



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월28일

(11) 등록번호 10-1963460

(24) 등록일자 2019년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/64 (2006.01) A61K 38/22 (2006.01)
C12N 15/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7006654

(22) 출원일자(국제) 2011년08월17일

심사청구일자 2016년08월16일

(85) 번역문제출일자 2013년03월15일

(65) 공개번호 10-2013-0136450

(43) 공개일자 2013년12월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/048157

(87) 국제공개번호 WO 2012/024452

국제공개일자 2012년02월23일

(30) 우선권주장

61/374,582 2010년08월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

EP00287820 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 32 항

(73) 특허권자

암브룩스, 인코포레이티드

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

(72) 발명자

크레이노브, 바딤

미국 92130 캘리포니아 샌 디에고 화이트 오크 레
인 5457

크누드센, 닉

미국 92127 캘리포니아 샌 디에고 마티날 서클
10709

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 여호섭

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 변형된 릴렉신 폴리펩타이드 및 그것의 용도

(57) 요약

변형된 릴렉신 폴리펩타이드 및 이것의 용도가 제공된다.

(72) 발명자	(56) 선행기술조사문헌
헤웨트, 압하	EP00303033 A2
미국 91915 캘리포니아 출라 비스타 라 비다 코트 1170	US20060052304 A1
데 디오스, 크리스틴	WO2003030930 A1
미국 92126 캘리포니아 샌 디에고 백웰 코브 7690	WO2008077079 A1
핑크스태프, 제이슨	WO2009055854 A1
미국 92024 캘리포니아 엔시니타스 원더링 로드 2095	
설리반, 로레인	
미국 92117 캘리포니아 샌 디에고 모논가헬라 스트리트 4612	

명세서

청구범위

청구항 1

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 릴렉신(relaxin) 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 릴렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1, A 쇠 잔기 2, A 쇠 잔기 5, A 쇠 잔기 13, A 쇠 잔기 18, B 쇠 잔기 5 및 B 쇠 잔기 7로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 릴렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 5 또는 서열번호 6의 릴렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 카보닐 기, 아미노옥시 기, 하이드라자이드 기, 하이드라진 기, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 및 알카인 기로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기를 포함하는 것인

변형된 릴렉신 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 릴렉신 A 쇠 폴리펩타이드가 잔기 1에서 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된 서열번호 4의 폴리펩타이드를 포함하는 것인 변형된 릴렉신 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 파라-아세틸-L-페닐알라닌 또는 파라-아지도-L-페닐알라닌을 포함하는 것인 변형된 릴렉신 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인 변형된 릴렉신 폴리펩타이드.

청구항 5

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 릴렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 릴렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 릴렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 5 또는 서열번호 6의 릴렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 카보닐 기, 아미노옥시 기, 하이드라자이드 기, 하이드라진 기, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 및 알카인 기로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기를 포함하는 것인

변형된 릴렉신 폴리펩타이드.

청구항 6

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 릴렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 릴렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1, A 쇠 잔기 2, A 쇠 잔기 5, A 쇠 잔기 13, A 쇠 잔기 18, B 쇠 잔기 5 및 B 쇠 잔기 7로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 릴렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 5 또는 서열번호 6의 릴렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-치환되거나, 오쏘-치환되거나 또는 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하는 것인

변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 파라-치환되거나, 오쏘-치환되거나 또는 메타-치환된 페닐알라닌이 카보닐 기, 아미노옥시 기, 하이드라자이드 기, 하이드라진 기, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 및 알카인 기로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기를 포함하는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 8

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 틸렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 5 또는 서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-치환되거나, 오쏘-치환되거나 또는 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하는 것인

변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 9

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 틸렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하고,

(c) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인

변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 폴리머가 수용성 폴리머를 포함하는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 폴리머가 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함하는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티가 0.1kDa 내지 100kDa, 0.1kDa 내지 50kDa, 1kDa 내지 50kDa, 1kDa 내지 40kDa, 10kDa 내지 40kDa, 또는 20kDa의 평균 분자량을 갖는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 옥심 결합 또는 트라이아졸 결합에 의해 상기 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 옥심 결합이 카보닐 모이어티 및 아미노옥시 모이어티의 반응에 의해 초래된 구조를 갖거나, 또는 상기 트라이아졸 결합이 아자이드 모이어티 및 알카인 모이어티의 반응에 의해 초래된 구조를 갖는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 15

제9항에 있어서, 서열번호 4 및 서열번호 5로 이루어진 인간 틸렉신에 비해 증가된 생체내 반감기를 나타내는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 반감기가 적어도 2-배, 적어도 5-배 또는 적어도 10-배 증가되는 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 17

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 틸렉신 폴리펩타이드는

잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된 서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및 서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-치환되거나, 오쏘-치환되거나 또는 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하고,

(c) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인

변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 18

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드이며, 여기서

(a) 틸렉신 폴리펩타이드는 A 쇠 잔기 1 위치에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된,

서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

(b) 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 20kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함하는 폴리머에 연결된 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하는 것인

변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 카보닐 모이어티 및 아미노옥시 (하이드록실아민) 모이어티의 반응에 의해 생성된 옥심 결합에 의해 상기 폴리머에 연결된 것인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합형이거나, 진핵 숙주 세포 내에서 생성되거나, 비-진핵 숙주 세포 내에서 생성되거나, 또는 시험관내 번역에 의해 생성되는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적으로 활성인 변형된 틸렉신 폴리펩타이드.

청구항 22

서열번호 4의 틸렉신 A쇄 폴리펩타이드 또는 서열번호 5 또는 서열번호 6의 틸렉신 B쇄 폴리펩타이드 중 적어도 하나를 암호화하는 분리된 핵산이며,

상기 틸렉신 A쇄 또는 상기 틸렉신 B쇄는 A쇄 잔기 1, A쇄 잔기 2, A쇄 잔기 5, A쇄 잔기 13, A쇄 잔기 18, B쇄 잔기 5 및 B쇄 잔기 7로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환되고,

상기 핵산은 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 암호화하는 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하는,

분리된 핵산.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 선택자 코돈은 앰버코돈(amber codon), 오크코돈(ochre codon), 오팔코돈(opal codon), 특이 코돈(unique codon), 희귀 코돈(rare codon) 및 4-염기 코돈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 분리된 핵산.

청구항 24

제23항의 핵산을 포함하는 분리된 세포.

청구항 25

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드의 제조 방법이며,

상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 발현시키는 조건하에서 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 직교(orthogonal) tRNA의 존재하에, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 암호화하는 선택자 코돈을 포함하는 틸렉신 A쇄 폴리펩타이드 및/또는 틸렉신 B쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 단계

를 포함하는, 변형된 틸렉신 폴리펩타이드의 제조 방법.

청구항 26

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 아테롬성 동맥 경화증, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 관상동맥질환, 강피증, 뇌졸중, 이완장애, 가족성 고콜레스테롤혈증, 단독 수축기 고혈압, 원발성 고혈압, 이차성 고혈압, 좌심실 비대, 장기간 흡연과 관련된 동맥 경직, 비만과 관련된 동맥 경직, 연령과 관련된 동맥 경직, 전신 홍반성 낭창, 자간전증, 고콜레스테롤혈증, 심부전, 울혈성 심부전, 심근 조직의 손실 또는 손상, 심실벽 스트레스, 심실 충만압의 증가, 및 동맥 및 정맥 혈관확장의 통합 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병 또는 장애의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 아테롬성 동맥 경화증, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 관상동맥질환, 강피증, 뇌졸중, 이완장애, 가족성 고콜레스테롤혈증, 단독 수축기 고혈압, 원발성 고혈압, 이차성 고혈압, 좌심실 비대, 장기간 흡연과 관련된 동맥 경직, 비만과 관련된 동맥 경직, 연령과 관련된 동맥 경직, 전신 홍반성 낭창, 자간전증 및 고콜레스테롤혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 장애의 위험에 있는 폐경전, 폐경기, 또는 폐경기후 여성에서 동맥 유연성을 증가시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 심부전, 울혈성 심부전, 심근 조직의 손실 또는 손상, 심실벽 스트레스, 심실 충만압의 증가, 동맥 및 정맥 혈관확장의 통합 손상, 관상동맥질환, 이완장애, 및 좌심실 비대로 이루어진 군으로부터 선택된 질병 또는 장애의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 심부전의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 울혈성 심부전의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 31

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 심부전의 치료를 위한 약제학적 조성물이며, 여기서

틸렉신 폴리펩타이드는

잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된, 서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하고,

상기 파라-아세틸-L-페닐알라닌은 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인

약제학적 조성물.

청구항 32

비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 변형된 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는, 울혈성 심부전의 치료를 위한 약제학적 조성물이며, 여기서

틸렉신 폴리펩타이드는

잔기 1에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된, 서열번호 4의 틸렉신 A 쇠 폴리펩타이드 및

서열번호 6의 틸렉신 B 쇠 폴리펩타이드

를 포함하고,

상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하고,

상기 파라-아세틸-L-페닐알라닌은 링커, 폴리머, 수용성 폴리머, 생물학적으로 활성인 분자, 지질 또는 지방산에 연결된 것인

약제학적 조성물.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 적어도 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 선택적으로 변형된 릴랙신 폴리펩타이드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 성숙한 인간 릴랙신(relaxin)은 분만 전 생식관의 리모델링을 초래하고, 따라서 출산 과정을 용이하게 하는 것으로 알려진 대략 6000 달톤의 호르몬 펩타이드이다. 이 단백질은 임신 및 분만 동안 기관 구조의 필요한 변화를 얻기 위하여 결합 조직의 재구조화를 조절하는 것으로 나타난다. 문헌[Hisaw, F. L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 23: 661-663 (1926); Schwabe, C., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 75: 503-570 (1977); James, R. et al., Nature, 267: 544-546 (1977)]을 참조한다. 릴랙신의 간결한 검토는 문헌[Sherwood, D. in The Physiology of Reproduction, Chapter 16, "Relaxin", Knobil, E. and Neill, J., et al. (eds.), (Raven Press Ltd., New York), pp. 585-673 (1988)]에 의해 제공된다. 릴랙신의 순환 수준은 임신의 전체 9개월 동안 상승되며, 분만 후 빠르게 떨어진다.

[0003] 대개 임신 호르몬임에도 불구하고, 릴랙신은 비임신 여성뿐만 아니라 남성에서도 검출되었다. 문헌[Bryant-Greenwood, G. D., Endocrine Reviews, 3: 62-90 (1982) 및 Weiss, G, Ann. Rev. Physiol., 46:43-52(1984)]은 최근에 심장병의 치료에 유용하다는 것을 발견하였다.

[0004] 심부전은 신체 조직의 대사적 필요를 제공하는데 필요한 혈액을 이동시키는 심장펌프의 불능으로서 정의된다. 펌프 능력의 감소는 심근 조직의 손실 또는 손상으로부터 가장 자주 일어난다. 그 결과, 심실 박출이 억제되어 심실 충만압 및 심실벽 스트레스의 증가 및 심박출량의 감소를 야기한다. 심박출량의 감소에 대한 생리적 반응으로서, 수많은 신경 내분비 반사가 활성화되어 전신 혈관수축, 심장의 교감신경 자극 및 유체 체류를 야기한다. 이들 반사 반응이 심박출량을 초기에 향상시키는 경향이 있지만, 그것들은 장기적으로 해롭다. 말초 저항에 있어서 결과의 증가는 심장 상의 후부하를 증가시키며, 혈액량의 증가는 심실 충만압을 추가로 증가시킨다. 심장의 증가된 교감신경 자극과 함께 이들 변화는 남아있는 기능적 심근 상에서 추가로 및 종종 대량부전 요구를 유발한다.

[0005] 다수의 심혈관 질환에 대해 보통 종말점이 되는 울혈성 심부전은 심장이 말초 조직을 적절하게 관류시킬 수 없을 때 야기된다. 최근의 추정에 따르면, 미국에서 이 질병으로 진단된 사람은 약 4백만명이며, 이 경우 중 50% 초과는 진단 5년 이내에 사망하게 된다[Taylor, M. D. et al., Annual Reports in Med. Chem. 22, 85-94 (1987)].

[0006] 울혈성 심부전을 포함하는 심부전에 대한 현재 치료는 심근 상에 과도한 요구를 야기하지 않고 심박출량을 증가시키는 것에 초점을 맞춘다. 이들 목적을 달성하기 위하여, 다양한 이뇨제, 혈관확장제 및 강심제의 다양한 조합이 혈류량을 감소시키고, 말초저항을 감소시키며, 심장 수축력을 증가시키는데 사용된다. 따라서 현재 치료제는 개개 환자의 임상적 필요를 달성하기 위한 다수의 약물 효과의 균형에 의존하며, 사용된 약물의 부작용에 시달린다.

[0007] 예를 들어, 이뇨제는 칼륨과 마그네슘의 혈장 농도를 감소시키고, 디기탈리스를 투여받은 환자에서 부정맥의 발생 정도를 증가시킨다. 이뇨제는 혈액량 감소를 통해 질산염의 순환 효과를 강력하게 할 수 있고, 심장의 충만압, 심박출량 및 전신 동맥압의 감소를 야기한다.

[0008] 알파 아드레날린 길항물질은 관상동맥 관류를 위태롭게 하는 전신동맥압의 뚜렷한 하강을 유발할 수 있다.

[0009] 엔지오텐신 전환효소 억제제는 동맥압 상에서 유사한 효과를 가질 수 있으며, 추가적으로 칼륨의 혈장 농도에서 과도한 증가를 야기할 수 있다.

[0010] 디기탈리스 및 베타 아드레날린 길항물질과 같이 긍정적 수축력 증가를 야기하는 약물은 부정맥 유발할 가능성이 있다. 추가로, 디기탈리스는 좁은 치료 지수를 가지며, 카테콜아민 유사체는 모두 수용체 하향조절에 기인하

여 그것의 유효성을 빠르게 느슨하게 하는 경향이 있다.

- [0011] 따라서, 동맥 및 정맥 혈관확장 및 심장 수축력의 생리적으로 통합된 반응을 야기하며, 사용된 치료제의 불리함이 없는 치료제에 대한 필요가 있다.
- [0012] 릴랙신은 돼지, 무린, 말, 상어, 호랑이, 래트, 돛발 상어 및 인간을 포함하는 다양한 종으로부터 정제되었으며, 인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자와 적어도 1차 및 2차의 구조적 상동성을 나타내지만, 종 간의 상동성은 꽤 낮을 수 있다. 인간에서, 릴랙신은 임신의 황체(corpora lutea, CL)에서 가장 풍부한 것으로 발견되었다. 그러나, 뇌의 특수핵은 릴랙신 수용체를 가지며, 다른 핵은 릴랙신을 위한 전령 RNA를 함유한다. 몇몇 핵은 릴랙신 수용체를 함유하는 세포와 함께 시상하부 영역에서 발견되었다.
- [0013] 2개의 인간 유전자 형태, 즉 (H1) 및 (H2)가 확인되었다. 문헌[Hudson, P., et al., Nature, 301: 628-631 (1983); Hudson, P., et al., The EMBO Journal, 3: 2333-2339 (1984)]; 및 미국특허 제4,758,516호 및 제4,871,670호. 유전자 형태 중 하나(H2)만이 CL 내에서 전사되는 것으로 발견되었다. (H1) 형태가 다른 조직 부위에서 발현되는지 여부, 또는 그것이 위-유전자(pseudo-gene)를 나타내는지 여부는 불명확하게 남아있다. 합성 인간 릴랙신(H2) 및 특정 인간 릴랙신 유사체가 생물학적 활성에 대해 시험될 때, 시험은 생물학적 활성에 필요한 릴랙신 코어뿐만 아니라 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 메티오닌의 특정 아미노산으로 치환을 나타내었다. 문헌[Johnston, et al., in Peptides: Structure and Function, Proc. Ninth American Peptide Symposium, Deber, C. M., et al. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985)].
- [0014] 릴랙신 제조방법은 또한 미국특허 제4,835,251호 및 공동 계류중인 미국 출원번호 제07/908,766호(PCT US90/02085) 및 제08/080,354호(PCT US94/0699)에 기재되어 있다. 심혈관 치료에서 및 신경퇴행성 질병의 치료에서 릴랙신의 사용방법은 미국특허 제5,166,191호 및 미국 출원 제07/902,637호(PCT US92/06927)에 기재되어 있다. 인간 릴랙신의 특정 조제물은 허용된 미국 출원 제08/050,745호에 기재되어 있다.
- [0015] 강피증 환자에서 현재 I상 인간 임상 시험에서의 제조한 인간 릴랙신(H2). 강피증은 콜라겐의 과잉생산을 일으키는 조직 개선의 불균형을 수반하며, 궁극적으로 피부(및 병에 걸린 기관)의 부종 및 경화를 초래하는 질병이다. 릴랙신을 전달하는 현재의 치료는 반복되고 연장된 인퓨전을 필요로 한다.

