로 사용하였다.

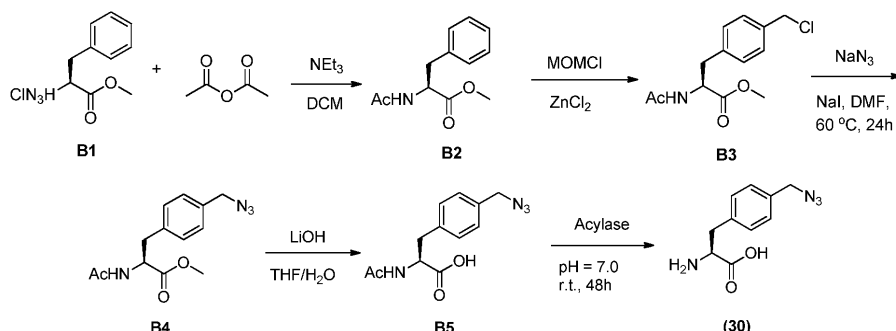
[0419] 소량의 DMSO 및 50 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 완충제 (100 mL) 중의 상기 잔류물 용액에, 아실라제 (100 mg)를 첨가하였다. 이 혼합물을 48시간 37℃로 승온하였다. 차콜 (200 mg)을 반응 혼합물에 첨가하고, 10분간 실온에서 교반한 다음 셀라이트로 여과하였다. 여과물을 농축하고, MeOH로부터 재결정화하여, 산물 **(2)** (1.3 g)을 수득하였다. LC-MS (ESI): 222 (M+1), 220 (M-1). ¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.44 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.45 (m, 1H), 2.98-3.12 (m, 2H), 3.27 (m, 2H).

[0420]

실시예 4

[0421]

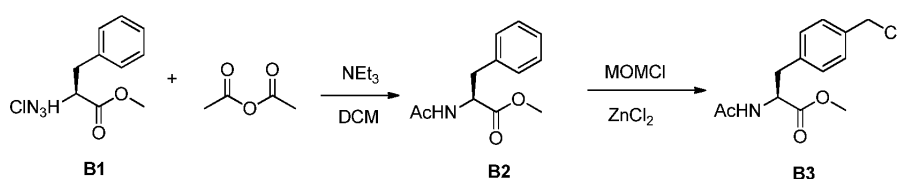
화합물 (30)의 제조



[0422]

[0423]

화합물 (30)의 일반 제조 공정



[0424]

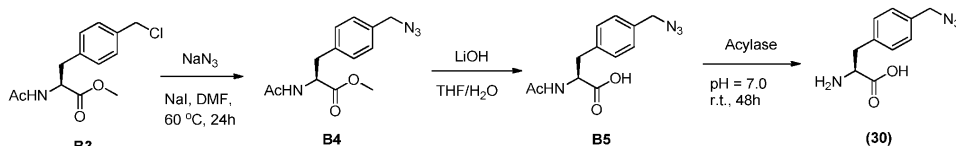
[0425]

DCM (300 mL) 중의 Phe 메틸 에스테르 **B1** (50 g, 232 mmol, 1.0 eq) 용액에, 0°C에서, 트리ethyl아민 (81 mL, 580 mmol, 2.5 eq)을 첨가하고, 15분에 걸쳐 무수 아세트산 (33 mL, 348 mmol, 1.5 eq)을 점적하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 교반하였다. 반응물을 NaHCO_3 (2x)로 행구고, Na_2SO_4 상에서 건조한 다음, 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 (DCM:MeOH = 9:1), 산물 **B2** (50 g, 97%)를 백색 고형물로 수득하였다.

[0426]

에스테르 **B2** (52 g, 0.235 mole, 1.0 eq), MOM-Cl (136 mL, 1.79 mole, 7.6 eq) 및 ZnCl_2 (128 g, 0.94 mole, 4.0 eq) 혼합물을 8시간 동안 6-8°C에서 교반하였다. 6-8°C에서 회전식 증발기에서 휘발성 물질을 제거한 후, 잔류물을 빙수에 붓고, 에틸 아세테이트 (3x)로 추출하였다. 조합한 유기 층들을 NaHCO_3 로 행구고, Na_2SO_4 상에서 건조한 다음, 적은 부피로 농축하였다. 그런 후, 에테르 (50 mL)를 첨가하였다. 이 에테르 용액은 -20°C 냉동고에서 밤새 보관하였다. 결정화 산물을 여과 및 진공 건조하여, 산물 **B3** (31 g, 49%)를 백색 고형물로서 수득하였다.