발명의 내용

- [0016] 본 발명은 적어도 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 선택적으로 변형된 릴랙신 폴리펩타이드를 제공한다. 본 명세서는 일부 실시형태를 제공할 것이지만, 이들 실시형태는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이며 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 것이 인식되어야 한다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에서, 적어도 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 릴랙신 폴리펩타이드는 적어도 하나의 수용성 폴리머에 부착된다.
- [0018] 한 양태에서, 본 발명은 릴랙신의 치료적 유효량을 투여함으로써 치료가 필요한 포유류에서 혈관생성을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, 릴랙신은 적어도 약 1ng/ml의 혈청 농도를 유지하기에 충분한 양으로 투여된다. 추가 실시형태에서, 릴랙신은 인간 릴랙신(human relaxin, hr2)이다.
- [0019] 본 발명은 릴랙신 수용체 작용물질을 포함하는 조제물의 유효량으로 감소된 동맥 유연성을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0020] 바람직한 실시형태에서 릴랙신 수용체 작용물질은 제조한 인간 릴랙신, 예를 들어 인간 H2 릴랙신이다.
- [0021] 본 발명의 한 실시형태에서, 본 발명은 시험체에서 동맥 유연성을 증가시키는 방법을 제공하되, 상기 방법은 상기 시험체에서 전반적인 동맥 유연성을 측정하는 단계; 건강한 시험체에서 전반적인 동맥 유연성에 비해 상기 시험체에서 상기 전반적인 동맥 유연성이 감소된다는 것을 결정하는 단계; 및 상기 시험체에서 동맥 유연성을 증가시키는 릴랙신을 포함하는 약제학적 조제물을 상기 시험체에게 투여하는 단계를 포함한다. 전반적인 동맥 유연성은 한 실시형태에서, 면적법을 사용하여 대동맥 혈압 파형의 확장기 감쇠로부터 측정될 수 있다. 다른 실시형태에서, 전반적인 동맥 유연성은 일회심박출량-대-맥박압 비로서 계산될 수 있으며, 여기서 일회심박출량은 심박출량 대 심박수의 비로서 정의된다.
- [0022] 관련된 실시형태에서, 시험체의 국소 동맥 유연성 또는 지역적 동맥 유연성은 전반적인 동맥 유연성에 추가로 또는 대안으로서 측정될 수 있으며, 국소 또는 지역적 동맥 유연성이 유사한 상황의 건강한 개체에서 기대되는

국소 또는 지역적 동맥 유연성에 비해 감소된다면, 릴렉신은 해당 개체에서 동맥 유연성을 증가시키기 위해 투여될 수 있다.

[0023] 추가 실시형태에서, 릴렉신이 투여되는 피험체는 다음의 장애 중 하나 이상에 걸려있다: 아테롬성 동맥 경화증, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 관상동맥질환, 강피증, 뇌졸중, 이완장애, 가족성 고콜레스테롤혈증, 단독 수축기 고혈압, 원발성 고혈압, 이차성 고혈압, 좌심실 비대, 장기간 흡연과 관련된 동맥 경직, 비만과 관련된 동맥 경직, 연령과 관련된 동맥 경직, 전신 홍반성 낭창, 자간 전증 및 고콜레스테롤혈증. 관련된 실시형태에서, 본 발명은 폐경전, 폐경기, 및 폐경기후 여성에서 및 앞서 언급한 장애 중 하나의 위험에 있는 개체에서 동맥 유연성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 추가적인 실시형태에서, 릴렉신의 투여는 투여 전 측정된 동맥 유연성에 비해 적어도 10%, 15%, 20% 또는 초과로 동맥 유연성을 증가시킨다. 또한 추가의 실시형태에서, 본 발명은 감소된 동맥 유연성을 갖는 개체에게 사전 결정된 속도로 릴렉신의 투여를 제공하여 0.5 내지 80ng/ml의 릴렉신 혈청 농도를 유지한다. 한 실시형태에서, 릴렉신은 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 제조합 인간 릴렉신이다. 또 다른 실시형태에서, 릴렉신은 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 릴렉신이다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 릴렉신은 수용성 폴리머에 연결된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 가진다. 관련된 실시형태에서, 릴렉신은 주사가 가능한 조제물 중에, 서방성 조제물로서 또는 연속적 주입으로서 매일 투여될 수 있다.

[0025] 다른 양태에서, 본 발명은 릴렉신의 치료적 유효량을 투여하는 것에 의한 감염 또는 허혈성 상처의 치료에 관한 것이다. 특히 바람직한 실시형태에서, 감염 또는 허혈성 상처는 손상이 불량한 순환에 기인하는 산소의 결핍으로부터 초래되는 경우의 것이다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태에서, 감염 또는 허혈성 상처의 치료를 위한 약품의 제조를 위한 또는 혈관생성의 촉진을 위한 약품의 제조를 위한 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드의 사용 방법이 제공된다. 다른 양태에서, 본 발명은 퇴행성 관절 기능장애의 치료에 관한 것이며, 다른 양태에서 퇴행성 관절 기능 장애의 치료는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 글루코사민을 포함하는 하나 이상의 애주번트(adjutant)에 추가로 hr2를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 알츠하이머병의 치료에 관한 것이며, 다른 양태에서 알츠하이머병의 치료는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 에스트로겐을 포함하는 하나 이상의 애주번트에 추가로 hr2를 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서의 조성물의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 포유류의 생식 생리 조절 방법에 관한 것이다.

[0027] 본 발명은 엔지오텐신-II(AngII)-매개 혈관수축의 치료방법을 추가로 제공한다. 이들 방법은 일반적으로 AngII의 혈관수축 효과를 반전시키거나, 억제하거나 또는 감소시키는데 유효한 릴렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0028] 본 발명은 엔도텔린(endothelin-1, ET-1)-매개 혈관수축을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 이들 방법은 일반적으로 ET-1의 혈관수축 효과를 반전시키거나, 억제하거나 또는 감소시키는데 유효한 릴렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 개체에 릴렉신을 투여함으로써 혈관 내 세 포에서 엔도텔린 B형 수용체 활성화를 증가시키는 단계를 포함한다.

[0029] 본 발명은 일반적으로 혈관생성 및/또는 혈관확장을 자극하거나 또는 촉진시키는데 유효한 릴렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여함으로써, 허혈성 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 허혈성 질환의 치료방법을 추가로 제공한다. 해당 방법은 다양한 허혈성 질환의 치료에 유용하다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 심근경색의 결과로서 일어나는 허혈성 질환의 치료를 제공한다. 다른 실시형태에서, 방법은 상처와 관련된 허혈성 질환의 치료를 제공한다. 따라서, 본 발명은 상처 치료를 촉진하기 위한 방법을 추가로 제공한다.

[0030] 본 방법은 혈관을 확장시키고/시키거나 혈관생성성 사이토카인 생성을 자극하거나 또는 촉진하는데 유효한 릴렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여하는 단계를 일반적으로 포함하는 혈관생성성 및/또는 혈관확장성 사이토카인의 자극방법을 추가로 제공한다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 염기성 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF) 및/또는 혈관내피성장인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)의 발현을 자극하는 단계를 제공한다. 이러한 방법은 질병 부위에서 또는 근처에서 혈류를 증가시킴으로써 치료될 수 있는 매우 다양한 질병의 치료에서 유용하다.

[0031] 본 발명은 릴렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여하는 단계를 일반적으로 포함하는, 신장 혈관확장 및 초여과를 증가시키는 방법을 추가로 제공한다. 이들 방법은 다양한 신장병의 치료에 유용하다. 따라서, 본 방법은 혈관수축과 관련된 신장병의 치료방법을 추가로 제공한다.

- [0032] 본 발명은 틸렉신의 양을 포함하는 조제물을 투여하는 단계를 일반적으로 포함하는, 폐 고혈압을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다.
- [0033] 본 명세서에 참조로 포함된 Connetics Corporation 및 BAS Medical, Inc.에 양도된 미국특허 제6,211,147호 및 제6,780,836호 각각에서, 틸렉신을 사용하여 혈관생성을 촉진하는 방법이 개시된다. 본 명세서에 참조로 포함된 Genentech, Inc.에 양도된 특허 제5,759,807호에서, 프로틸렉신으로부터 틸렉신의 원핵세포 생성방법이 개시된다. Yue의 미국특허 제6,251,863호는 각 조건에 대해 각각 글루코사민 설페이트 및 에스트로겐을 추가로 포함하는 틸렉신 약품을 투여함으로써 퇴행성 관절 기능장애를 치료하는 방법 및 알츠하이머병을 치료하는 방법을 개시하며, 이 특허 명세서는 또한 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자에 연결된다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 2작용성 폴리머, 2작용성 링커 또는 적어도 하나의 추가적인 틸렉신 폴리펩타이드와 연결된다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 링커와 함께 수용성 폴리머에 연결되거나 또는 수용성 폴리머에 결합된다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자는 2작용성 폴리머이다. 일부 실시형태에서, 2작용성 폴리머는 제2 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드는 틸렉신 폴리펩타이드이다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함하는 수용성 폴리머에 연결된 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산은 비-자연적으로 암호화된 아미노산이다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함하는 수용성 폴리머에 연결된 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산은 비-자연적으로 암호화된 아미노산이다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 또는 프로틸렉신 폴리펩타이드, 틸렉신 유사체, 프로틸렉신, 틸렉신 A 쇠, 틸렉신 B 쇠 Ala1Asp 틸렉신 또는 틸렉신 폴리펩타이드 중 어떤 것에서 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1 앞의 A 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25(즉, 단백질의 카복실 말단에서) 및 이들 중 임의의 조합(서열번호 4) 및/또는 위치 1 앞의 B 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30(서열번호 5 또는 서열번호 6의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 또는 프로틸렉신 폴리펩타이드 중 어떤 것에서 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1 앞의 A 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 단백질의 카복실 말단에서) 및 이들의 임의의 조합(서열번호 1, 또는 서열번호 2 혹은 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89(즉, 서열번호 3의 단백질의 카복실 말단에서).
- [0039] 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 1에서 A 쇠 내(서열번호 4)에 포함된다. 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 5에서 A 쇠(서열번호 4) 내에 포함된다. 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 7(서열번호 5 또는 서열번호 6)에서 A 쇠 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 2에서 A 쇠 내(서열번호 4)에 포함된다. 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 13에서 A 쇠 내(서열번호 4)에 포함된다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 5에서 B 쇠 내(서열번호 5 또는 서열번호 6)에 포함된다. 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 18에서 A 쇠 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 5에서 B 쇠 내에 포함된다. 일부 실시형태에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노산 위치 28에서 B 쇠 내에 포함된다.

일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 1, 2, 5, 13, 18에서 A 쇠 내(서열번호 4 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 다른 공지된 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산 서열). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 1, 2, 5, 13에서 A 쇠 내(서열번호 4 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 다른 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 1, 2, 5에서 A 쇠 내(서열번호 4 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 다른 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 2 또는 5에서 A 쇠(서열번호 4 또는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 다른 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산).

[0040] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 5 또는 7에서 B 쇠 내(서열번호 5 또는 서열번호 6 또는 서열번호 1, 2 또는 3 내 대응하는 아미노산 위치). 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 B 쇠 내 위치 7(서열번호 5 또는 서열번호 6, 또는 서열번호 1, 2 또는 3 내 대응하는 아미노산 위치)에 포함된다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 B 쇠 내 위치 5(서열번호 5 또는 서열번호 6, 또는 서열번호 1, 2 또는 3 내 대응하는 아미노산 위치)에 포함된다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 B 쇠 내 위치 7(서열번호 5 또는 서열번호 6 또는 서열번호 1, 2 또는 3 내 대응하는 아미노산 위치)에 포함된다.

[0041] 한 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 1, 5, 2, 13, 18에서 A 쇠 내(서열번호 4 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치), 아미노산 위치 7, 5에서 B 쇠 내(서열번호 5 또는 6, 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 폴리펩타이드 내 다음의 위치 중 하나에 포함된다: 아미노산 위치 1, 5, 2, 13, 18에서 A 쇠 내(서열번호 4 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치), 아미노산 위치 7, 5에서 B 쇠 내(서열번호 5 또는 6, 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치).

[0042] 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다음의 위치를 포함하는 수용성 폴리머에 연결된다: 위치 1 앞의 A 쇠 내(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25(즉, 단백질의 카복실 말단에서) 및 이들의 임의의 조합(서열번호 4 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산) 및/또는 위치 1 앞의 B 쇠 내(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30(서열번호 5 또는 6 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, A 쇠 1, 2, 5, 13, 18(서열번호 1 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산) 내를 포함하는 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, A 쇠 1, 2, 5(서열번호 1 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산) 내 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, A 쇠 2, 5(서열번호 1 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산)에 연결된 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, A 쇠 2, 5, 13, 18(서열번호 1 또는 알려진 틸렉신 서열 내 대응하는 아미노산) 내 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, B 쇠 5, 7(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치) 내 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, B 쇠 내 위치 5에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치)은 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, B 쇠 내 위치 7에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치)은 수용성 폴리머에 연결된다.

[0043] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 또는 프로틸렉신 폴리펩타이드 중 어떤 것에서 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: B 쇠 위치 5, 7(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치) 및 A 쇠 위치 1, 5, 2, 13, 18(서열번호 4 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 또는 프로틸렉신 폴

리펩타이드 중 어떤 것에서 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: B 쇠 위치 5, 7(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치) 및 A 쇠 위치 1, 5, 2, 13, 18(서열번호 4 또는 서열번호 1, 2, 3 내 대응하는 아미노산 위치) 및 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용성 폴리머에 연결된다.

[0044] 본 발명의 방법은 혈관생성을 촉진하고, 혈관확장을 촉진하며, 비-저혈압 혈관확장을 촉진하고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 신장 고혈압, 폐 고혈압 및 심장 고혈압을 포함하는 고혈압을 치료하기 위해 사용될 수 있었고 (미국특허 제6,723,702호; 및 제6,780,836호, 둘 다 본 명세서에 전문이 참조로 포함됨), 릴렉신 유사체의 형성 및 결정의 용도를 개시한다.

[0045] **조제물**

[0046] 본 발명의 광범위한 실행에서, 조제물은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 혼합물의 성분 중 적어도 하나와 함께 릴렉신, 릴렉신 다이머, 릴렉신 유사체, 아실화된 릴렉신 또는 아실화된 릴렉신 유사체 중 둘 이상의 혼합물을 함유할 수 있다는 것이 또한 고려된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 혼합물의 성분 중 적어도 하나와 함께 릴렉신, 릴렉신 다이머, 릴렉신 유사체, 아실화된 릴렉신 또는 아실화된 릴렉신 유사체 중 둘 이상의 혼합물을 함유하는 해당 조제물은 또한 비-자연적으로 암호화된 아미노산 중 적어도 하나에 부착된 적어도 하나의 수용성 폴리머를 포함한다.

[0047] 본 발명은 또한 이성분의 혼합물을 포함하되, 릴렉신 폴리펩타이드 및 릴렉신 유사체는 본 발명에 개시된 방법에 의해 제조된 다음 혼합되어서, 조제물은 치료가 필요한 환자에게 투여될 수 있는데, 이는 예를 들어 폐결핵된 B 쇠의 위치 28에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 25% 릴렉신 폴리펩타이드, B 쇠의 위치 10에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 25% 릴렉신 폴리펩타이드, 수용성 폴리머에 커플링된 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 50% 릴렉신 폴리펩타이드를 함유하고, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 릴렉신 B쇄의 위치 31에서 일어난다(서열번호 2; 대안적으로 서열번호 4, 6, 8, 10 또는 12). 릴렉신 폴리펩타이드 변이체의 상이한 백분율 양의 모든 상이한 혼합물은 서열 내 상이한 위치에 포함되되, 릴렉신 폴리펩타이드는 다양한 (1) 상이한 크기의 PEG 또는 (2) PEG들을 포함한다. 이는 예로서 의도되며, 본 발명에 의해 만들어진 것이 가능한 조제물을 제한하는 어떤 방법으로 해석되어서는 안 되고, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 추가적인 실시형태에서, 조제 혼합물 내 포함되는 릴렉신 폴리펩타이드는 그것의 변화하는 해리 시간에 의해 선택될 것이고, 따라서 조제물은 치료가 필요한 환자에 대해 서방성 릴렉신을 제공할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조제물은 글루카곤을 포함할 수 있다.

[0049] **흡입을 위한 조제물을 포함하는 본 발명의 다른 실시형태**

[0050] 본 발명의 추가적인 실시형태에서, 투여 후 적어도 6 시간 동안, 및 더 전형적으로는 적어도 8, 10, 12, 14, 18, 24 시간 또는 초과 동안 지속된 릴렉신의 상승된 혈액 수준을 초래하는, 폐 투여를 통해 환자 사용을 위한 증가된 약동학적 및 약력학적 특성을 갖는 릴렉신 유사체의 생성을 위해 본 명세서에 개시된 기법을 사용하는 것이 가능하다. 본 발명의 다른 실시형태는 흡입으로서 환자에 투여되도록 설계된 치료 조제물에 적합한 릴렉신 유사체의 유리한 혼합물을 허용한다.

[0051] 본 발명의 일부 실시형태에서, 천연 릴렉신 분자 내 다음의 부위는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환될 수 있고, 선택적으로 PEG와 같은 수용성 폴리머의 공유적 부착에 의해 추가로 변형될 수 있다: A 및 B 쇠의 2개의 C-말단, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B 및 Glu21B.

[0052] 천연 릴렉신에 추가로, 본 발명은 비-천연 릴렉신 폴리펩타이드 및 PEG와 같은 하나 이상의 수용성 폴리머의 포함을 위한 부위를 또한 제공할 수 있는 신호 서열로 치환되거나 또는 삽입된 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 릴렉신 유사체를 제공한다. 본 발명의 이 실시형태는 릴렉신 분자 내에서 추가적인 맞춤 폐길화-부위를 도입하는데, 예를 들어 효소 분해에 개선된 저항성을 갖는 PEG-릴렉신을 형성하는데 특히 유용하다. 이러한 접근은 활성, 안정성, 용해도 및 약리학적 특성의 원하는 균형을 갖는 최적화된 릴렉신 컨jugate의 설계에서 더 큰 가요성을 제공한다. 돌연변이는, 즉 릴렉신 분자 내 임의의 위치 번호에서 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 수행될 수 있다. 본 발명에서 사용을 위한 PEG는 다양한 구조를 소유할 수 있다: 선형, 포크형, 분지형, 아령형 등. 전형적으로, PEG는 릴렉신 분자 상의 원하는 부위 또는 부위들을 커플링시키는데 적절한 적합한 활성기와 함께 활성화된다. 활성화된 PEG는 릴렉신 내 반응을 위해 말단에서 반응기를 소유할 것이다. 대표적인 활성화된 PEG 유도체 및 릴렉신과 같은 약물에 이들 작용제(agent)를 컨jug레이션하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 문헌[Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical

Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), 및 Advanced Drug Reviews, 16:157-182(1995)]에 추가로 기재되어 있다.