[0427]



[0428]

DMF (100mL) 중의 **B3** (20 g, 74.2 mmol, 1.0 eq) 용액에 NaN_3 (9.64 g, 148 mmol, 2.0 eq)와 NaI (1.11g, 7.42 mmol, 0.1 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 얼음조에서 밤새 60°C에서 열처리하였다. 회전 증발기에서 용매 DMF를 제거하고, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트에 용해하고 NaHCO_3 (3x)로 행구 다음 Na_2SO_4 상에서 건조 후, 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 (DCM:MeOH = 9:1) 산물 **B4** (20.5 g, 100 %)를 노란색 오일로서 수득하였다.

[0429]

THF: MeOH: H2O (50 mL: 50 mL: 20mL) 혼합 용액 중의 **B4** (20 g, 724 mmol, 1.0 eq) 용액에 LiOH-H₂O (6.94 g, 144.8 mmol, 2 eq)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 교반하였다. 용매를 제거하여 잔류물을 수득하였고, 이를 에틸 아세테이트로 워크-업하였다. 유기 층을 1N HCl (3x)로 행구고, Na_2SO_4 상에서 건조한 다음 농축하여, 산물 **B5** (18.3 g, 96%)를 노란색 오일로서 수득하였다.

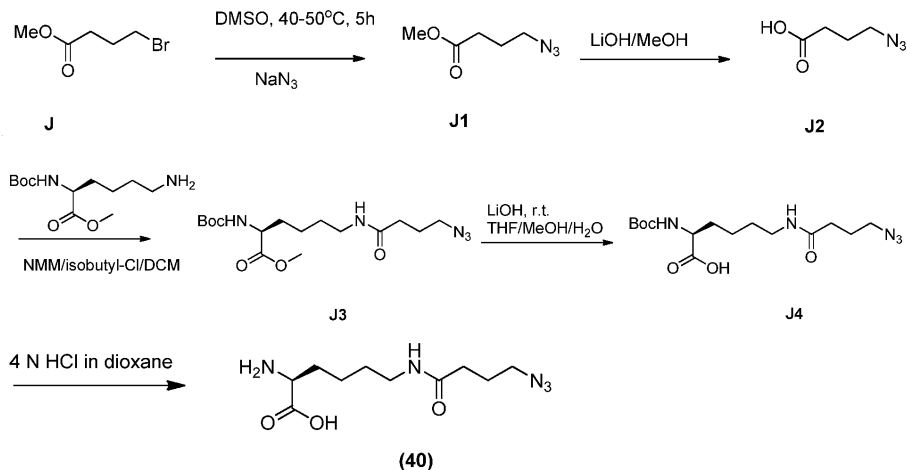
[0430]

DMSO (20 mL) 및 50 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 완충제 (1.8 L) 중의 상기 아미드 **B5** (18 g, 68.7 mmol) 용액에 아실라제 (1 g)를 첨가하였다. 이 용액을 48시간 동안 37°C로 가온하였다. 차콜 (20 g)을 반응 혼합물에 첨가하여, 10분간 실온에서 교반한 다음, 셀라이트로 여과하였다. 여과물을 에틸 아세테이트로 세척하였다. 수 층을 적은 부피로 농축하고, 산물을 석출시켜 백색 고형물로서 수득하였다. 고형물을 여과 및 진공 건조하여, 산물

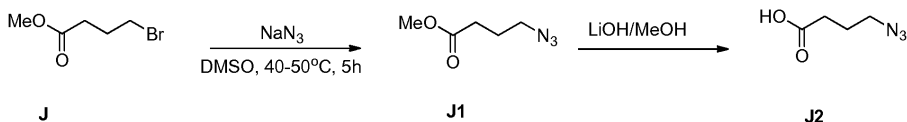
(30) (10 g, 66%)을 백색 고형물로서 수득하였다. LC-MS (ESI): 221 (M+). ¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.27 (br s, 4H), 4.37 (s, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.17 (m, 1H), 2.84 (m, 1H).