[0053] 본 발명의 한 특정 실시형태에서, 컨쥬게이트의 PEG 부분은 폴리머의 또는 폴리머-펄렉신 컨쥬게이트의 수용성 특성을 상당히 변화시키는 것에 효과적인 하나 이상의 친유성 기가 없다. 다시 말해서, 본 발명의 폴리머 또는 컨쥬게이트의 비-펄렉신 부분은 친수성보다는 더 친유성이 되는 것으로 생각되는 원자의 기(예를 들어 약 2 내지 8-12개의 탄소 원자를 갖는 탄소 쇠)를 함유하지만, 이러한 기 또는 기들의 존재가 폴리머의 또는 컨쥬게이트의 친수성 특성을 유의하게 변경시키는데 효과적이지 않다면, 이러한 모이어티는 본 발명의 컨쥬게이트에 함유될 수 있다. 즉, 펄렉신, 펄렉신 폴리펩타이드 및 펄렉신 유사체의 부위-특이적 돌연변이를 통해, 본 발명의 펄렉신 컨쥬게이트 그 자체는 친유성 또는 양쪽성보다는 친수성을 나타낼 수 있다. 친유성 모이어티가 존재할 수 있는 본 발명의 특정 실시형태에서, 모이어티는 바람직하게는 PEG 쇠의 말단에 위치되지 않는다.

[0054] 본 발명의 컨쥬게이트에서 사용을 위한 분지된 PEG는 국제특허출원 제WO 96/21469호에 기재된 것을 포함하며, 이것의 내용은 본 명세서에 전문이 참조로 명확하게 포함된다. 일반적으로, 분지된 PEG는 화학식 $R(PEG-OH)_n$ 으로서 표시될 수 있으며, 여기서 R은 중심 "코어" 분자를 나타내고, 아래첨자 n은 가지의 수를 나타낸다. 분지된 PEG는 2 이상의 "PEG" 가지가 연장된 중심 코어를 가진다. 분지된 입체배치에서, 분지형 폴리머 코어는 펄렉신에 부착을 위한 단일 반응 부위를 소유한다. 본 발명에서 사용을 위한 분지된 PEG는 전형적으로 4개 미만의 PEG 암을 포함할 것이며, 더 바람직하게는 3개 미만의 PEG 가지를 포함할 것이다. 분지된 PEG는 그것의 선형 PEG 대응관계보다 크고, 더 밀집한 폴리머 집단과 결합된 단일 반응 부위를 갖는 이점을 제공한다. 분지된 PEG의 하나의 특정 유형은 $(MeO-PEG-)_p R-X$ 로서 표시될 수 있고, 여기서 p는 2 또는 3과 동일하고, R은 2 또는 3개의 PEG 가지가 부착된 리신 또는 글라이세롤과 같은 중심 코어 구조를 가지며, X는 펄렉신에 커플링을 위해 활성화된 또는 활성화될 수 있는 임의의 적합한 작용기를 표시한다. 하나의 특히 바람직한 분지된 PEG는 구조 mPEG2-리신-숙신이미드를 갖는 mPEG2-NHS(Shearwater Corporation, Alabama)이다.

[0055] 또 다른 분지된 구조에서, "현수 PEG"는 PEG 쇠의 말단보다 PEG 백분을 따라 위치한 단백질 커플링을 위한 반응기를 가진다. 펄렉신과 커플링을 위한 PEG 백분으로부터 연장되는 반응기는 동일 또는 상이할 수 있다. 현수 PEG 구조는 특히 흡입용 조성물에 대해 유용할 수 있지만 일반적으로 덜 선호된다.

[0056] 대안적으로, PEG-펄렉신 컨쥬게이트의 PEG-부분은 폴리머 쇠의 한 말단에서 및 펄렉신에 부착을 위해 분지된 모이어티에 연결된 2개의 유리 반응 기(또는 2의 임의의 배수)에서 분지된 모이어티를 갖는 포크형 구조를 소유할 수 있다. 예시적인 포크형 PEG는 국제특허출원 WO 99/45964에 기재되며, 이것의 내용은 본 명세서에 참조로 명백하게 포함된다. 포크형 폴리에틸렌 글라이콜은 선택적으로 폴리머 쇠의 서로 다른 끝에서 알킬 또는 "R" 기를 포함할 수 있다. 더 구체적으로는, 본 발명에 따른 포크형 PEG-펄렉신 컨쥬게이트는 화학식: $R-PEG-L(Y-펄렉신)_n$ 을 가지며, 여기서 R은 알킬이고, L은 가수분해적으로 안정한 분지 지점이며, Y는 펄렉신에 포크형 폴리머의 화학적 결합을 제공하는 연결기이고, n은 2의 배수이다. L은 "--CH--"와 같은 단일 "코어" 기를 표시할 수 있으며, 또는 장쇄의 원자를 포함할 수 있다. 대표적인 L 기는 리신, 글라이세롤, 펜타에리트리톨 또는 솔비톨을 포함한다. 전형적으로, 분지형 모이어티 내에서 특정 분지 원자는 탄소이다.

[0057] 본 발명의 한 특정 실시형태에서, 펄렉신 분자(Y)에 포크형 PEG의 결합은 가수분해적으로 안정하다. 바람직한 실시형태에서, n은 2이다. 펄렉신 상의 반응 부위와 컨쥬게이션 전에 적합한 Y 모이어티는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 활성 에스터, 활성 카보네이트, 알데하이드, 아이소시아네이트, 아이소티오시아네이트, 에폭사이드, 알코올, 말레이미드, 비닐설폰, 하이드라자이드, 다이티오피리딘 및 아이오드아세타마이드를 포함한다. 적합한 활성 기의 선택은 펄렉신 분자 상의 의도된 부착 부위에 의존할 것이며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 얻어진 PEG-펄렉신 컨쥬게이트 내 대응하는 Y 기는 활성화된 포크형 폴리머와 펄렉신 상의 적합한 반응 부위의 반응으로부터 초래된 것이다. 이러한 최종 결합의 구체적 동일성은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 반응 포크형 PEG가 활성화된 에스터, 에컨대 숙신이미드 또는 말레이미드 에스터를 함유한다면, 펄렉신 상의 아민 부위를 통한 컨쥬게이션은 대응하는 아마이드 결합의 형성을 초래할 것이다. 이들 특정 포크형 폴리머는 특히 매력적인데, 그것들이 2:1 또는 초과인 펄렉신 대 PEG의 몰비를 갖는 컨쥬게이트를 제공하기 때문이다. 이러한 컨쥬게이트는 펄렉신 수용체 부위를 차단할 가능성이 더 적을 수 있는 반면, 예를 들어 펄렉신 분해 효소에 의한 효소 분해에 대해 펄렉신을 보호하기 위한 설계에서 가요성을 여전히 제공한다.

[0058] 관련된 실시형태에서, 포크형 PEG-펄렉신 컨쥬게이트는 본 발명에 사용될 수 있으며, 화학식: $R-[PEG-L(Y-펄렉신)_2]_n$ 에 의해 표시된다. 이 예에서 R은 그것에 부착된 적어도 하나의 PEG-다이-펄렉신 컨쥬게이트를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 표시한다. 구체적으로, 본 발명의 이 양태에 따른 바람직한 포크형 폴리머는 n

이 1, 2, 3, 4, 5 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 대안의 실시형태에서, 틸렉신, 틸렉신 폴리펩타이드 또는 틸렉신 유사체 내의 비-천연 아미노산과 폴리머 분지점 사이의 화학적 결합은 분해가능할 수 있다 (즉, 가수분해적으로 불안정함). 대안적으로, 초기에 투여된 컨쥬게이트보다 더 작은 PEG 쇄를 갖는 PEG-틸렉신 컨쥬게이트의 생체내 발생을 허용하는 폴리머 백본 내에 하나 이상의 분해가능한 결합이 함유될 수 있다. 예를 들어, 거대하고 상대적으로 비활성인 컨쥬게이트(즉, 그것에 부착된 하나 이상의 고분자량 PEG 쇄, 예를 들어 약 10,000 초과 분자량을 갖는 하나 이상의 PEG 쇄를 가지되, 컨쥬게이트는 본질적으로 생활성을 소유하지 않음)가 투여될 수 있고, 그 다음에 폐 내 또는 혈류 내 중 하나에서 가수분해되어 본래 존재 하는 PEG 쇄의 일부를 소유하는 생활성 컨쥬게이트를 만들어낸다. 가수분해적으로 분해가능한 결합의 생체 내 절단 시, 유리 틸렉신(분해가능한 결합 시) 또는 그것에 부착된 소 폴리에틸렌 태그를 갖는 틸렉신은 그 다음에 방출되고, 폐를 통해 더 용이하게 흡수되고/되거나 혈액 내로 순환된다.

[0059] 본 발명의 이 실시형태의 한 특징에서, 가수분해 전 무결합 폴리머-컨쥬게이트는 투여 시 최소로 분해되므로, 전신 순환으로 그것의 방출 전 틸렉신의 효소 분해와 대조적으로 절단가능한 결합의 가수분해는 혈류 내로 활성 틸렉신의 서방출을 지배하는데 효과적이다.

[0060] 적절한 생리적으로 절단가능한 결합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 에스터, 카보네이트 에스터, 카바메이트, 설페이트, 포스페이트, 아실옥시알킬 에터, 아세탈 및 케탈을 포함한다. 이러한 컨쥬게이트는 저장 시 및 투여 시 안정한 생리적으로 절단가능한 결합을 소유하여야 한다. 예를 들어, PEG-절단가능 결합-틸렉신 컨쥬게이트는 최종 약제학적 조성물의 제조 시, 적절한 전달 비히클이 사용된다면 비히클 내 해리 시 및 경로와 관계없는 투여 시 그것의 온전함을 유지하여야 한다.

[0061] 따라서, 본 발명의 다른 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 단일 쇄 틸렉신 또는 단일 쇄 틸렉신 유사체 내로 포함된다.

[0062] 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 단일 서열 내 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 틸렉신에 대한 단일 서열 또는 틸렉신 유사체 또는 폴리펩타이드 중 어떤 것에서 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 단일 서열 내 하나 이상의 자연적으로 암호화된 아미노산 치환, 첨가 또는 결실뿐만 아니라 본 명세서에 개시된 틸렉신에 대한 단일 서열 또는 틸렉신 유사체 또는 폴리펩타이드 중 어떤 것에서 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 본 명세서에 개시된 틸렉신 또는 틸렉신 유사체 또는 폴리펩타이드 중 어떤 것에 대한 리더 또는 단일 서열에 포함된다.

[0063] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질, 폴리펩타이드, 소분자 또는 핵산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드 수용체 또는 결합 상대에 대해 틸렉신 폴리펩타이드의 친화도를 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 안정성과 비교할 때 틸렉신 폴리펩타이드의 안정성을 증가시키는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 안정성 및/또는 용해도는 당업자에게 공지된 다수의 상이한 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 분석은, 이에 제한되는 것은 아니지만, SE-HPLC 및 RP-HPLC를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 면역원성과 비교할 때 틸렉신 폴리펩타이드의 면역원성을 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 혈청 반감기 또는 순환 시간과 비교할 때 틸렉신 폴리펩타이드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다.

[0064] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 물 용해도와 비교할 때 틸렉신 폴리펩타이드의 물 용해도가 증가된 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 용해도와 비교할 때 숙주 세포에서 생성된 틸렉신 폴리펩타이드의 용해도가 증가된 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 발현 또는 합성과 비교할 때 숙주 세포에서 틸렉신 폴리펩타이드의 발현이 증가되거나 또는 시험관 내 합성이 증가되는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 이 치환을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 작용제 활성을 보유하고 숙주 세포 내 발현 수준을 보유하거나 또는 개선시킨다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 프로테아제 저항과 비교하여 틸렉신 폴리펩타이드의 프로테아제 내성을 증가시키는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신 폴리펩타이드와 상호작용

시 수용체의 활성화와 비교하여 틸렉신 수용체의 신호 전달 활성을 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신 폴리펩타이드의 결합과 비교하여 수용체와 같은 다른 분자와 그것의 결합을 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신 폴리펩타이드의 항-바이러스 활성화와 비교하여 그것의 항-바이러스 활성을 조절하는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 틸렉신 폴리펩타이드의 글루코스 대사 활성화와 비교하여 그것의 글루코스 대사 활성을 향상시키는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 치환, 첨가 또는 결실이 없는 대응하는 틸렉신의 양립 가능성과 비교하여 약제학적 보존제(예를 들어 m-크레졸, 페놀, 벤질 알코올)와 틸렉신 폴리펩타이드의 양립가능성을 증가시키는 치환, 첨가 또는 결실을 포함한다. 이 증가된 양립가능성은 저장 동안 단백질의 이화학적 특성 및 생물학적 활성을 유지하는 보존된 약제학적 조제물의 제조를 가능하게 한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 유전자조작된 결합은 하나 이상의 비-천연 아미노산으로 만들어진다. 분자내 결합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적합한 조건 하에 단백질 내 2개의 아미노산 간의 반응(아미노산 중 하나 또는 둘 다는 비-천연 아미노산일 수 있음); 2개의 아미노산과 반응 등을 포함하는 다양한 방법으로 만들어질 수 있으며, 이 아미노산 각각은 적합한 조건 하에서 링커, 폴리머 또는 다른 분자와 함께 자연적으로 암호화되거나 또는 비-자연적으로 암호화될 수 있다.

[0067] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 자연적으로 발생하거나 또는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 일 수 있다. 일부 실시형태에서 틸렉신 폴리펩타이드 내 아미노산 치환은 자연적으로 발생하거나 또는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 일 수 있으며, 단 적어도 하나의 치환은 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 된다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 자연적으로 발생하는 아미노산으로 일 수 있으며, 선택적으로 적어도 하나의 치환은 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 된다.

[0068] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 카보닐 기, 아세틸 기, 아미노 옥시 기, 하이드라진 기, 하이드라자이드 기, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 또는 알카인 기를 포함한다.

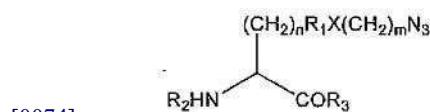
[0069] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 카보닐 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 하기 구조를 가진다:



[0071] 상기 식에서, n은 0 내지 10이고; R1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이며; R2는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴이고; R3은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이며, R4는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형기이다.

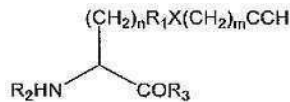
[0072] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 아미노옥시 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 하이드라자이드 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 하이드라진 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 세미카바자이드 기를 포함한다.

[0073] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 아자이드 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 하기 구조를 가진다:



[0075] 상기 식에서, n은 0 내지 10이고; R1은 알킬이며, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재 하지 않고; X는 O, N, S이거나 존재 하지 않고; m은 0 내지 10이고; R2는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이며, R3은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형 기이다.

[0076] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 알카인 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 하기 구조를 가진다:



[0077]

[0078] 상기 식에서, n 은 0 내지 10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이며; X 는 O, N, S이거나 또는 존재 하지 않으며; m 은 0 내지 10이고, R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형 기이다.

[0079] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 틸렉신 폴리펩타이드 작용물질, 부분적 작용물질, 길항물질, 부분적 길항물질 또는 반전 작용물질이다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 작용물질, 부분적 작용물질, 길항물질, 부분적 길항물질, 또는 반전 작용물질은 수용성 폴리머에 연결된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 작용물질, 부분적 작용물질, 길항물질, 부분적 길항물질, 또는 반전 작용물질은 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 하나 이상의 번역 후 변형, 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자를 포함한다.

[0080] 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12의 틸렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산과 엄격 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 1 및 2의 틸렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산과 엄격 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 분리된 핵산을 제공하되, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 선택자(selector) 코돈을 포함한다. 본 발명은 또한 서열번호 1 및 2로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격 조건 하에 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 분리된 핵산을 제공하되, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 선택자 코돈을 포함한다. 본 발명은 서열번호 1 및 2로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산과 함께 서열번호 1 및 2로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산과 함께 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로서 나타내는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 다수의 상이한 폴리뉴클레오타이드가 본 발명의 임의의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명백하다.

[0081] 일부 실시형태에서, 선택자 코돈은 앰버코돈(amber codon), 오크코돈(ochre codon), 오팔코돈(opal codon), 특이 코돈(unique codon), 희귀 코돈(rare codon), 5-염기 코돈 및 4-염기 코돈으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0082] 본 발명은 또한 틸렉신 폴리펩타이드를 수용성 폴리머에 연결시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 분리된 틸렉신 폴리펩타이드를 비-자연적으로 암호화된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 수용성 폴리머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 20가지의 공통 아미노산 중 어떤 것에 대해 달리 반응성이 아닌 수용성 폴리머에 대해 반응성이다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 20가지의 공통 아미노산 중 어떤 것에 대해 달리 반응성이 아닌 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자에 대해 반응성이다.

[0083] 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머에 연결된 틸렉신 폴리펩타이드는 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 기를 포함하는 폴리(에틸렌 글라이콜)과 반응시킴으로써 만들어진다. 일부 실시형태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 기는 아미드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자에 연결된다. 일부 실시형태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 기는 카바메이트 연결을 통해 폴리(에틸렌 글라이콜)에 연결된다.