실시예 5

화합물 (40)의 제조

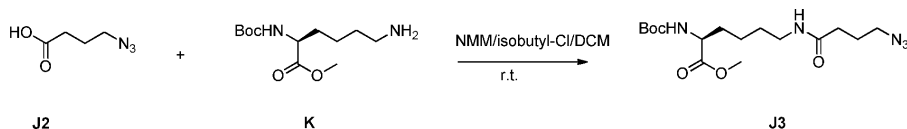


화합물 (40)의 일반 제조 공정

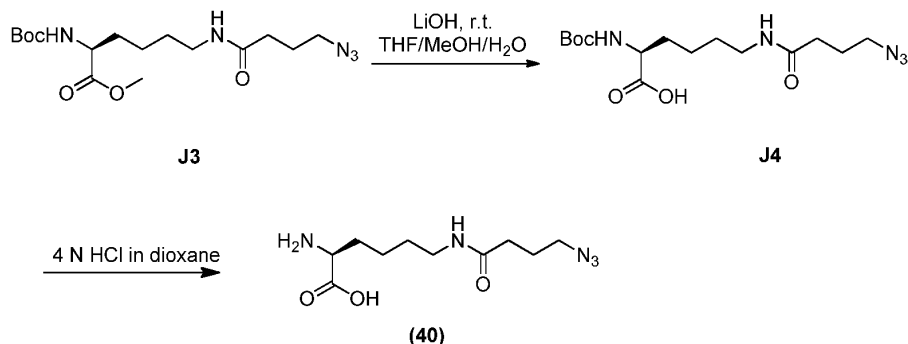


DMSO (100 mL) 중의 **J** (10 g, 55.2 mmol, 1.0 eq) 용액에 소듐 아지드 (5.4 g, 82.8 mmol, 1.5 eq)를 여러번 나누어 교반하면서 첨가하였다. 혼합물을 5시간 동안 40–50°C에서 열처리하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 물 (200 mL)로 희석하여, 에테르 (3x)로 추출하였다. 유기 층을 조합하여 브린으로 세척한 다음, Na₂SO₄ 상에서 건조 및 농축하여, 산물 **J1** (7.8 g, 98.7%)을 오일로서 수득하였다.

상기 산물 **J1** (7.8 g, 54.5 mmol)을 물 (100 mL) 및 MeOH (20 mL) 중의 LiOH (11.4 g, 274 mmol, 5.0 eq) 혼합물에 현탁하였다. 혼합물을 1시간 동안 실온에서 교반시키고, 물 (200 mL)로 희석한 다음 에테르 (3x)로 추출하였다. 수 층을 1N HCl을 사용하여 pH 2로 조정된 다음 에테르 (3x)로 추출하였다. 조합한 유기 층들을 Na₂SO₄ 상에서 건조 및 농축하여, 산물 **J2** (7g, 100%)를 오일로서 수득하였다.



DCM 중의 **J2** (500 mg, 3.88 mmol, 1.0 eq) 용액에, 0°C에서, N-메틸 모르폴린 (NMM, 510 μ l, 4.65 mmol, 1.2 eq)과 이소부틸 클로로포르메이트 (607 μ l, 4.65 mmol, 1.2 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 2시간 실온에서 교반하였다. 이 용액에 Boc-Lys 메틸 에스테르 (1.15 g, 3.88 mmol, 1.0 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 교반하고, 물로 킁칭하였다. 반응물을 DCM (3x)으로 추출하였다. 유기 층을 브린으로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조한 다음 농축하여, 산물 **J3** (900 mg, 63%)를 오일로서 수득하였다.



THF: MeOH: H₂O (5mL: 3mL: 2mL) 혼합물 중의 **J3** (900 mg, 2.42 mmol, 1.0 eq) 용액에 LiOH (508 mg, 12.1 mmol, 5.0 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 1시간 실온에서 교반한 다음, 농축하여 건조함으로써, 조산물 소듐 염 **J4**를 수득하였다.

조산물 **J4**에 다이옥산 (10 mL) 중의 4N HCl을 처리하고, 1시간 실온에서 교반한 다음, 농축하여 조산물 (**40**)을 수득하였으며, 이를 prep HPLC로 정제하여 순수한 산물 (**40**) (332 mg, 53%)을 백색 고형물로서 수득하였다. LC-MS (ESI): 258 (M+1), 256 (M-1). ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ 3.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.15 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.35 (m, 2H), 1.18 (m, 2H).

실시예 6

화합물 (**30**)과 화합물 (**40**)의 반응성 분석

본 실시예는 기준 화합물인 p-아지도-페닐알라닌 (**50**)과 비교하여, 화합물 (**30**)과 화합물 (**40**)의 반응 속도를 분석한 것이다.

DBCO 유사체 (**60**)를 아세트니트릴에 60 μM 농도로 희석하였다. 아미노산 유사체 (**30**), (**40**) 및 (**50**)을 96 웰 플레이트 웰에서 연속하여 PBS 완충액에 부피 180 μl로 희석하였다. DBCO 유사체 스톡 용액 20 μl를 각 웰에 첨가하고, DBCO가 소실되어 부가 부가물(addition adduct)이 형성되는 속도를 SpectraMax 플레이트 리더를 사용해 25℃에서 310 nm에서의 흡광도로 체크하였다. 화합물 (**30**), (**40**) 및 (**50**)과 화합물 (**60**)의 반응을 도 1에 도식적으로 나타낸다. 속도는 $A_{310} = A_0 \cdot (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t))$ 로 1차 분해 (first order decay)에 정확하게 맞아 떨어지며, 여기서 k_{obs} 는 [아지드 화합물] >> [DBCO]인 경우에 sec⁻¹ 단위의 슈도 1차 속도 상수이다. k_{obs} vs. [아지드] 플롯은 각 아미노산에 대한 2차 상수 (M⁻¹ sec⁻¹ 단위)를 산출하는데, 이는 각 아미노산의 고유한 화학적 반응성 척도이다.

실험의 결과는 도 2로 나타낸다. 놀랍게도, 화합물 (**30**)과 화합물 (**40**)은 1차 속도 상수가 1.4 M⁻¹ sec⁻¹로서, 이는 1차 속도 상수가 0.2 M⁻¹ sec⁻¹인 화합물 (**50**)에 비해 약 7배 높았다. 유사 실험을 수행하여, 화합물 (**1**), (**2**) 및 (**3**)의 반응성을 분석하였으며; 화합물 (**1**), (**2**) 및 (**3**)의 반응은 30분 안에 90% 이상 완료되었고, 2시간 이내에 완료되었는데, 이는 화합물 (**1**), (**2**) 및 (**3**)이 화합물 (**30**) 및 (**40**)과 비슷한 속도 상수를 나타낸다는 것을 의미한다.

실시예 7

화합물 (**30**)의 예시적인 폴리캡타이드인 GFP로의 병합

본 실시예는 화합물 (**30**)을 그린 형광 단백질로 병합하는 것을 기술한다. GFP의 합성을 모니터링하기 위해, 발색단 앞에 앰버 코돈 (정지 코돈)을 포함하는 turboGFP 코딩 DNA를 OCFS 발현 벡터 pYD317에 클로닝하였다. turboGFP (pdb 2G6X)의 결정 구조에 따라, 50번째 아미노산에 위치한 티로신 아미노산에 해당하는 뉴클레오타이드에 중첩성 PCR 돌연변이 유발에 의해, 정지 코돈 (TAG)을 삽입하였다. 이 부위에 대한 이전 연구들에서, 이 위치에서의 비-방향족 치환으로 형광성이 없어지고, 정지 코돈에서의 방향족 nnAA를 이용한 억제로 형광성이 나타날 것이라는 것이 입증된 바 있다.