- [0084] 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머에 연결된 틸렉신 폴리펩타이드는 카보닐 기를 포함하는 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자와 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 기를 포함하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드를 반응시킴으로써 만들어진다.
- [0085] 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머에 연결된 틸렉신 폴리펩타이드는 알카인-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 아자이드 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자와 반응시킴으로써 만들어진다. 일부 실시형태에서, 아자이드 또는 알카인 기는 아마이드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자에 연결된다.
- [0086] 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머에 연결된 틸렉신 폴리펩타이드는 아자이드-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 알카인 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자와 반응시킴으로써 만들어진다. 일부 실시형태에서, 아자이드 또는 알카인 기는 아마이드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글라이콜)에 연결된다.
- [0087] 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자는 약 0.1kDa 내지 약 100kDa의 분자량을 가진다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자는 0.1kDa 내지 50kDa의 분자량을 가진다.
- [0088] 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자는 분지형 폴리머이다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글라이콜) 분지형 폴리머의 각 분지는 1kDa 내지 100kDa, 또는 1kDa 내지 50kDa의 분자량을 가진다.
- [0089] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드에 연결된 수용성 폴리머는 폴리알킬렌 글라이콜 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 카보닐 기, 아미노옥시 기, 하이드라자이드 기, 하이드라진, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 또는 알카인 기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 카보닐 모이어티를 포함하고, 수용성 폴리머는 아미노옥시, 하이드라자이드, 하이드라진 또는 세미카바자이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 알카인 모이어티를 포함하며, 수용성 폴리머는 아자이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드 내에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기는 아자이드 모이어티를 포함하며, 수용성 폴리머는 알카인 모이어티를 포함한다.
- [0090] 본 발명은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용성 폴리머에 연결된다.
- [0091] 본 발명은 또한 선택자 코돈을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 틸렉신 폴리펩타이드로 치환하기 위해 직교(orthogonal) RNA 신세타제 및/또는 직교 tRNA를 포함한다.
- [0092] 본 발명은 또한 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드의 제조방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 틸렉신 폴리펩타이드를 발현시키는 조건 하에서 틸렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들, 직교 RNA 신세타제 및/또는 직교 tRNA를 포함하는 세포를 배양시키는 단계; 및 세포 및/또는 배양 배지로부터 틸렉신 폴리펩타이드를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0093] 본 발명은 또한 틸렉신 폴리펩타이드의 치료적 반감기, 혈청 반감기 또는 순환시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 틸렉신 폴리펩타이드의 면역원성을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 해당 방법은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 자연적으로 발생하는 틸렉신 폴리펩타이드 내 임의의 하나 이상의 아미노산으로 치환시키는 단계 및/또는 링커, 폴리머, 수용성 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자에 틸렉신 폴리펩타이드를 연결시키는 단계를 포함한다.
- [0094] 본 발명은 또한 본 발명의 틸렉신 분자의 유효량으로 이러한 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로-암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 글라이코실화된다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 글라이코실화되지 않는다.
- [0095] 본 발명은 또한 적어도 하나의 아미노산이 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 치환되는 것을 제외하고, 서열번호 1 및 2에 표시된 서열 또는 임의의 다른 틸렉신 폴리펩타이드 서열(이들의 비제한적 예는 서열번호 3 내지 12임)을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용성 폴리머에 연결된다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함한다.

다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 카보닐 기, 아미노옥시 기, 하이드라자이드 기, 하이드라진 기, 세미카바자이드 기, 아자이드 기 또는 알카인 기를 포함한다.

[0096] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체 및 서열번호 1 내지 12에 표시된 서열을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드 또는 임의의 다른 틸렉신 폴리펩타이드 서열을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 적어도 하나의 아미노산은 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 치환된다. 본 발명은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 A 및 B 쇄를 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드(예를 들어, 서열번호 1, 2, 및 3; 서열번호 4 및 5 또는 4 및 6 등은 틸렉신을 만듦) 또는 임의의 다른 틸렉신 폴리펩타이드 서열을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 적어도 하나의 아미노산은 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 치환된다. 본 발명은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체 및 서열번호 1, 2 및/또는 3에서 나타난 서열을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체 및 서열번호 1 내지 3에 표시된 서열을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 당류 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머는 당류 모이어티를 통해 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자는 당류 모이어티를 통해 틸렉신 폴리펩타이드에 연결된다.

[0097] 본 발명은 또한 단일 아미노산에서 틸렉신 폴리펩타이드에 공유 결합에 의해 연결된 수용성 폴리머를 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머는 폴리(에틸렌 글라이콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머에 공유적으로 연결된 아미노산은 폴리펩타이드에 존재 하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산이다.

[0098] 본 발명은 적어도 하나의 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 제공하되, 상기 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자는 폴리펩타이드 내에 리보솜에 의해 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 작용기를 통해 폴리펩타이드에 부착된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 모노페길화된다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 부착된 링커, 폴리머 또는 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 제공하되, 상기 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 사전-선택된 부위에서 폴리펩타이드 내로 리보솜에 의해 포함된다.

[0099] 본 발명의 범주 내에 틸렉신 리더 또는 단일 서열이 포함되며, 이것의 예는 프로인술린으로서 알 수 있다. 선택된 이중성 리더 또는 단일 서열은, 예를 들어 분비를 위해 숙주 세포 분비 시스템에 의해 인식되고 처리되며, 가능하게는 단일 펩티다제에 의해, 숙주 세포에 의해 절단되는 것이어야 한다. 본 발명의 틸렉신 또는 틸렉신 폴리펩타이드 또는 유사체에 의한 질환 또는 장애의 치료 방법은 신호 또는 리더 펩타이드와 함께 또는 신호 또는 리더 펩타이드 없이 틸렉신으로 처리되는 것을 암시하는 것으로 의미된다.

[0100] 본 발명은 또한 글루코스 대사에서 증가를 유발하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 글루코스 대사 활성의 증가를 유발하기 위한 유효량으로 상기 세포에 틸렉신을 투여하는 단계를 포함한다.

[0101] 다른 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드와, 이에 제한되는 것은 아니지만, PEG를 포함하는 다른 분자의 컨쥬게이션은 비-천연 아미노산과 컨쥬게이션을 위해 이용되는 독특한 화학 반응에 기인하여 실질적으로 정제된 틸렉신을 제공한다. 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드와 PEG와 같은 다른 분자의 컨쥬게이션은 컨쥬게이션 단계 전 또는 후에 수행되는 다른 정제 기법에 의해 수행되어 실질적으로 순수한 틸렉신을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 치환을 위해 선택된 일부 아미노산 잔기 위치와 함께 나타난 틸렉신의 결정 구조 모델을 도시한 도면;
 도 2는 치환을 위해 선택된 일부 아미노산 잔기 위치와 함께 나타난 틸렉신의 결정 구조 모델을 도시한 도면;
 도 3은 치환을 위해 선택된 일부 아미노산 잔기 위치와 함께 나타난 틸렉신의 결정 구조 모델을 도시한 도면;
 도 4는 인간 틸렉신의 A 및 B 쇄의 구조를 도시한 도면;
 도 5는 A1a으로서 쇄 B1 아미노산 및 A 쇄의 13번째 아미노산 위치에서 파라-아세틸 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 방법에 의해 생성된 프로틸렉신의 SDS-PAGE 겔을 도시한 도면;
 도 6(A)는 레인 1의 분자량 마커와 함께 비페길화된 틸렉신 V13pAF 및 레인 3 및 7(비환원(NR) 및 환원(R))의 재조합 및 비재조합 WT 틸렉신의 SDS-PAGE 겔을 도시한 도면. 도 6(B)는 레인 1의 분자량 마커와 함께 레인 3

및 4(비환원(NR) 및 환원(R))의 폐결화된 릴렉신 V13pAF의 SDS-PAGE 겔을 도시한 도면;

도 7은 상이하게 폐결화된 AVI3 및 야생형 릴렉신 폴리펩타이드에 대해 시간에 따른 ng/ml으로 SD 래트 혈청 릴렉신 농도의 그래프를 도시한 도면;

도 8(A)는 실시예 40에서 피하 용량의 모든 PEG-RLX 그룹에 대한 그룹 평균 혈청 농도 대 시간의 비교 그래프를 도시한 도면. 1회 용량 주사가 각 동물에게 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물. 기호는 그룹화된 혈청 농도 대 시간의 평균±SD를 표시한다;

도 8(B)은 0.5mg/kg의 20KPEG-AQ1-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 9(A)는 0.5mg/kg의 PEG20-AA5-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 9(B)는 0.5mg/kg의 PEG20-AR18-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 10(A)는 0.5mg/kg의 PEG20-BV7-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 10(B)는 0.5mg/kg의 PEG20-BW28-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 11은 0.5mg/kg의 PEG20-AV13-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 12(A)는 피하 용량의 wt rh릴렉신에 대한 그룹 평균 혈청 농도 대 시간의 비교 그래프를 도시한 도면. 1회 용량 주사가 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 12(B)는 0.5mg/kg의 wt rh릴렉신으로 정맥내 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 정맥내 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 13(A)는 피하로 또는 정맥내 용량의 모든 PEG-RLX 그룹에 대한 그룹 평균 혈장 농도 대 시간의 비교를 도시한 도면. 1회 정맥내 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=3-5 마리 동물;

도 13(B)는 0.25mg/kg의 20KPEG-AQ1-RLX로 정맥내 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 정맥내 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=4 마리 동물;

도 14(A)는 0.5mg/kg의 PEG20-AQ1-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 정맥내 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 14(B)는 0.25mg/kg의 PEG20-AQ1-RLX로 피하 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선의 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=3 마리 동물;

도 15는 0.125mg/kg의 PEG20-AQ1-RLX로 정맥내 용량의 SD 래트에 대한 개개의 동물 혈청 농도 시간 곡선 그래프를 도시한 도면. 1회 피하 용량이 각 동물에 투여되었다. 그룹 당 N=5 마리 동물;

도 16(A)는 용량에 대한 평균 PEG-릴렉신 최종 반감기의 그래프를 도시한 도면; 에러바 = SD. 도 16(B)는 용량에 대한 평균 PEG-릴렉신 AUC_{inf}의 그래프를 도시한 도면; 에러바 = SD;

도 17(A)는 용량에 대한 평균 PEG-릴렉신 C_{max}의 그래프를 도시한 도면; 에러바 = SD;

도 17(B)는 용량에 대한 평균 PEG-릴렉신 클리어런스의 그래프를 도시한 도면; 에러바 = SD;

도 18(A)는 용량에 대한 평균 PEG-릴렉신 용적의 그래프를 도시한 도면; 에러바 = SD. 도 18(B)는 0.25mg/kg의 20KPEG-AQ1 릴렉신의 1회 정맥내 또는 피하 주사 후 혈청-시간 농도의 비교 그래프를 도시한 도면;

도 19, 부분 (a) 내지 (f)는 실시예 43의 I상 데이터를 도시한 도면. 도 19(a)는 물 흡수 및 소변 배출 시 야생형 릴렉신을 갖는 정맥내 주입의 효과를 도시한 도면. 도 19(b)는 소변 배출 동안 I 상의 -16시간 내지 0시간의 롱-이반스(Long-Evans) 래트의 각 그룹에 대한 기준을 도시한 도면. 도 19(c)는 헤마토크릿 상에서 야생형 릴렉신을 갖는 IV 인퓨전의 효과를 도시한 도면. 도 19(d)는 암컷 롱-이반스 래트 내 혈장 BUN 상의 야생형 릴렉신

을 갖는 IV 인퓨전의 효과를 도시한 도면. 도 19(e)는 I상의 0 내지 6시간의 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 물 흡수를 도시한 도면. 도 19(f)는 I상의 0시간 내지 6시간의 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 소변 배출량을 도시한 도면;

도 20, 부분 (a) 내지 (i)는 비히클(대조군) 및 위치 1에서 실시예 43으로부터 PEG에 결합된 pAF로 치환을 갖는 20K PEG-틸렉신 변이체의 0.1X, 0.3X 및 1X에 의한 시험군의 투여 후 II 상으로부터의 데이터를 도시한 도면. 도 20(a)는 물 흡수 및 소변 배출량 상의 효과를 도시한 도면. 도 20(b)는 주사 후 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대해 혈장 나트륨 수준의 효과를 도시한 도면. 도 20(c)은 주사 후 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 혈장 나트륨 변화 수준 상의 효과를 도시한 도면. 도 20(d)는 혈장 삼투압 상의 PEG-틸렉신의 효과를 도시한 도면. 도 20(e)는 혈장 삼투압 변화 상의 PEG-틸렉신에 의한 IV 인퓨전의 효과를 도시한 도면. 도 20(f)는 BUN 수준 상의 PEG-틸렉신 투여 효과를 도시한 도면. 도 20(g)는 II 상의 0 내지 6시간에 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 물 흡수 상의 PEG-틸렉신 투여 효과를 도시한 도면. 도 20(h)는 II 상의 -16 내지 0시간에 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 기준치 소변 배출량을 도시한 도면. 도 20(i)은 II 상의 0 내지 6시간에 룡-이반스 래트의 각 그룹에 대한 소변 배출량 상의 PEG-틸렉신 투여 효과를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 발명은 본 명세서에 기재된 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 구성체 및 시약으로 제한되지 않으며, 예컨대 달라질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하는 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않고, 이는 첨부되는 특허청구범위에 의해서만 제한될 것임이 이해되어야 한다.

본 명세서에 사용되고 첨부되는 특허청구범위에서, 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는다면 복수의 기준을 포함한다. 따라서 예를 들어 "틸렉신" 또는 "틸렉신 폴리펩타이드" 및 다수의 하이폰 연결로 연결된 형태 및 하이폰이 없는 형태는 하나 이상의 이러한 단백질에 대한 참조이며, 당업자에게 공지된 이것의 동등물 등을 포함한다.

달리 정의되지 않는다면, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 임의의 방법, 장치 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 물질이 이제 기술된다.

본 명세서에 언급된 모든 간행물 및 특허는 예를 들어 현재 기재된 본 발명과 함께 사용될 수 있는 간행물 내에 기재된 구성체 및 방법을 설명하고 기재하는 목적을 위한 참조로서 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 전에 그것의 개시에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명 전이기 때문에 또는 임의의 다른 이유로 이러한 개시에 선행하는 것으로 발명자가 자격을 주지 않은 용인으로서 해석되어서는 안 된다.

용어 "실질적으로 정제된"은 자연적으로 발생하는 환경에서 발생하는 것과 같은 단백질, 즉 재조합적으로 생성된 티렉신 폴리펩타이드의 경우에 천연 세포 또는 숙주 세포를 보통 수반하거나 또는 천연 세포 또는 숙주 세포와 상호작용하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있는 티렉신 폴리펩타이드를 지칭한다. 세포 물질이 실질적으로 없을 수 있는 티렉신 폴리펩타이드는 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만(건조 중량으로)의 오염 단백질을 갖는 단백질의 제제를 포함한다. 티렉신 폴리펩타이드 또는 이것의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생성될 때, 단백질은 세포 건조 중량의 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1% 또는 그 미만으로 존재할 수 있다. 티렉신 폴리펩타이드 또는 이것의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생성될 때, 단백질은 세포의 건조 중량의 약 5g/l, 약 4g/l, 약 3g/l, 약 2g/l, 약 1g/l, 약 750mg/l, 약 500mg/l, 약 250mg/l, 약 100mg/l, 약 50mg/l, 약 10mg/l 또는 약 1mg/l 또는 미만에서 배양 배지로 존재할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 생성되는 "실질적으로 정제된" 티렉신 폴리펩타이드는 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동과 같은 적절한 방법에 의해 결정되는 바와 같이 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로, 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 및 더 구체적으로, 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99%의 순도 수준 또는 초과를 가질 수 있다.

"재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 지칭한다. 삽입, 예를

들어 직접적 흡수, 형질도입, f-교접 또는 재조합 숙주 세포를 만드는 기술분야에 공지된 다른 방법을 포함한다. 외인성 폴리뉴클레오타이드는 비통합 벡터, 예를 들어 플라스미드로서 유지될 수 있으며, 또는 대안적으로 숙주 계통 내에 통합될 수 있다.

[0110] 본 명세서에 사용되는 용어 "배지" 또는 "배지들"은 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 숙주 세포, 포유류 숙주 세포, CHO 세포, 원핵 숙주 세포, 이콜라이(E. coli), 또는 슈도모나스(Pseudomonas) 숙주 세포 및 세포 내용물을 포함하는, 임의의 숙주 세포를 지지하거나 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반-고체 또는 고정 지지대를 포함한다. 따라서, 해당 용어는 숙주 세포가 성장되는 배지, 예를 들어 증식 단계 전 또는 후 배지를 포함하는 틸락신 폴리펩타이드가 분비되는 배지를 포함할 수 있다. 해당 용어는 틸락신 폴리펩타이드가 세포 내에서 생성되고, 숙주 세포가 용해되거나 또는 파괴되어 틸락신 폴리펩타이드를 방출시키는 경우와 같이 숙주 세포 용해질을 함유하는 완충제 또는 시약을 포함할 수 있다.

[0111] 단백질 재폴딩에 대해 본 명세서에 사용되는 "환원제"는 환원 상태에서 설프하이드릴 기를 유지하고 세포내- 또는 세포간 이황화 결합을 감소시키는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적합한 환원제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다이티오프레이트(dithiothreitol, DTT), 2-머캅토에탄올, 다이티오에리트ريت, 시스테인, 시스테인아민(2-아미노에탄티올) 및 환원된 글루타티온을 포함한다. 매우 다양한 환원제가 본 발명의 방법 및 조성물에 적합하다는 것은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0112] 본 명세서에서 단백질 재폴딩에 대해 사용되는 "산화제"는 산화되는 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적합한 산화제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 산화된 글루타티온, 시스테인, 시스테인아민, 산화된 다이티오프레이트, 산화된 에리트레이트 및 산소를 포함한다. 매우 다양한 산화제가 본 발명의 방법에 사용을 위해 적합하다는 것은 당업자에게 용이하게 명백하다.