반응물을 접착식 커버 (VWR, 9503130)를 장착하여 분광광도계 (Molecular Devices, SpectraMaxM5)에서 5시간

동안 30℃에서 인큐베이션하고, 10분 간격으로 $\lambda_{\text{ex}} = 476 \text{ nm}$ 및 $\lambda_{\text{em}} = 51$ 에서 형광 강도를 측정하였다. DEPC-처리 수 (G Biosciences, 786-109) 중에 30% S30 추출물, 24 $\mu\text{g/mL}$ T7 RNA 중합효소, 1mM L-티로신 (Sigma, T8566), pre-mix*, 10 μM tRNA, 5 μM pCNFRS D286R, 1 mM 화합물 (30) 및 3nM turboGFP 플라스미드 (Evrogen, Russia, PYD317 벡터로 서브클로닝됨)를 포함하는 최종 반응물 30 μl 에 대해, 즉시 OCFS 반응 믹스를 마이크로플레이트에 첨가하였다. 정지 코돈이 없이 turboGFP를 이용한 양성 대조군 반응을 이용하여, 기존에 관찰된 속도와 비슷하게 반응이 진행되는 것을 검증하였으며, 또한 turboGFP Y50TAG를 포함하는 반응도 tRNA 없이 수행하여, pAMF를 병합시키는 시스템이 없을 경우에 형광성이 검출되지 않는다는 것을 검증하였다 (음성 대조군). pAMF의 GFP로의 병합은 부위-특이적인 방식으로 단백질의 상대적으로 고수율을 달성한다. 도 3은 GFP의 Y50TAG 위치에 pAMF가 병합되는 것을 경시적으로 보여준다.

[0453]

실시예 8

[0454]

화합물 (30)의 예시적인 폴리펩타이드인 GM-CSF로의 병합

[0455]

엠버 코돈을 가진 인간 GMCSF 코딩 DNA를 발현 벡터 pYD317에 클로닝하였다. TAG 코돈은 6번 위치의 세린 아미노산에 해당되는 뉴클레오티드에 중첩성 PCR 돌연변이 유발에 의해 삽입하였다.

[0456]

tRNA CUA를 함유한 무세포성 추출물을 실온으로 해동시킨 다음, 30분간 50 μM 요오도아세트아미드와 인큐베이션하였다. 무-세포성 반응은 최대 10시간 동안 30℃에서 수행하였으며, 이는 30% (v/v) 요오도아세트아미드-처리 추출물 + 8 mM 마그네슘 글루타메이트, 10 mM 암모늄 글루타메이트, 130 mM 포타슘 글루타메이트, 35 mM 소듐 피루베이트, 1.2 mM AMP, 0.86 mM 각각의 GMP, UMP 및 CMP, 티로신과 페닐알라닌은 각각 0.5 mM이고 이를 제외한 총 18종의 아미노산 각각에 대해 2 mM, 4 mM 소듐 옥살레이트, 1 mM 푸트레신, 1.5 mM 스페르미딘, 15 mM 포타슘 포스페이트, 100 nM T7 RNAP, 1.3 μM E. coli DsbC, 2 mM 산화된 (GSSG) 글루타티온, 1 μM tRNA 신테타제 및 1 mM 화합물 (30)을 함유한다. GMCSF TAG 변이체 플라스미드의 농도는 5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 합성한 단백질을 14C로 표지하기 위해, 3.33% (v/v) l-[U-14C]-루신 (300 mCi/mmol; GE Life Sciences, Piscataway, NJ)을 반응에 또한 첨가하였다.

[0457]

환원성 겔의 경우, 샘플 4 μl , 1 M DTT 1 μl , DI H₂O 7 μl 및 4X LDS 완충제 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 4 μl 를 혼합하고, 5분간 70℃의 핫 블롯에서 열처리하였다. 샘플은 제조사의 권고지침에 따라 4~12% 비스-트리스 SDS-PAGE 겔 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 분석하였다. 겔을 건조시킨 후, 약 16시간 노출시키고, Storm 840 PhosphoImager를 이용하여 오토라디오그래피로 분석하였다.

[0458]

오토라디오그래피를 통해, 화합물 (30)을 함유한 온전한 전장 GMCSF의 형성이 확인되었다.