[0113] 본 명세서에 사용되는 "변성 작용제" 또는 "변성제"는 단백질의 가역적 미폴딩을 야기할 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 변성 작용제 또는 변성제의 강도는 특정 변성 작용제 또는 변성제의 특성과 농도 둘 다에 의해 결정될 것이다. 적합한 변성 작용제 또는 변성제는 카오토로픽제(chaotrope), 세정제, 유기 용매, 물 혼화성 용매, 인지질 또는 2 이상의 이러한 작용제의 조합일 수 있다. 적합한 카오토로픽제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 유레아, 구아니딘 및 티오시안산 나트륨을 포함한다. 유용한 세정제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 강한 세정제 예컨대 도데실 황산나트륨 또는 폴리옥시에틸렌 에터(예를 들어 Tween 또는 Triton 세정제), 사르코실(Sarkosyl), 약한 비-이온성 세정제(예를 들어, 디기토닌), 약한 양이온성 세정제, 예컨대 N-2,3-(다이올레일옥시)-프로필-N,N,N-트라이메틸암모늄, 약한 이온성 세정제(예를 들어, 콜산 나트륨 또는 데옥시콜산나트륨) 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 설포베타인(Zwittergent), 3-(3-클로로아미도프로필)다이메틸암모니오-1-프로판 설페이트(CHAPS) 및 3-(3-클로로프로필)다이메틸암모니오-2-하이드록시-1-프로판 설포네이트(CHAPSO)를 포함하는 양쪽성 세정제를 포함한다. 유기 물 혼화성 용매, 예컨대 아세토나이트릴, 저급 알칸올(특히 C2-C4 알칸올, 예컨대 에탄올 또는 아이소프로판올) 또는 저급 알칸다이올(특히 C2-C4 알칸다이올, 예컨대 에틸렌-글라이콜)은 변성제로서 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 인지질은 자연적으로 발생하는 인지질, 예컨대 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린 및 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체 또는 변이체, 예컨대 다이헥사노일포스파티딜콜린 또는 다이헵타노일포스파티딜콜린일 수 있다.

[0114] 본 명세서에 사용되는 "재폴딩"은 부적절하게 폴딩된 또는 폴딩되지 않는 상태로부터 이황화 결합에 대해 천연 또는 적절하게 폴딩된 입체구조로 폴리펩타이드를 함유하는 이황화 결합을 변형시키는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 설명한다.

[0115] 본 명세서에 사용되는 "공동 폴딩"은 구체적으로는 서로 상호작용하며, 미폴딩되거나 또는 부적절하게 폴딩된 폴리펩타이드를 천연의, 적절하게 폴딩된 폴리펩타이드로 형질변환을 초래하는 적어도 2개의 폴리펩타이드를 사용하는 재폴딩 과정, 반응 또는 방법을 지칭한다.

[0116] 본 명세서에 사용되는 용어 "프로인슐린"은 화학식 B-C-A의 적절하게 가교된 단백질이다:

[0117] 여기서,

[0118] A는 틸락신 또는 이것의 작용성 유도체의 A 쇠이고;

[0119] B는 ϵ -아미노기를 갖는 틸락신 또는 작용성 유도체의 B 쇠이며;

[0120] C는 프로인슐린의 연결 펩타이드이다. 바람직하게는, 프로인슐린은 인간 틸락신의 A쇄, 인간 틸락신의 B쇄이며, C는 천연 연결 펩타이드이다. 프로인슐린이 천연 서열일 때, 프로인슐린은 3개의 유리 아미노기: 페닐알라닌

(1)(α -아미노 기), 리신(29)(ϵ -아미노기) 및 리신(64)(ϵ -아미노 기)이다.

- [0121] 본 명세서에 사용되는 용어 "틸렉신 유사체"는 화학식 A-B의 틸렉신 활성을 나타내는 적절하게 가교된 단백질이다,
- [0122] 여기서,
- [0123] A는 틸렉신의 A 쇠 또는 틸렉신 A 쇠의 작용성 유도체이며; B는 틸렉신의 B 쇠 또는 ϵ -아미노기를 갖는 틸렉신 B 쇠의 작용성 유도체이고, A 또는 B 중 적어도 하나는 천연 서열로부터 아미노산 변형을 함유한다.
- [0124] 본 명세서에서, 용어 틸렉신이 복수로 또는 유전적 의미로 사용될 때면, 이는 자연적으로 발생하는 인슐린과 틸렉신 유사체 및 그것의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에 사용되는 "틸렉신 폴리펩타이드"는 Cys_{A7}과 Cys_{B7} 간 및 Cys_{A20}과 Cys_{B19} 간의 이황화 브릿지 및 Cys_{A6}과 Cys_{A11} 간의 내부 이황화 브릿지를 포함하는 인간 틸렉신의 폴리펩타이드와 유사한 분자 구조를 갖는 화합물을 의미하며, 이는 틸렉신 활성을 가진다.
- [0125] 본 명세서에 사용되는 용어 "틸렉신"은 아미노산 서열 및 공간 구조가 잘 알려진 인간 틸렉신을 지칭한다. 인간 틸렉신은 이황화 결합에 의해 가교된 21개의 아미노산 A-쇄 및 30개의 아미노산 B-쇄로 구성된다. 적절하게 가교된 틸렉신은 3개의 이황화 브릿지를 함유한다: A-쇄의 위치 7과 B-쇄의 위치 7 사이의 하나, A-쇄의 위치 20과 B-쇄의 위치 19 사이의 두 번째 및 A-쇄의 위치 6과 11 사이의 세번째[Nicol, D. S. H. W. and Smith, L. F., Nature, 187, 483-485 (1960)].
- [0126] 틸렉신 펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신, 인간; 틸렉신, 돼지; IGF-I, 인간; 틸렉신-유사 성장 인자 II(69-84); 프로-틸렉신-유사 성장 인자 II (68-102), 인간; 프로-틸렉신-유사 성장 인자 II(105-128), 인간; [AspB28]-틸렉신, 인간; [LysB28]-틸렉신, 인간; [LeuB28]-틸렉신, 인간; [ValB28]-틸렉신, 인간; [AlaB28]-틸렉신, 인간; [AspB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [LysB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [LeuB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [ValB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [AlaB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [GlyA21]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GlnB3]-틸렉신, 인간; [AlaA21]-틸렉신, 인간; [AlaA21 GlnB3] 틸렉신, 인간; [GlnB3]-틸렉신, 인간; [GlnB30]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GluB30]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-틸렉신, 인간; [GlnB3 GluB30]-틸렉신, 인간; B22-B30 틸렉신, 인간; B23-B30 틸렉신, 인간; B25-B30 틸렉신, 인간; B26-B30 틸렉신, 인간; B27-B30 틸렉신, 인간; B29-B30 틸렉신, 인간; 인간 틸렉신의 A 쇠, 및 인간 틸렉신의 B 쇠를 포함한다.
- [0127] 용어 "틸렉신 유사체"는 인간 틸렉신의 A-쇄 및/또는 B-쇄로서 각각 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 A-쇄 및 B-쇄를 가지지만, 틸렉신 유사체의 틸렉신 활성을 파괴하지 않는 하나 이상의 아미노산 결실, 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 하나 이상의 아미노산 첨가를 가짐으로써 인간 틸렉신의 A-쇄 및 B-쇄와 상이한 단백질을 의미한다. 틸렉신의 등전점 "보다 큰" 등전점을 갖는 틸렉신 유사체는 틸렉신 유사체의 한 유형이다. 틸렉신 유사체의 다른 유형은 "모노머 틸렉신 유사체"이다.
- [0128] "모노머 틸렉신 유사체"는 예를 들어 인간 틸렉신을 포함하는 인간 틸렉신의 속효성 유사체이되, 위치 B28의 Pro는 Asp, Lys, Leu, Val 또는 Ala으로 치환되고, 위치 B29의 Lys는 Lys이며 또는 Pro으로 치환된다. 또한 des(B27) 인간 틸렉신으로 공지된 다른 모노머 틸렉신 유사체는 인간 틸렉신이되, B-쇄의 위치 27에서 Thr은 결실된다. 모노머 틸렉신 유사체는 1996년 5월 7일 발행된 Chance, R. E. 등의 미국특허 제5,514,646호; 문헌 [Brems, D. N, et al. Protein Engineering, 5, 527-533 (1992)]; Brange, J. J. V., 등의 유럽 특허 공개 제 214,826호(1987년 3월 18일 공개됨); 및 문헌[Brange, J. J. V., et al., Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940 (1991)]에서 개시된다. 본 조제물 내에 사용된 모노머 틸렉신 유사체는 인간 틸렉신에서와 같이 동일 위치에서 적절하게 가교된다.
- [0129] 틸렉신 펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신, 인간; 틸렉신, 돼지; IGF-I, 인간; 틸렉신-유사 성장 인자 II(69-84); 프로-틸렉신-유사 성장 인자 II(68-102), 인간; 프로-틸렉신-유사 성장 인자 II(105-128), 인간; [AspB28]-틸렉신, 인간; [LysB28]-틸렉신, 인간; [LeuB28]-틸렉신, 인간; [ValB28]-틸렉신, 인간; [AlaB28]-틸렉신, 인간; [AspB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [LysB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [LeuB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [ValB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [AlaB28, ProB29]-틸렉신, 인간; [GlyA21]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GlnB3]-틸렉신, 인간; [AlaA21]-틸렉신, 인간; [AlaA21 GlnB3] 틸렉신, 인간; [GlnB3]-틸렉신, 인간; [GlnB30]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GluB30]-틸렉신, 인간; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-틸렉신, 인간; [GlnB3 GluB30]-틸렉신, 인간; B22-B30 틸렉신, 인간; B23-B30 틸렉신, 인간; B25-B30 틸렉신, 인간; B26-B30 틸렉신, 인간; B27-B30 틸렉신, 인간; B29-B30 틸렉신, 인간; 인간 틸렉신의 A 쇠 및 인간 틸렉신의 B 쇠를 포함한다.

- [0130] 추가 양태에서, 본 발명은 변이체 단백질을 암호화하는 재조합 핵산, 변이체 핵산을 함유하는 발현 벡터, 변이체 핵산 및/또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 및 변이체 단백질의 생성방법을 제공한다. 추가적인 양태에서, 본 발명은 보통 약제학적 담체와 함께 치료적 유효량으로 변이체 단백질을 환자에게 투여함으로써 틸렉신 반응성 장애를 치료하는 단계를 제공한다. 추가 양태에서, 본 발명은 MHC 클래스 II 에피토프를 변경시킴으로써 틸렉신 폴리펩타이드의 면역원성을 변경시키는(특히 면역원성을 감소시키는) 방법을 제공한다.
- [0131] 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"는 또한 자연적으로-발생하는 틸렉신의 약제학적으로 허용가능한 염 및 프로드러그, 및 염의 프로드러그, 다형체, 수화물, 용매화합물, 생물학적으로-활성인 단편, 생물학적으로 활성인 변이체 및 입체이성질체뿐만 아니라 자연적으로-발생하는 틸렉신의 작용물질, 모방체 및 길항물질 변이체 및 이것의 폴리펩타이드 융합을 포함한다. 아미노 말단, 카복실 말단 또는 둘 다에서 추가적인 아미노산을 포함하는 융합은 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"에 의해 포함된다. 대표적인 융합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 메티오닐 틸렉신(이때 메티오닌은 리더 또는 신호 펩타이드 또는 이것의 일부가 없는 틸렉신의 성숙 형태의 재조합 발현으로부터 초래되는 틸렉신의 N-말단에 연결됨(메티오닌은 재조합 발현으로부터 초래되는 틸렉신의 N-말단에 연결됨)), 정제 목적을 위한 융합(이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리-히스티딘 또는 친화도 에피토프를 포함), 혈청 알부민 결합 펩타이드와 융합 및 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질과 융합을 포함한다. 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제5,750,373호는 각 수용체 분자에 대해 변경된 결합 특성을 갖는 성장 호르몬 및 항체 단편 변이체와 같은 신규 단백질을 선택하는 방법을 기재한다. 해당 방법은 사상과지 M13의 유전자 III 피막 단백질의 카복시 말단 도메인에 관심의 단백질을 암호화하는 유전자를 융합시키는 단계를 포함한다. 키메라 분자는 틸렉신 및 하나 이상의 다른 분자를 포함한다. 키메라 분자는 틸렉신과 다른 분자(들) 중 하나 또는 둘 다의 특이적 영역 또는 단편을 함유할 수 있다. 임의의 이러한 단편은 표준 생화학적 방법에 의해 또는 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질로부터 제조될 수 있다. 틸렉신 또는 이것의 단편은 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)을 포함하는 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 이러한 융합 구성체는 진핵 숙주 세포 내 틸렉신 또는 이것의 단편의 발현을 향상시키는데 적합하다. 대표적인 HSA 일부는 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제5,766,883호 및 국제특허 공개 WO 97/24445에 개시된 것과 같은 N-말단 폴리펩타이드(아미노산 1-369, 1-419, 및 아미노산 1에 의해 출발하는 중간체 길이)를 포함한다. 다른 키메라 폴리펩타이드는 HSA의 C-말단 및 N-말단의 각각에 부착된 틸렉신 또는 이것의 단편을 갖는 HSA 단백질을 포함할 수 있다. 이러한 HSA 구성체는 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제5,876,969호에 개시된다. 다른 융합이 a) 면역글로불린의 Fc 일부; b) 면역글로불린의 Fc 일부의 유사체; 및 c) 면역글로불린의 Fc 일부의 단편과 틸렉신의 융합에 의해 만들어질 수 있다.
- [0132] 다양한 참고문헌은 폴리머 컨쥬게이션 또는 글라이코실화에 의한 폴리펩타이드의 변형을 개시한다. 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"는 PEG와 같은 폴리머에 컨쥬게이트된 폴리펩타이드를 포함하며, 시스테인, 리신 또는 다른 잔기의 하나 이상의 추가적인 유도체화로 구성될 수 있다. 추가로, 틸렉신 폴리펩타이드는 링커 또는 폴리머를 포함할 수 있되, 링커 또는 폴리머가 컨쥬게이트된 아미노산은 본 발명에 따른 비-천연 아미노산일 수 있거나 또는 리신 또는 시스테인에 커플링과 같은 당업계에 공지된 기법을 이용하여 자연적으로 암호화된 아미노산에 컨쥬게이트될 수 있다.
- [0133] 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"는 또한, 이에 제한되는 것은 아니지만, 임의의 아미노산 위치에서 글라이코실화된 폴리펩타이드, 폴리펩타이드의 N-연결된 또는 O-연결된 글라이코실화된 형태와 같은 글라이코실화된 틸렉신을 포함한다. 단일 뉴클레오타이드 변화를 함유하는 변이체는 또한 틸렉신 폴리펩타이드의 생물학적으로 활성인 변이체로서 고려된다. 추가로, 스플라이싱 변이체가 또한 포함된다. 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"는 또한 화학적 수단에 의해 연결되거나 또는 융합단백질로서 발현된 틸렉신 폴리펩타이드 헤테로다имер, 호모다имер, 헤테로멀티머 또는 임의의 하나 이상의 틸렉신 폴리펩타이드의 호모멀티머 또는 임의의 다른 폴리펩타이드, 단백질, 탄수화물, 폴리머, 소분자, 링커, 리간드 또는 임의의 유형의 다른 생물학적으로 활성인 분자뿐만 아니라, 예를 들어 특이적 결실 또는 아직 생물학적 활성을 유지하는 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드 유사체를 포함한다.
- [0134] 용어 "틸렉신 폴리펩타이드" 또는 "틸렉신"은 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하며, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 하나 이상의 비-천연 아미노산 변형과 함께 하나 이상의 천연 아미노산에 의한 변형으로 구성될 수 있다. 자연적으로-발생하는 틸렉신 폴리펩타이드 내 매우 다양한 아미노산 위치에서 대표적인 치환은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신 폴리펩타이드의 생물학적 활성 중 하나 이상을 조절하는, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만, 작용물질 활성을 증가시키고, 폴리펩타이드의 용해도를 증가시키며, 프로테아제 감수성을 감소시키고, 폴리펩타이드를 길항물질 등으로 전환되는 약제학적 안정성을 조절하는 치환을 포함하는 것이 기재되었고, 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"에 의해 포함된다. 일부 실시형

태에서, 틸렉신 길항물질은 틸렉신 분자의 수용체의 수용체 결합 영역에 존재 하는 수용성 폴리머에 연결된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 틸렉신 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 조절하는 첨가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 틸렉신 폴리펩타이드의 항-바이러스 활성을 조절하는 첨가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 틸렉신 폴리펩타이드의 항-바이러스 활성을 향상시키는 첨가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 첨가, 치환 또는 결실은 틸렉신의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조절할 수 있다. 예를 들어, 첨가, 치환 또는 결실은 틸렉신 수용체에 대한 친화도를 조절하고, 순환 반감기를 조절하며, 치료 반감기를 조절하고, 폴리펩타이드의 안정성을 조절하고, 프로테아제에 의한 절단을 조절하고, 용량을 조절하며, 방출 또는 생물학적 이용가능성을 조절하고, 정제를 용이하게 하거나 또는 특정 투여 경로를 개선시키거나 또는 변경시킨다. 유사하게, 틸렉신 폴리펩타이드는 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체-반응 도메인(이에 제한되는 것은 아니지만, FLAG 또는 폴리-His를 포함) 또는 다른 친화도 기반 서열(이에 제한되는 것은 아니지만, FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함) 또는 검출(이에 제한되는 것은 아니지만, GFP 등을 포함)을 개선시키는 연결된 분자(이에 제한되는 것은 아니지만, 바이오틴을 포함), 정제 또는 폴리펩타이드의 다른 특성을 포함할 수 있다.

[0136] 용어 "틸렉신 폴리펩타이드"는 또한 동일 또는 상이한 비-자연적으로 암호화된 아미노산 측쇄에, 자연적으로-암호화된 아미노산 측쇄에 비-자연적으로 암호화된 아미노산 측쇄를 통해 직접적으로, 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 것을 포함하는 연결된 호모다имер, 헤테로다имер, 호모멀티머 및 헤테로멀티머를 포함한다. 대표적인 링커는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 작은 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성 폴리머, 예컨대 폴리(에틸렌 글라이콜) 또는 폴리옥사이드 또는 다양한 길이의 폴리펩타이드를 포함한다.