[0459]

실시예 9

[0460]

화합물 (30)의 예시적인 폴리펩타이드인 IgG로의 병합

[0461]

화합물 (30)의 IgG로의 병합 실현가능성을 입증하기 위해, 엠버 코돈을 포함하는 트라스투주맙 (trastuzumab) 중쇄 코딩 DNA와 트라스투주맙 (trastuzumab) 경쇄 코딩 DNA를 발현 벡터 pYD317에 클로닝하였다. TAG 코돈은 CH1 도메인에서 EU 인덴스에 따라 136번 위치의 세린 아미노산에 해당되는 뉴클레오티드에서 중첩성 PCR 돌연변이 유발을 수행함으로써, 삽입하였다.

[0462]

무세포성 추출물을 실온으로 해동시킨 다음, 30분간 50 μM 요오도아세트아미드와 인큐베이션하였다. 무-세포성 반응은 최대 10시간 동안 30℃에서 수행하였으며, 이는 30% (v/v) 요오도아세트아미드-처리 추출물 + 8 mM 마그네슘 글루타메이트, 10 mM 암모늄 글루타메이트, 130 mM 포타슘 글루타메이트, 35 mM 소듐 피루베이트, 1.2 mM AMP, 0.86 mM 각각의 GMP, UMP 및 CMP, 티로신과 페닐알라닌은 각각 0.5 mM이고 이를 제외한 총 18종의 아미노산 각각에 대해 2 mM, 4 mM 소듐 옥살레이트, 1 mM 푸트레신, 1.5 mM 스페르미딘, 15 mM 포타슘 포스페이트, 100 nM T7 RNAP, 1.3 μM E. coli DsbC, 5 μM 효모 PDI, 2 mM 산화된 (GSSG) 글루타티온, 15 μM tRNA, 1 μM tRNA 신테타제 및 1 mM 화합물 (30)을 함유한다. 중쇄 TAG 변이체 플라스미드와 야생형 경쇄 플라스미드의 농도는 각각 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 합성한 단백질을 14C로 표지하기 위해, 3.33% (v/v) l-[U-14C]-루신 (300 mCi/mmol; GE Life Sciences, Piscataway, NJ)을 반응에 또한 첨가하였다.

[0463]

비-환원성 겔의 경우, 샘플 4 μl , DI H₂O 8 μl 및 4X LDS 완충제 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 4 μl 를 겔에 로딩하기 전에 혼합하였다. 환원성 겔의 경우에는, 환원성 겔의 경우, 샘플 4 μl , 1 M DTT 1 μl , DI H₂O 7 μl 및 4X LDS 완충제 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 4 μl 를 혼합하고, 5분간 70℃의 핫 블롯에서 열처리하였다. 샘플

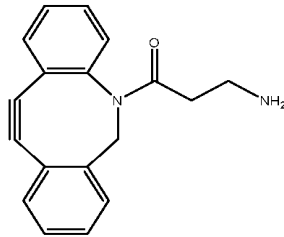
은 제조사의 권고지침에 따라 4~12% 비스-트리스 SDS-PAGE 겔 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 분석하였다. 겔을 건조시킨 후, 약 16시간 노출시키고, Storm 840 PhosphoImager를 이용하여 오토라디오그래피로 분석하였다.

[0464] 오토라디오그래피를 통해, 화합물 (30)을 함유한 온전한 전장 IgG의 형성이 확인되었다.

[0465] **실시예 10**

[0466] 화합물 (30), (1) 및 (2)의 반응성 분석

[0467] 본 실시예는 화합물 (30), (1) 및 (2)가 DBCO-NH₂ (61) (아래 도시됨)와 반응하는 속도를 분석한 것이다.



(61)

[0468] DBCO-NH₂ (61)를 pH 7.4의 포스페이트 완충화된 염수에 용해하여, 500 μM 용액을 만들었다. 아미노산 유사체 (30), (1) 및 (2)를 동일 완충액에 용해하여, 5 mM 투명 용액을 제조한 다음, 동일 완충액으로 500 μM 농도로 희석하였다. 각 아미노산 유사체 100 μl를 화합물 (61) 100 μl와 혼합하여, 볼텍싱하였다. NANODROP 1000 UV 스펙트로미터를 이용하여 310 nm에서 화합물 (61)의 흡광도를 모니터링하였다. 측정은 0, 0.5, 2, 6 및 20시간 켜에 수행하였다. 화합물 (61)의 흡광도 감소는 아미노산 유사체와의 반응을 의미한다.