[0137] "비-자연적으로 암호화된 아미노산"은 20가지의 공통 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 지칭한다. 용어 "비-자연적으로 암호화된 아미노산"과 동의어로 사용될 수 있는 다른 용어는 "비-천연 아미노산", "천연이 아닌 아미노산", "비-자연적으로 생기는 아미노산" 및 이것의 다양한 하이픈 연결 형태 및 하이픈이 없는 형태이다. 용어 "비-자연적으로 암호화된 아미노산"은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 자연적으로 암호화된 아미노산(이에 제한되는 것은 아니지만, 20가지의 공통 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인을 포함)의 변형(예를 들어, 번역 후 변형)에 의해 생기는 아미노산을 포함하지만, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩타이드 측쇄 내에 자연적으로 포함되지는 않는다. 이러한 비-자연적으로 생기는 아미노산의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포티로신을 포함한다.

[0138] "아미노 말단 변형기"는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 유사하게, "카복시 말단 변형기"는 폴리펩타이드의 카복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 말단 변형 기는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다양한 수용성 폴리머, 펩타이드 또는 단백질, 예컨대 혈청 알부민 또는 펩타이드의 혈청 반감기를 증가시키는 다른 모이어티를 포함한다.

[0139] 용어 "작용기", "활성 모이어티", "활성 기", "이탈기", "반응 부위", "화학적 반응기" 및 "화학적 반응 모이어티"는 당업계에 사용되며, 본 명세서에서 분자의 별개의 정의가능한 부분 또는 단위를 지칭한다. 해당 용어는 화학 분야에서 약간의 동의어가 있으며, 일부 기능 또는 활성을 수행하며, 다른 분자와 반응성인 분자의 부분을 표시하는 것으로 본 명세서에서 사용된다.

[0140] 용어 "결합" 또는 "링커"는 보통 화학 반응의 결과로서 형성되는 기 또는 결합을 지칭하는 것으로 본 명세서에서 사용되며, 전형적으로 공유 결합이다. 가수분해적으로 안정한 결합은 결합이 수 중에서 실질적으로 안정하고, 이에 제한되는 것은 아니지만 연장된 시간 기간, 아마도 심지어 무기한으로 동안 생리적 조건 하에서를 포함하는 유용한 pH 값에서 물과 반응성이 아닌 것으로 의미된다. 가수분해적으로 불안정하거나 또는 분해가능한 결합은 수 중에서 또는, 예를 들어 혈액을 포함하는 수용액 중에서 분해가능한 것으로 의미된다. 효소적으로 불안정한 또는 분해가능한 결합은 해당 결합이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것으로 의미된다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, PEG 및 관련된 폴리머는 폴리머 백본 내에서 또는 폴리머 백본과 폴리머 분자의 하나 이상의 말단 작용기 사이의 링커 기에서 분해가능한 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어, PEG 카복실산 또는 활성화된 PEG 카복실산과 생물학적 활성제 상의 알코올 기의 반응에 의해 형성된 에스터 결합은 일반적으로 생리적 조건 하에서 가수분해되어 작용제를 방출시킨다. 다른 가수분해적으로 분해가능한 결합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 카보네이트 결합; 아민과 알데하이드의 반응으로부터 생긴 이민 결합; 알코올과 포스페이트 기의 반응에 의해 형성된 포스페이트 에스터 결합; 하이드라자이드와 알데하이드의 반응 생성물인 하이드라

존 결합; 알데하이드와 알코올의 반응 생성물인 아세탈 결합; 포메이트와 알코올의 반응 생성물인 오쏘에스터 결합; 이에 제한되는 것은 아니지만 PEG와 같은 폴리머의 말단에서 아민기와 펩타이드의 카복실기에 의해 형성된 펩타이드 결합; 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리머의 말단에서 포스포르아미다이트 기와 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록실 기에 의해 형성된 올리고뉴클레오타이드 결합을 포함한다.

[0141] 본 명세서에서 사용될 때 용어 "생물학적으로 활성인 분자", "생물학적으로 활성인 모이어티" 또는 "생물학적으로 활성인 작용제"는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포존, 프리온, 곤충, 진균, 식물, 동물 및 인간을 포함하는 유기체와 관련된 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 어떤 생리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미치는 임의의 물질을 의미한다. 특히 본 명세서에서 사용되는 생물학적으로 활성인 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 인간 또는 다른 동물에서 질병의 진단, 관리, 경감, 치료 또는 예방을 위해, 또 다르게는 인간 또는 동물의 생리적 또는 정신적 웰빙을 향상시키기 위한 임의의 물질을 포함한다. 생물학적으로 활성인 분자의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 바이러스, 박테리아, 곤충 동물 또는 임의의 다른 세포 또는 세포 유형, 리포좀, 마이크로입자 및 마이셀로부터 얻어지거나 또는 유래된 펩타이드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 백신, 면역원, 경질 약물, 연질 약물, 탄수화물, 무기 원자 또는 분자, 염료, 지질, 뉴클레오사이드, 방사성핵종, 올리고뉴클레오타이드, 독소이드, 독소, 원핵 및 진핵 세포, 바이러스, 다당류, 핵산 및 이들의 부분을 포함한다. 틸렉신 폴리펩타이드는 마이셀 조제물에 첨가될 수 있다; 본 명세서에 전문이 참조로 포함된 미국특허 제5,833,948호. 본 발명과 함께 사용에 적합한 생물학적으로 활성인 작용제의 분류는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약물, 프로드러그, 방사성핵종, 형상화 제제, 폴리머, 항생제, 살진균제, 항-바이러스제, 항-염증제, 항-종양제, 심장혈관계, 항-우울제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제, 미생물 유래 독소 등을 포함한다.

[0142] "2작용성 폴리머"는 다른 모이어티(이에 제한되는 것은 아니지만, 아미노산 측기를 포함)와 특이적으로 반응하여 공유 또는 비공유 결합을 형성할 수 있는 2개의 별개의 작용기를 포함하는 폴리머를 지칭한다. 특정 생물학적 활성 성분 상의 기와 반응성인 하나의 작용기 및 제2 생물학적 활성 성분 상의 기와 반응성인 다른 기를 갖는 2작용성 링커는 제1 생물학적 활성 성분, 2작용성 링커 및 제2 생물학적 활성 성분을 포함하는 컨쥬게이트를 형성하는데 사용될 수 있다. 펩타이드에 다양한 화합물의 부착을 위한 다수의 과정 및 링커 분자가 공지되어 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함된 유럽특허 제188,256호; 미국특허 제4,671,958호, 제4,659,839호, 제4,414,148호, 제4,699,784호; 제4,680,338호; 및 제4,569,789호를 참조한다. "다-작용성 폴리머"는 다른 모이어티(이에 제한되는 것은 아니지만, 아미노산 측기)와 특이적으로 반응하여 공유 또는 비공유 결합을 형성할 수 있는 2개 이상의 별개의 작용기를 포함하는 폴리머를 말한다. 2-작용성 폴리머 또는 다-작용성 폴리머는 임의의 원하는 길이 또는 분자량일 수 있으며, 틸렉신에 연결된 하나 이상의 분자와 그것의 수용체 또는 틸렉신 사이의 특정 원하는 공간 또는 입체구조를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0143] 치환체 기가 왼쪽에서 오른쪽으로 기재되는 그것의 통상적인 화학식에 의해 구체화되는 경우, 그것들은 오른쪽에서 왼쪽으로 구조식을 기재하는 것으로부터 생기는 화학적으로 동일한 치환체를 동일하게 포함하며, 예를 들어 구조식 CH₂O는 구조식 -OCH₂와 동일하다.

[0144] 용어 "치환체"는, 이에 제한되는 것은 아니지만, "비-간섭 치환체"를 포함한다. "비-간섭 치환체"는 안정한 화합물을 수득하는 해당 기이다. 적합한 비-간섭 치환체 또는 라디칼은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 할로, C1-C10 알킬, C2-C10 알케닐, C2-C10 알키닐, C1-C10 알콕시, C1-C12 아랄킬, C1-C12 알카릴, C3-C12 사이클로알킬, C3-C12 사이클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루오일, 자일레닐, 바이페닐, C2-C12 알콕시알킬, C2-C12 알콕시아릴, C7-C12 아릴옥시알킬, C7-C12 옥시아릴, C1-C6 알킬설퍼닐, C1-C10 알킬설폰닐, --(CH₂)_m --O--(C1-C10 알킬)을 포함하고, m은 1 내지 8개의 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오로알킬, 헤테로고리 라디칼, 치환된 헤테로고리 라디칼, 나이트로알킬, -NO₂, -CN, --NRC(O)--(C1-C10 알킬), --C(O)--(C1-C10 알킬), C2-C10 알킬 티오알킬, --C(O)O--(C1-C10 알킬), --OH, --SO₂, =S, --COOH, --NR₂, 카보닐, --C(O)--(C1-C10 알킬)-CF₃, --C(O)-CF₃, --C(O)NR₂, --(C1-C10 아릴)-S--(C6-C10 아릴), -C(O)-(C1-C10 아릴), -(CH₂)_m -O--(CH₂)_m-O-(C1-C10 알킬)로부터 생기되, 각각의 m은 1 내지 8개의 --C(O)NR₂, --C(S)NR₂, --SO₂NR₂, --NRC(O)NR₂, --NRC(S)NR₂, 이것의 염 등이다. 본 명세서에 사용된 각각의 R은 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 치환된 아릴, 아랄킬 또는 알카릴이다.

[0145] 용어 "할로젠"은 플루오르, 염소, 요오드 및 브롬을 포함한다.

[0146] 용어 "알킬"은 달리 언급되지 않는다면, 혼자서 또는 다른 치환체의 부분으로서 완전히 포화되거나, 모노- 또는 다불포화된 직쇄 또는 분지쇄 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼 또는 이것의 조합을 의미하며, 지정된 탄소 원자

의 수를 갖는 2- 및 다가의 라디칼을 포함한다(즉, C1-C10은 1 내지 10개의 탄소를 의미한다). 포화된 탄화수소의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소프로필, n-부틸, t-부틸, 아이소부틸, sec-부틸, 사이클로헥실, (사이클로헥실)메틸, 사이클로프로필메틸과 같은 기, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 상동체 및 이성질체를 포함한다. 불포화 알킬 기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 것이다. 불포화 알킬 기의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-아이소펜테닐, 2-(뷰타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타다이에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-뷰티닐 및 고급 상동체 및 이성질체를 포함한다. 용어 "알킬"은 달리 주목되지 않는다면, 이하에 더욱 상세하게 정의되는 알킬의 해당 유도체, 예컨대 "헤테로알킬"을 포함하는 것으로 의미된다. 탄화수소기로 제한되는 알킬 기는 "호모알킬"로 칭해진다.

[0147] 용어 "알킬렌"은 혼자서 또는 다른 치환체의 부분으로서 알칸으로부터 유래된 2가의 라디칼을 의미하며, 이에 제한되는 것은 아니지만 구조 $-CH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 로 예시되고, 이하에 "헤테로알킬렌"으로서 기재되는 것을 추가로 포함한다. 전형적으로, 알킬(또는 알킬렌) 기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가지며, 10개 또는 그 미만의 탄소 원자를 갖는 해당 기는 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 특정 실시형태가 될 것이다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 또는 그 미만의 탄소 원자를 갖는 단쇄 알킬 또는 알킬렌 기이다.

[0148] 용어 "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)는 그것의 통상적인 의미로 사용되며, 산소 원자, 아미노 기 또는 황 원자 각각을 통해 분자의 나머지에 부착된 알킬 기를 지칭한다.

[0149] 용어 "헤테로알킬"은 달리 언급되지 않는다면, 혼자서 또는 다른 용어와 조합되어, 안정한 직쇄 또는 분지쇄 또는 사이클릭 탄소원자 라디칼 또는 이들의 조합을 의미하며, 언급된 탄소 원자의 수 및 O, N, Si 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자로 이루어지고, 해당 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있으며, 질소 헤테로원자는 선택적으로 4차화될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N 및 S 및 Si는 헤테로알킬 기의 어떤 내부 위치에 또는 알킬 기가 분자의 나머지에 부착된 위치에 위치될 수 있다. 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-$, $-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 및 $CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 을 포함한다. 2개까지의 헤테로원자는, 예를 들어 $-CH_2-NH-OCH_3$ 및 $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 과 같이 연속적일 수 있다. 유사하게, 용어 "헤테로알킬렌"은 혼자서 또는 다른 치환체의 부분으로서 헤테로알킬로부터 유래된 2가의 라디칼을 의미하며, 이에 제한되는 것은 아니지만 $-CH_2-CH_2-S-CH_2$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 로 예시된다. 헤테로알킬렌 기에 대해, 동일 또는 상이한 헤테로원자는 또한 쇠 말단(이에 제한되는 것은 아니지만, 알킬렌옥시, 알킬렌다이옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌다이아미노, 아미노옥시알킬렌 등을 포함) 중 하나 또는 둘 다를 점유할 수 있다. 또한 추가로, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기에 대해, 연결 기의 배향은 연결기의 화학식이 기재된 방향에 의해 암시되지 않는다. 예를 들어 화학식 $C(O)2R'$ 은 $--C(O)2R'$ 와 $-R'C(O)2$ 를 둘 다 표시한다.

[0150] 용어 "사이클로알킬" 및 "헤테로사이클로알킬"은 달리 언급되지 않는다면, 혼자서 또는 다른 용어와 조합되어 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 사이클릭 형태를 나타낸다. 따라서, 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬은 포화된, 부분적으로 불포화된 및 완전히 불포화된 고리 결합을 포함한다. 추가적으로 헤테로사이클로알킬에 대해, 헤테로원자는 헤테로고리가 분자의 나머지에 부착된 위치를 점유할 수 있다. 사이클로알킬의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 1-사이클로헥세닐, 3-사이클로헥세닐, 사이클로헵틸 등을 포함한다. 헤테로사이클로알킬의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1-(1,2,5,6-테트라하이드로피리디닐), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모폴리닐, 3-모폴리닐, 테트라하이드로퓨란-2-일, 테트라하이드로퓨란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함한다. 추가적으로, 해당 용어는 바이사이클릭 및 트라이사이클릭 고리 구조를 포함한다. 유사하게, 해당 용어 "헤테로사이클로알킬렌"은 혼자서 또는 다른 치환체의 부분으로서 헤테로사이클로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하며, 용어 "사이클로알킬렌"은 혼자서 또는 다른 치환체의 부분으로서 사이클로알킬로부터 유래된 이가의 라디칼을 의미한다.

[0151] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수용성 폴리머"는 수성 용매 중에서 가용성인 임의의 폴리머를 말한다. 릴렉신 폴리펩타이드에 수용성 폴리머의 결합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 증가되거나 또는 조절된 혈청 반감기, 또는 비변형 형태에 대해 증가되거나 또는 조절된 치료적 반감기, 조절된 면역원성, 조절된 생리적 관계 특징, 예컨대 응집 및 멀티머 형성, 변경된 수용체 결합, 하나 이상의 결합 상대에 대한 변경된 결합 및 변경된 수용체 다이머와 또는 멀티머화를 포함하는 변경을 초래할 수 있다. 수용성 폴리머는 그 자체의 생물학적 활성을 가질 수도 있고 또는 가지지 않을 수도 있으며, 하나 이상의 릴렉신 폴리펩타이드 또는 하나 이상의 생물학적으로 활성인 분자를 포함하는 다른 물질에 릴렉신을 부착하기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적합한 폴리머는, 이에

제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜 프로피온알데하이드, 모노 C1-C10 알콕시 또는 이것의 아릴옥시 유도체(본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제5,252,714호에 기재됨), 모노메톡시-폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아미노산, 다이비닐에터 말레산 무수물, N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아마이드, 텍스트란, 텍스트란 설페이트를 포함하는 텍스트란 유도체, 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 다당류, 올리고당, 글라이칸, 이에 제한되는 것은 아니지만 메틸셀룰로스 및 카복시메틸 셀룰로스를 포함하는 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 전분 및 전분 유도체, 폴리펩타이드, 폴리알킬렌 글라이콜 및 이것의 유도체, 폴리알킬렌 글라이콜 및 이것의 유도체의 공중합체, 폴리비닐 에틸 에터, 및 알파-베타-폴리[(2-하이드록시에틸)-DL-아스파르트아마이드 등 또는 이것의 혼합물을 포함한다. 이러한 수용성 폴리머의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌 글라이콜 및 혈청 알부민을 포함한다.

[0152] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리알킬렌 글라이콜" 또는 "폴리(알켄 글라이콜)"은 폴리에틸렌 글라이콜 (폴리(에틸렌 글라이콜)), 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리부틸렌 글라이콜 및 이것의 유도체를 지칭한다. 용어 "폴리알킬렌 글라이콜"은 선형 및 분지형 폴리머를 둘 다 포함하며 평균 분자량은 0.1kDa 내지 100kDa이다. 다른 대표적인 실시형태는, 예를 들어 Shearwater Corporation의 카탈로그 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)와 같은 상업적 공급업자의 카탈로그에 열거된다.

[0153] 용어 "아릴"은, 달리 언급되지 않는다면, 함께 융합되거나 또는 공유적으로 연결된 단일 고리 또는 다중 고리(이에 제한되는 것은 아니지만, 1 내지 3개의 고리를 포함)일 수 있는 다중불포화된, 방향족, 탄화수소 치환체를 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자로부터 함유된 아릴 기(또는 고리)를 지칭하되, 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화되고, 질소 원자(들)는 선택적으로 4차화된다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴 기의 비제한적 예는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-바이페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-아이속사졸릴, 4-아이속사졸릴, 5-아이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-아이소퀴놀릴, 5-아이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 각각의 상기 주목한 아릴 및 헤테로아릴 고리 시스템에 대한 치환체는 이하에 기재되는 허용가능한 치환체로부터 선택된다.

[0154] 간결성을 위해, 용어 "아릴"은 다른 용어와 조합되어 사용될 때(이에 제한되는 것은 아니지만, 아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬을 포함), 상기 정의한 바와 같은 아릴과 헤테로아릴 고리를 포함한다. 따라서, 용어 "아릴알킬"은 탄소 원자(이에 제한되는 것은 아니지만 메틸렌 기를 포함)가, 예를 들어 산소 원자(이에 제한되는 것은 아니지만, 페녹시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등을 포함)로 대체되는 알킬 기를 포함하는 알킬 기(이에 제한되는 것은 아니지만, 벤질, 펜에틸, 피리딜메틸 등을 포함)에 아릴 기가 부착된 해당 라디칼을 포함하는 것으로 의미된다.