[0470] 실험 결과는 도 4에 나타낸다. 화합물 (1)과 (30)은 화합물 (61)과 1:1 당량으로 쉽게 반응하여, 6시간 안에 거의 정량적인 수율을 생산하였다. 화합물 (1)과 화합물 (61) 간의 반응 속도는 화합물 (30)과 화합물 (61) 간의 반응 속도와 비슷하였다. 화합물 (2)와 화합물 (61) 간의 반응 속도는 다른 2종의 아미노산 유사체와 화합물 (61) 간의 반응 속도 보다 2배 내지 4배 느렸다. 그러나, 화합물 (2)의 반응 속도는 공통 비교인자로서 화합물 (30)을 토대로 하는 실시예 6의 화합물 (50) 보다 빨라야 한다.

Sequence Listing

```

<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 449
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: sequence is synthesized
<400> SEQUENCE: 1
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
   1             5             10
  Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
   20             25             30
  Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
   35             40             45
  Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
   50             55             60
  Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
   65             70             75
  Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
   80             85             90
  Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
   95            100            105
  Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  110            115            120
  Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
  125            130            135
  Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
  140            145            150
  Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
  155            160            165
  Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
  170            175            180
  Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
  185            190            195
  Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
  200            205            210
  Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
  215            220            225
  Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
  230            235            240
  Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
  245            250            255
  Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
  260            265            270
  His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
  275            280            285
  Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
  290            295            300
  Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
  305            310            315
  Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
  320            325            330

```

[0471]

```

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

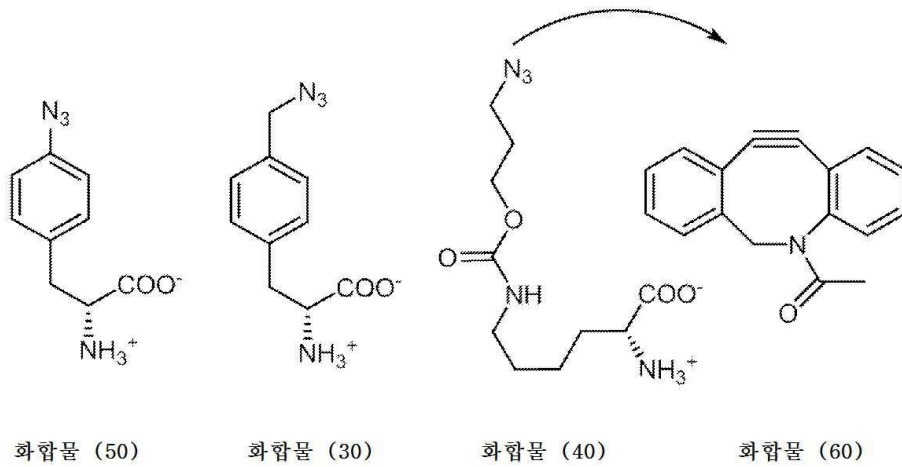
<210> SEQ ID NO 2
<211> LENGTH: 214
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Artificial sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Sequence is synthesized.
<400> SEQUENCE: 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

```

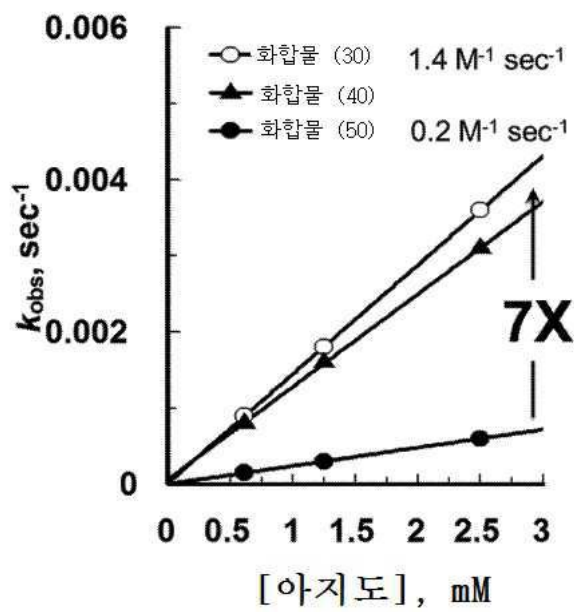
[0472]

도면

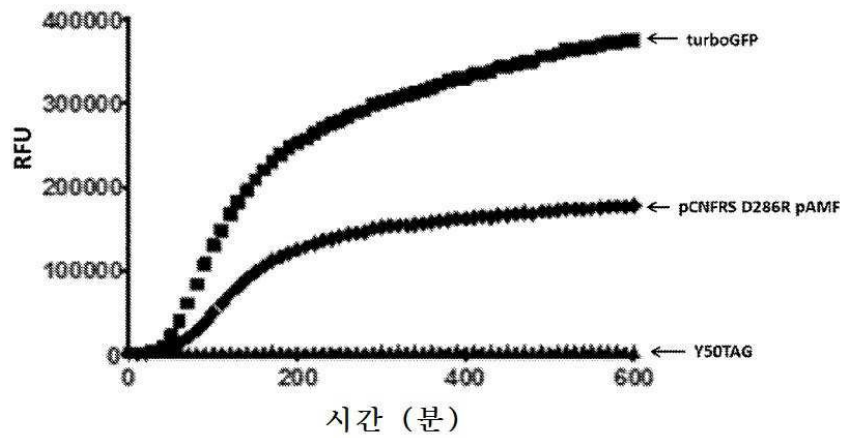
도면1



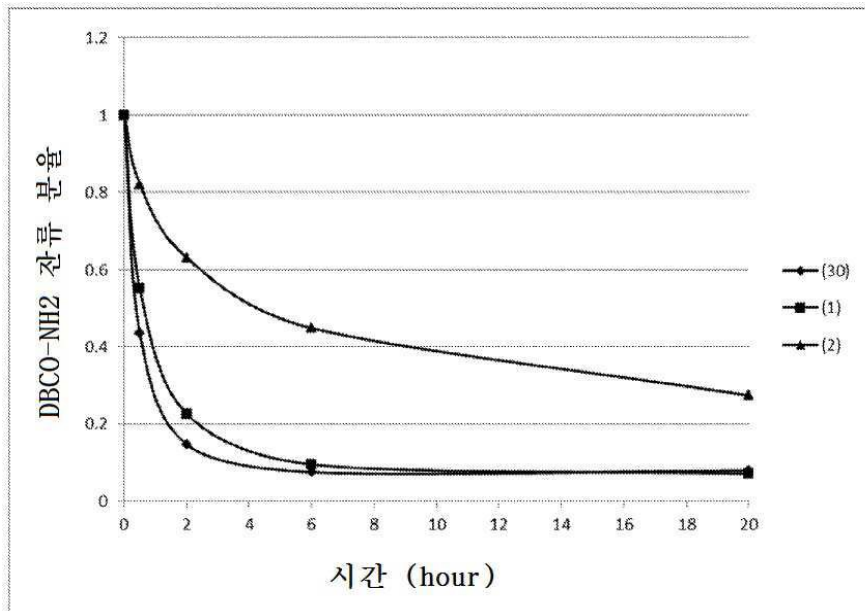
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sutro Biopharma, Inc.

<120> MODIFIED AMINO ACIDS COMPRISING AN AZIDO GROUP

<130> 108843.00013

<140> PCT/US2013/057677

<141> 2013-08-30

<150> US 61/696,087

<151> 2012-08-31

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Heavy Chain

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

	435		440		445	
Gly						
<210>	2					
<211>	214					
<212>	PRT					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Light Chain					
<400>	2					
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
Val	Gly					
1			5			10
						15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn
Thr	Ala					
20						25
						30
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
Leu	Ile					
35						40
						45
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
Ser	Gly					
50						55
						60
Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
Gln	Pro					
65						70
						75
						80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr
Pro	Pro					
85						90
						95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
Ala	Ala					
100						105
						110
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
Ser	Gly					
115						120
						125
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
Glu	Ala					
130						135
						140
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
Ser	Gln					
145						150
						155
						160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
Leu	Ser					
165						170
						175
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
Val	Tyr					

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210