[0155] 각각의 상기 용어(이에 제한되는 것은 아니지만, "알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴"을 포함)는 표시된 라디칼의 치환되고 비치환된 형태를 포함하는 것으로 의미된다. 각 유형의 라디칼에 대한 대표적인 치환체는 이하에 제공된다.

[0156] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 헤테로사이클로알케닐로서 종종 언급되는 해당 기를 포함)에 대한 치환체는 0 내지 (2m'+1) 범위에 있는 수에서, 이에 제한되는 것은 아니지만, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -할로젠, -SiR'R''R''', OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', NR'C(O)NR'R'', -NR'C(O)2R', -NR-C(NR'R''R''')=NR'', NRC(NR'R'')=NR'', -S(O)R'', -S(O)2R', -S(O)2NRSR'', NRSO2R', -CN 및 -NO2으로부터 선택된 다양한 기 중 하나 이상일 수 있되, m'는 이러한 라디칼 내 탄소 원자의 전체 수이다. R', R'', R''' 및 R''''는 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 또는 비치환된 헤테로알킬, 1-3개의 할로젠, 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기 또는 아릴알킬 기로 치환된 아릴을 포함하는 치환된 또는 비치환된 아릴을 지칭한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R 기를 포함할 때, 예를 들어 각각의 R 기는 이들 기 중 하나 이상이 존재할 때 각각의 R', R'', R''' 및 R'''' 기와 같이 독립적으로 선택된다. R' 및 R''는 동일 질소 원자에 부착될 때, 그것들은 질소 원자와 함께 조합되어 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R''는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1-피롤리디닐 및 4-모폴리디닐을 포함하는 것으로 의미된다. 치환체의 상기 논의로부터, 당업자는 용어 "알킬"이 수소 기 이외의 기, 예컨대 할로알킬(이에 제한되는 것은 아니지만, -CF3 및 -CH2CF3을

포함) 및 아실(예를 들어, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ 등)에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기를 포함하는 것으로 의미된다.

[0157] 알킬 라디칼에 대해 기재된 치환체와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴 기에 대한 치환체는 다르며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 방향족 고리 시스템 상에서 0 내지 개방 원자가의 전체 수의 범위에 있는 수로 할로젠, OR' , $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, -할로젠, $-SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $-C(O)R'$, CO_2R' , $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR'C(O)R'$, $NR'C(O)NR'R''$, $-NR'C(O)R'_2$, $NR-C(NR,R'R'')=NR'''$, $NRC(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)R'_2$, $-S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, $-CN$ 및 $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, 플루오로(C1-C4)알콕시 및 플루오로(C1-C4)알킬로부터 선택되고; R' , R'' , R''' 및 R'''' 는 수소, 알킬, 헤테로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R 기를 포함할 때, 예를 들어 각각의 R기는 하나 이상의 이들 기가 존재할 때 각각의 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기와 같이 독립적으로 선택된다.

[0158] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절된 혈청 반감기"는 그것의 비변형 형태에 대해서 변형된 릴랙신의 순환 반감기의 긍정적 또는 부정적 변화를 의미한다. 혈청 반감기는 릴랙신의 투여 후 다양한 시점에 혈액 샘플을 취하고, 각 샘플 내 해당 분자의 농도를 결정함으로써 측정된다. 혈청 농도와 시간의 상관관계로 혈청 반감기를 계산한다. 증가된 혈청 반감기는 적어도 약 2-배를 가지지만, 예를 들어 만족스러운 용량 섭생이 가능하거나 또는 독성 효과를 회피하는 경우, 더 적은 증가가 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가는 적어도 약 3-배, 적어도 약 5-배 또는 적어도 약 10-배이다.

[0159] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절된 치료 반감기"는 비변형 형태에 비해 치료적 유효량의 반감기에서 긍정적 또는 부정적 변화를 의미한다. 치료적 반감기는 투여 후 다양한 시점에 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 증가된 치료적 반감기는 바람직하게는 특히 유리한 용량 섭생, 특히 유리한 전체 용량을 가능하게 하거나 또는 원치않는 효과를 회피한다. 일부 실시형태에서, 증가된 치료적 반감기는 증가된 효능, 그것의 표적에 변형된 분자의 증가되거나 또는 감소된 결합, 프로테아제와 같은 효소에 의한 분자의 증가되거나 또는 감소된 파괴 또는 비-변형 분자의 다른 변수 또는 메커니즘에서 증가 또는 감소 또는 분자의 수용체-매개 클리어런스의 증가 또는 감소로부터 초래된다.

[0160] 용어 "분리된"은 핵산 또는 단백질에 적용될 때, 핵산 또는 단백질이 그것이 천연 상태에서 결합된 세포 성분의 적어도 일부가 없거나 또는 핵산 또는 단백질이 그것의 생체내 또는 시험관내 생성 농도 초과 수준으로 농축되는 것으로 의미된다. 이는 균질한 상태로 있을 수 있다. 분리된 물질은 건조 또는 반-건조 상태 중 하나로, 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 수용액을 포함하는 용액으로 있을 수 있다. 추가적인 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 성분이 있을 수 있다. 순도 및 균질도는 전형적으로 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 화학 기법을 사용하여 결정된다. 제제 내에 존재 하는 우세한 종인 단백질은 실질적으로 정제된다. 특히, 분리된 유전자는 유전자 옆에 있고 관심의 유전자 이외의 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임으로부터 분리된다. 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔 내 실질적으로 하나의 밴드에 대해 일어나는 것으로 의미된다. 특히, 핵산 또는 단백질은 적어도 85% 순도, 적어도 90% 순도, 적어도 95% 순도, 적어도 99% 또는 그 초과 순도라는 것을 의미할 수 있다.

[0161] 용어 "핵산"은 단일- 또는 이중-가닥 형태로 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오사이드, 리보뉴클레오사이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 폴리머를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한되지 않는다면, 해당 용어는 기준 핵산으로서 유사한 결합 특성을 갖는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함하며 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사된다. 달리 구체적으로 제한되지 않는다면, 해당 용어는 또한 PNA(펩티도핵산), 안티센스 기법에 사용된 DNA의 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미다이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 지칭한다. 달리 표시되지 않는다면, 특정 핵산 서열은 또한 이것의 보존적으로 변형된 변이체(이에 제한되는 것은 아니지만, 축퇴 코돈 치환을 포함) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명확하게 표시된 서열을 절대적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 만드는 것에 의해 달성될 수 있다(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0162] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하는 것으로 본 명세서에서 상호호환적으로 사용된다. 즉, 폴리펩타이드에 관한 기재는 펩타이드의 설명 및 단백질의 설명 및 그 반대와 동일하게 적용된다. 해당 용어는 자연적으로 발생하는 아미노산 폴리머뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-자연적으로 암호화된 아미노산인 아미노산 폴리머에 적용된다. 본 명세서에서 사용되는 것과 같은 용어는 전장

단백질을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함하되, 해당 아미노산 잔기는 공유 펩타이드 결합에 의해 연결된다.

[0163] 용어 "아미노산"은 자연적으로 발생하는 및 비-자연적으로 발생하는 아미노산뿐만 아니라 자연적으로 발생하는 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연적으로 암호화된 아미노산은 20가지의 공통 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 아이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린) 및 파이로리신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 자연적으로 발생하는 아미노산과 같은 동일한 염기성 화학 구조를 갖는 화합물, 즉, 수소, 카복실 기, 아미노기 및 R 기, 예컨대 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폰사이드, 메티오닌 메틸 설포늄에 결합된 α 탄소를 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예컨대 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 백본을 가지지만, 자연적으로 발생하는 아미노산과 같은 동일 염기성 화학 구조를 보유한다. 아미노산에 대한 기준은, 예를 들어 자연적으로 발생하는 프로테오제닉(proteogenic) L-아미노산; 아미노산 변이체 및 유도체와 같은 화학적으로 변형된 아미노산인 D-아미노산; 자연적으로 발생하는 비-프로테오제닉 아미노산, 예컨대 β -알라닌, 오르니틴 등; 및 아미노산의 특징이 되는 것으로 당업계에 공지된 특성을 갖는 화학적으로 합성된 화합물을 포함한다. 비-천연적으로 발생하는 아미노산의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, α -메틸 아미노산(예를 들어, α -메틸 알라닌), D-아미노산, 히스티딘-유사 아미노산(예를 들어, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘 및 α -메틸-히스티딘), 측쇄 내에 추가 메틸렌을 갖는 아미노산("호모" 아미노산) 및 측쇄 내 카복실산 작용기가 설폰산 기(예를 들어 시스테인산)으로 대체되는 아미노산을 포함한다. 본 발명의 단백질 내로 합성 비-천연 아미노산, 치환된 아미노산 또는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 비천연 아미노산의 포함은 다수의 상이한 방법에서 유리할 수 있다. D-아미노산-함유 펩타이드 등은 L-아미노산-함유 대응관계와 비교하여 시험관내 또는 생체내에서 증가된 안정성을 나타낸다. 따라서, D-아미노산을 포함하는 펩타이드의 구성은 더 큰 세포내 안정성이 요망되거나 또는 필요로 될 때 특히 유용할 수 있다. 더 구체적으로는, D-펩타이드 등은 내인성 펩티다제 및 프로테아제에 저항성이며, 이에 의해 이러한 특성이 바람직할 때 분자의 개선된 생체이용가능성 및 연장된 생체내 수명을 제공한다. 추가적으로, D-펩타이드 등은 T 헬퍼 세포에 주된 조직적합 복합체 클래스 II-제한된 제시를 위해 효율적으로 처리될 수 없고, 따라서, 전체 기관 내 체액성 면역반응을 유발할 가능성이 더 적다.

[0164] 아미노산은 보통 알려진 3글자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에서 추천되는 한 글자 기호에 의해 본 명세서에서 언급될 수 있다. 마찬가지로 뉴클레오타이드는 그것의 보통 허용되는 한 글자 코드에 의해 언급될 수 있다.

[0165] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산과 핵산 서열을 둘 다 적용한다. 특정 핵산 서열에 대해, "보존적으로 변형된 변이체"는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 해당 핵산을 지칭하며, 또는 핵산이 아미노산 서열을 암호화하지 않는 경우 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴 때문에, 매우 다수의 기능적으로 동일한 핵산이 어떤 주어진 단백질을 암호화한다. 예를 들어 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 암호화한다. 따라서 알라닌이 코돈에 의해 특징되는 경우 모든 위치에서, 해당 코돈은 암호화된 폴리펩타이드를 변경하지 않고 기재된 대응하는 코돈 중 어떤 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변형은 "침묵 변형"인데, 이는 상보적으로 변형된 변형의 한 종류이다. 폴리펩타이드를 암호화하는 본 명세서의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변형을 기재한다. 당업자는 핵산 내 각 코돈이(보통 메티오닌에 대해 유일한 코돈인 AUG 및 보통 트립토판에 대해 유일한 코돈인 TGG를 제외) 변형되어 기능적으로 동일한 분자를 수득할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 각 침묵 변형은 각각의 기재 서열에 내포된다.

[0166] 아미노산 서열로서, 당업자는 변경이 아미노산의 결실, 아미노산의 첨가 또는 화학적으로 유사한 아미노산으로 아미노산의 치환을 초래하는 경우, 암호화된 서열 내 단일 아미노산 또는 적은 %의 아미노산을 변경하고, 첨가하거나 또는 결실시키는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개개의 치환, 결실이 "상보적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체가 추가되며, 본 발명의 다형성 변이체, 이종간 상동체 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

[0167] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업자에게 공지되어 있다. 다음의 8개의 기는 각자 서로 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

[0168] 1) 알라닌(A), 글라이신(G);

- [0169] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);
 - [0170] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);
 - [0171] 4) 아르기닌(R), 리신(K);
 - [0172] 5) 아이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V);
 - [0173] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);
 - [0174] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및
 - [0175] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)
- [0176] (예를 들어, 문헌[Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)) 참조].
- [0177] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 내용에서 용어 "동일한" 또는 "동일성%"는 동일한 2 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 서열은 그것이 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 백분율을 가진다면(즉, 특정 영역에 걸쳐 약 60% 동일성, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95% 동일성), 비교창을 거쳐서 최대 대응도로 비교되고 할당되거나, 또는 다음의 서열 비교 알고리즘 중 하나(또는 당업자가 이용가능한 다른 알고리즘)를 사용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정되는 것과 같은 지정 영역과 "실질적으로 동일"하다. 이 정의는 또한 시험 서열의 보체를 지칭한다. 동일성은 길이로 적어도 약 50개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 걸쳐, 또는 길이로 75-100개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 걸쳐, 또는 특정되지 않는 경우 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 전체 서열을 가로질러 존재할 수 있다. 인간 이외의 종으로부터의 상동체를 포함하는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 엄격 혼성화 조건 하에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 이것의 단편을 갖는 표지된 프로브로 라이브러리를 스크리닝하는 단계, 및 상기 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 전장 cDNA 및 게놈 클론을 분리시키는 단계를 포함하는 과정에 의해 얻을 수 있다. 이러한 혼성화 기법은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0178] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하여, 시험 및 기준 서열은 컴퓨터에 입력되고, 이어서 좌표가 지정되며, 필요하다면 서열 알고리즘 프로그램 변수가 지정된다. 디폴트 프로그램 변수가 사용될 수 있거나 또는 대안의 변수가 지정될 수 있다. 그 다음에 서열 비교 알고리즘은 프로그램 변수를 기준으로 기준 서열에 대한 시험 서열에 대한 서열 동일성%를 계산한다.
- [0179] 본 명세서에서 사용되는 "비교 창"은 20 내지 600, 보통 약 50 내지 약 200, 더 보통으로는 약 100 내지 약 150으로 이루어진 군으로부터 선택된 연속 위치의 수 중 어느 하나의 절편에 대한 기준을 포함하며, 이때 서열은 2개의 서열이 최적으로 배열된 후 동일한 수의 연속 위치의 기준 서열과 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열 배열 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 배열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 문헌[Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 방법에 대한 검색에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 실행에 의해(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), 또는 수동 정렬 및 육안 검사(예를 들어, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)) 참조)에 의하는 것을 포함하여 수행될 수 있다.
- [0180] 서열 동일성% 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘인데, 이는 문헌[Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 및 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 ncbi.nlm.nih.gov에서 월드 와이드 웹에서 이용가능한 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공공연하게 입수가능하다. BLAST 알고리즘 변수 W, T 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열에 대해)은 디폴트로서 11의 단어길이(wordlength, W), 및 10의 예상치(expectation, E), M=5, N=-4 및 가닥 둘 다의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이, 10의 예상치(E) 및 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(문헌[Henilcoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915] 참조) 정렬, 10의 예상치(E), M=5, N=-4 및 가닥 둘 다의 비교를 사용한다. BLAST 알고리즘은 전형적으로 필터가 꺼진 "낮은 복잡도"로 수행된다.

- [0181] BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 사이의 유사성의 통계적 분석을 수행한다(예를 들어, 문헌[Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 측정은 가장 작은 합계의 확률(P(N))인데, 이는 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매치가 우연히 일어나는 확률의 표시를 제공한다. 예를 들어, 기준 핵산과 시험 핵산의 비교에서 가장 작은 합계 확률이 약 0.2 미만 또는 약 0.01 미만 또는 약 0.001 미만이라면, 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 고려된다.
- [0182] 어구 "선택적으로(또는 특이적으로) 혼성화하는"은 해당 서열이 복합체 혼합물(이에 제한되는 것은 아니지만, 전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 UNA)에 존재할 때, 엄격 혼성화 조건 하에서 단지 특정 뉴클레오타이드 서열에 대한 분자의 결합, 듀플렉싱 또는 혼성화를 지칭한다.
- [0183] 어구 "엄격한 혼성화 조건"은 당업계에 공지된 바와 같이 낮은 이온 강도 및 고온의 조건 하에서 DNA, RNA, PNA 또는 다른 핵산 모방체 또는 이들의 조합 서열의 혼성화를 지칭한다. 전형적으로, 엄격 조건 하에서, 프로브는 핵산의 복합체 혼합물(이에 제한되는 것은 아니지만, 전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA)에서 그것의 표적 하위서열과 혼성화 할 것이지만, 복합체 혼합물 내 다른 서열과 혼성화하지 않는다. 엄격 조건은 서열 의존적이며, 상이한 환경에서 다를 것이다. 더 긴 서열이 고온에서 특이적으로 혼성화된다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 가이드는 문헌[Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of 핵산 assays" (1993)]에서 발견된다. 일반적으로, 엄격 조건은 정해진 이온 강도 pH에서 특이적 서열에 대해 열 용융 점(T_m)보다 더 낮은 약 5-10℃가 되도록 선택된다. T_m은 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형상태(표적 서열은 과량으로 존재 하기 때문에, T_m에서 프로브의 50%는 평형상태로 점유됨)에서 표적 서열과 혼성화하는 온도(정해진 이온 강도, pH 및 핵 농도)이다. 엄격 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온, 전형적으로 약 0.01 내지 1.0 M이며, 온도는 짧은 프로브(이에 제한되는 것은 아니지만, 10 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함)에 대해 적어도 약 30℃ 및 긴 프로브(이에 제한되는 것은 아니지만, 50개 초과 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 60℃인 것일 수 있다. 엄격 조건은 또한 포름아마이드와 같은 탈안정제의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 포지티브 신호는 적어도 2배 배경, 선택적으로 10배 배경 혼성화될 수 있다. 대표적인 엄격 혼성화 조건은 다음과 같을 수 있다: 42℃에서 인큐베이션하는 50% 포름아마이드, 5X SSC 및 1% SDS, 또는 65℃에서 인큐베이션하는 5X SSC, 1% SDS, 65℃에서 0.2X SSC 및 0.1% SDS 중에서 세척. 이러한 세척은 5, 15, 30, 60, 120 또는 초과 분 동안 수행될 수 있다.
- [0184] 본 명세서에서 사용되는 용어 "진핵생물"은 계통발생 도메인 진핵생물계(Eucarya), 예컨대 동물(이에 제한되는 것은 아니지만, 포유류, 곤충, 파충류, 조류 등), 섬모류, 식물(이에 제한되는 것은 아니지만, 단자엽식물강, 쌍떡잎식물강, 조류(algae) 등), 진균, 효모, 편모충, 미포자충류, 원생생물 등에 속하는 유기체를 지칭한다.
- [0185] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비-진핵생물"은 비-진핵 유기체를 지칭한다. 예를 들어, 비-진핵 유기체는 진정 세균(Eubacteria)(이에 제한되는 것은 아니지만, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*), 바실러스 스테아로써모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등을 포함) 계통발생 도메인 또는 고세균(Archaea)(이에 제한되는 것은 아니지만, 메타노코커스 야나시(*Methanococcus jannaschii*), 메타노박테리움 써모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 할로박테리움(*Halobacterium*), 예컨대 할로페락스 볼카니(*Haloferax volcanii*) 및 할로박테리움(*Halobacterium*) 종 NRC-1, 아케오글로버스 펠지더스(*Archaeoglobus fulgidus*), 파이로코커스 퓨리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코시(*Pyrococcus horikoshii*), 에우로파이럼 페르닉스(*Aeuropyrum pernix*) 등) 계통발생 도메인에 속할 수 있다.
- [0186] 본 명세서에서 사용되는 "피험체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 동물, 일부 실시형태에서 포유류, 및 다른 실시형태에서 인간을 지칭한다. 동물은 반려동물(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험실 동물(예를 들어, 래트, 마우스, 기니아 피그 등)일 수 있다.
- [0187] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효량"은 치료되는 질병, 질환 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 일정한 정도로 완화시키는 투여되는 변형된 비-천연 아미노산의 양을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 변형된 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 예방, 향상 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.
- [0188] 용어 "향상하다" 또는 "향상하는"은 효능 또는 원하는 효과의 지속기간을 증가시키거나 또는 연장시키는 것으로 의미된다. 따라서, 치료제의 효과를 향상시키는 것에 관해서, 용어 "향상시키는"은 효능 또는 지속기간에서 시스템 상에서 다른 약제의 효과를 증가시키거나 또는 연장시키는 능력을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "향

상-유효량"은 원하는 시스템에서 다른 치료제의 효과를 향상시키는데 적합한 양을 지칭한다. 환자에서 사용될 때, 이 용도에 효과적인 양은 질병, 장애 또는 질환의 중증도 및 과정, 이전의 치료, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응 및 치료하는 담당의의 판단에 의존할 것이다.

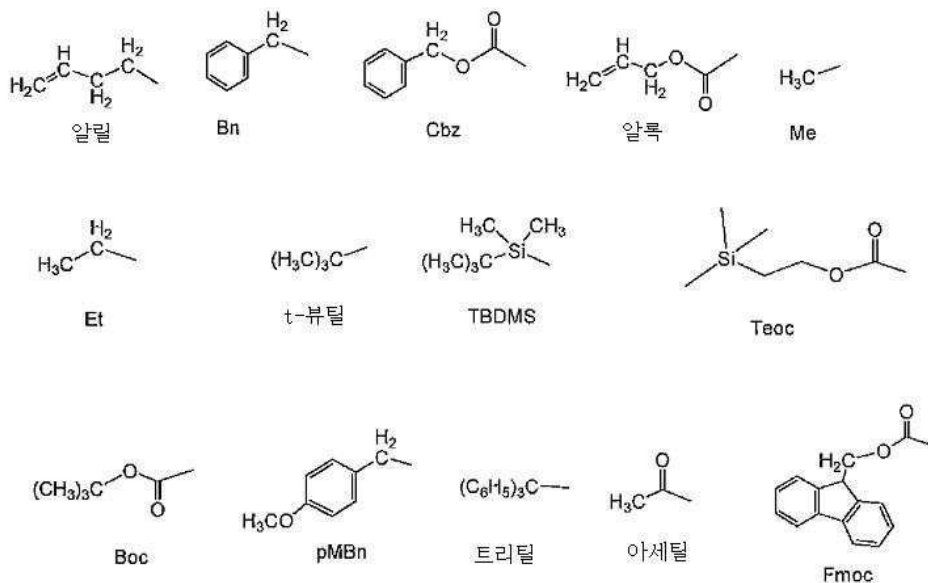
[0189] 본 명세서에서 사용되는 용어 "변형된"은 주어진 폴리펩타이드로 만들어진 임의의 변화, 예컨대 폴리펩타이드의 길이에 대한 변화, 아미노산 서열, 화학적 구조, 공동-번역 변형 또는 폴리펩타이드의 번역 후 변형을 지칭한다. "(변형된)" 형태라는 용어는 논의된 폴리펩타이드가 선택적으로 변형되고, 즉 논의 조건 하에 폴리펩타이드가 변형되거나 또는 미변형될 수 있다는 것으로 의미된다.

[0190] 용어 "번역 후 변형된"은 폴리펩타이드쇄 내로 포함된 후 이러한 아미노산에 일어나는 천연 또는 비-천연 아미노산의 임의의 변형을 지칭한다. 해당 용어는, 단지 예로서 공동-번역 생체내 변형, 공동 번역 시험관내 변형(예컨대 세포-유리 번역 시스템), 번역 후 생체내 변형 및 번역 후 시험관내 변형을 포함한다.

[0191] 예방적 용도에서, 릴랙신 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 특정 질병, 장애 또는 질환에 걸리기 쉽거나 또는 달리 위험에 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효량"이 되는 것으로 정의된다. 이 용도에서, 정확한 양은 또한 환자의 건강 상태, 체중 등에 의존한다. 일상적인 실험(예를 들어, 용량 점증(dose escalation) 임상 시험)에 의해 이러한 예방적 유효량을 결정하는 것은 당업자의 능력 내에서 잘 고려된다.

[0192] 용어 "보호된"은 특정 반응 조건 하에 화학적으로 반응성인 작용기의 반응을 방지하는 "보호기" 또는 모이어티의 존재를 지칭한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응기의 유형에 따라서 다를 것이다. 예를 들어, 화학적 반응기가 아민 또는 하이드라자이드라면, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc)의 군으로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응기가 티올이라면, 보호기는 오쏘피리디다이에실파이드일 수 있다. 화학적 반응기가 부탄산 또는 프로피온산과 같은 카복실산 또는 하이드록실기라면, 보호기는 벤질 또는 알킬기, 예컨대 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. Nvoc 및 MeNvoc과 같은 광 분해성(photolabile) 기를 포함하는, 당업계에서 공지된 다른 보호기는 또한 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물로 또는 함께 사용될 수 있다. 당업계에서 공지된 다른 보호기가 또한 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물로 또는 함께 사용될 수 있다.

[0193] 단지 예로서, 차단/보호기는 하기로부터 선택될 수 있다:



[0194]

[0195] 다른 보호기는 문헌[Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999]에 기재되며, 이는 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0196] 치료적 용도에서, 변형된 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 질병, 장애 또는 질환의 증상을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 막기에 충분한 양으로 질병, 질환 또는 장애에 이미 걸린 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "치료적 유효량"이 되는 것으로 정의되며, 질병, 장애 또는 질환의 중증도 및 과정, 이전의 치료, 환자의 건강상태 및 약물에 대한 반응 및 치료하는 의사의 판단에 의존할 것이다. 일상적인 실험(예를 들어, 용량 점증 임상 시험)에 의해 이러한 치료적 유효량을 결정하는 것은 당업자의 능력 내에서 잘 고려된다.

- [0197] 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드는 혈관수축, NO 생성, ET-1, Ang II 및 혈소판 응집을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 한 실시형태에서, 치료가 필요한 환자는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% 초과, 150%, 150% 초과, 200%, 200% 초과로써 그들의 탐색 치료 기준 이상으로 환자의 혈관수축을 감소시키는 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드의 치료적 양을 받는다. 본 발명의 다른 실시형태는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% 초과, 150%, 150% 초과, 200%, 200% 초과로써 NO 생성을 증가시키는 릴렉신 폴리펩타이드의 치료적 유효량을 투여함으로써 환자의 NO 생성을 증가시키는 치료가 필요한 환자의 치료방법이다.
- [0198] 본 발명의 한 실시형태는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% 초과, 150%, 150% 초과, 200%, 200% 초과로써 환자의 혈소판 응집을 감소시키는 본 발명의 폴리펩타이드의 치료적 양에 의한 치료가 필요한 환자의 치료 방법이다. 본 발명의 다른 실시형태는 비대를 감소시키는 릴렉신 폴리펩타이드의 치료적 양에 의한 치료가 필요한 환자의 치료방법이다. 본 발명의 다른 실시형태는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% 초과, 150%, 150% 초과, 200%, 200% 초과로써 환자의 CF-자극 단백질 합성을 감소시키는 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드의 치료적 양에 의한 치료가 필요한 환자의 치료방법이다. 본 발명의 다른 실시형태는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% 초과, 150%, 150% 초과, 200%, 200% 초과로써 NO 생성을 증가시키는 릴렉신 폴리펩타이드의 치료적 유효량을 투여하는 것에 의해 환자의 ANP 발현을 증가시키는 치료가 필요한 환자의 치료방법이다.
- [0199] 본 발명의 페그-릴렉신에 의한 본 방법은 야생형 릴렉신 15-배 증가; 15-배 증가 초과; 20-배 증가 초과; 20-배 증가 초과; 25 배 증가 초과; 25-배 증가 초과; 30-배 증가 초과; 30-배 증가 초과; 35-배 증가 초과; 35-배 증가 초과; 40-배 증가 초과; 40-배 증가 초과; 45-배 증가 초과; 45-배 증가 초과; 50-배 증가 초과; 50-배 증가 초과; 55-배 증가 초과; 55-배 증가 초과; 60-배 증가 초과; 60-배 증가 초과; 65-배 증가 초과; 65-배 증가 초과; 70-배 증가 초과; 70-배 증가 초과; 75-배 증가 초과; 75-배 증가 초과; 80-배 증가 초과; 80-배 증가 초과; 85-배 증가 초과; 85-배 증가 초과; 90-배 증가 초과; 90-배 증가 초과; 95-배 증가 초과; 95-배 증가 초과; 100-배 증가 초과; 100-배 증가 초과와 비교하여 AUC에서 10-배 증가를 가진다.
- [0200] 용어 "치료하는"은 예방적 및/또는 치료적 처치를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0201] 본 명세서에 제시된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 폴리펩타이드는 보통 천연에서 발견되는 원자량 또는 원자번호와 상이한 원자량 또는 원자번호를 갖는 원자로 대체된 하나 이상의 원자를 갖는 동위원소-표지된 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물에 포함될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 플루오르 및 염소, 예컨대 각각 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 35S, 18F, 36Cl의 동위원소를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 특정 동위원소-표지 화합물, 예를 들어 3H 및 14C와 같은 방사성 동위원소가 포함되는 것은 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용할 수 있다. 추가로, 듀테륨, 즉 2H와 같은 동위원소로 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투약량 필요로부터 초래되는 특정 치료적 이점을 제공할 수 있다.
- [0202] 이에 제한되는 것은 아니지만, 부분입체이성질체, 거울상체 및 이것의 혼합물을 포함하는 모든 이성질체는 본 명세서에 기재된 조성물의 부분으로서 고려된다. 추가로 또는 추가 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 폴리펩타이드는 대사물을 생성할 필요가 있는 유기체에 투여 시 대사된 다음, 원하는 치료 효과를 포함하는 원하는 효과를 생성하기 위해 사용된다. 추가로 또는 추가적인 실시형태는 비-자연적으로 암호화된 아미노산 폴리펩타이드의 활성 대사물이다.
- [0203] 일부 상황에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 폴리펩타이드는 호변체로서 존재할 수 있다. 추가로, 본 명세서에 기재된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 폴리펩타이드는 비용매화된 형태뿐만 아니라 약제학적으로 허용 가능한 용매, 예컨대 물, 에탄올 등과 함께 용매화된 형태로 존재할 수 있다. 용매화된 형태는 또한 본 명세서에 개시된 것으로 고려된다. 당업자는 본 명세서의 화합물의 일부가 몇몇 호변체 형태로 존재할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 모든 이러한 호변체 형태는 본 명세서에 기재된 조성물의 부분으로서 고려된다.
- [0204] 달리 표시되지 않는다면, 당업계의 기술 내에 있는 질량 분광학, NMR, HPLC, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기법 및 약동학의 통상적인 방법이 사용된다.

[0205] 상세한 설명

[0206] I. 도입

폴리펩타이드는 폴리펩타이드 내 비-자연적으로 암호화된 아미노산에서 글라이코실화를 향상시키는 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 첨가 및/또는 치환을 포함한다.

[0211] 한 실시형태에서, 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합(이에 제한되는 것은 아니지만, 올리고당이 (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc 등을 포함하는 경우)에 의해 아스파라긴에 올리고당의 부착을 포함한다. 다른 실시형태에서, 번역 후 변형은 GalNAc-세린, GalNAc-트레오닌, GlcNAc-세린 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의해 세린 또는 트레오닌에 올리고당의 부착(이에 제한되는 것은 아니지만, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc 등을 포함)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩타이드는 분비 또는 국소화 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함할 수 있다. 분비 신호 서열의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 원핵 분비 신호 서열, 진핵 분비 신호 서열, 박테리아 발현을 위해 5'-최적화된 진핵 분비 신호 서열, 신규 분비 신호 서열, 펩타이드 리아제 분비 신호 서열, Omp A 분비 신호 서열 및 파지 분비 신호 서열을 포함한다. 분비 신호 서열의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, STII(원핵세포), Fd GIII 및 M13(파지), Bgl2(효모) 및 트랜스포존으로부터 유래된 신호 서열 bla를 포함한다. 임의의 이러한 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나의 신호 서열을 상이한 신호 서열로 치환하고, 리더 서열을 상이한 리더 서열로 치환하는 것 등을 포함하는 폴리펩타이드와 함께 원하는 결과를 제공하도록 변형될 수 있다.

[0212] 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 10개 이상의 비천연 아미노산을 함유할 수 있다. 비천연 아미노산은 동일 또는 상이할 수 있고, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 초과 상이한 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 초과 상이한 부위가 있을 수 있다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의, 그러나 모두 보다는 적은 단백질의 자연적으로 생기는 형태에 존재 하는 특정 아미노산이 비천연 아미노산으로 치환된다.

[0213] 본 발명은 적어도 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 리렉신에 기반한 방법 및 조성물을 제공한다. 리렉신 내에 적어도 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 도입은, 이에 제한되는 것은 아니지만 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 한편, 보통 생기는 20개의 아미노산과 반응성이 아닌 특정 화학 반응을 수반하는 컨주게이션 화학을 적용시킨다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 리렉신은 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄를 통해 수용성 폴리머, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)에 연결된다. 본 발명은, 이에 제한되는 것은 아니지만 작용기 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 케톤 아자이드 또는 아세틸렌 모이티어를 포함하는 20가지의 자연적으로 포함된 아미노산에서 발견되지 않는 치환체를 함유하는 해당 아미노산을 포함하는 비-유전적으로 암호화된 아미노산의 선택자 코돈 내에 선택적 포함을 수반하는, PEG 유도체에 의한 단백질의 선택적 변형 및 적합하게 반응성인 PEG 유도체에 의한 해당 아미노산의 이후의 변형을 위한 가장 효율적인 방법을 제공한다. 일단 포함되면, 그 다음에 아미노산 측쇄는 비-자연적으로 암호화된 아미노산 내 존재 하는 특정 작용기 또는 치환체에 적합한 당업자에게 공지된 화학 방법을 이용함으로써 변형될 수 있다. 매우 다양한 공지된 화학 방법이 단백질 내에 수용성 폴리머를 포함시키는 본 발명에서의 사용을 위해 적합하다. 이러한 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아세틸렌 또는 아자이드 유도체 각각을 포함하는, 이에 제한되는 것은 아니지만, Huisgen [3+2] 사이클로첨가 반응을 포함한다(예를 들어 문헌 [Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; 및 Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176] 참조).

[0214] Huisgen [3+2] 사이클로첨가 방법은 친핵성 치환 반응보다는 사이클로첨가를 수반하기 때문에, 단백질은 극도로 높은 선택성으로 변형될 수 있다. 반응은 반응 혼합물에 촉매적 양의 Cu(I) 염의 첨가에 의해 뛰어난 위치 선택성(regioselectivity)(1,4 > 1,5)을 갖는 수성 조건으로 실온에서 수행된다. 예를 들어, 문헌[Tornøe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064]; 및 문헌[Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599]; 및 WO 03/101972를 참조한다. [3+2] 사이클로첨가를 통해 본 발명의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 사실상, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아지도 또는 아세틸렌 유도체를 포함하는 적합한 작용기 또는 치환체를 갖는 임의의 분자를 포함한다. 이들 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하는 아세틸렌 기 또는 이에 제한되는 것은 아니지만, p-아지도-페닐알라닌을 포함하는 아지도 기를 각각 갖는 비천연 아미노산에 첨가될 수 있다.

[0215] Huisgen [3+2] 사이클로첨가로부터 초래되는 5-원 고리는 일반적으로 환원 환경에서 가역적이지 않으며 수성 환경에서 연장된 기간 동안 가수분해에 대해 안정하다. 결과적으로, 매우 다양한 물질의 물리적 및 화학적 특징이 본 발명의 활성 PEG 유도체와 함께 요구하는 수성 조건 하에서 변형될 수 있다. 훨씬 더 중요하게는, 아자이드

및 아세틸렌 모이어티가 서로 특이적이기 때문에(예를 들어, 20가지의 보통의 유전적으로-암호화된 아미노산 중 어떤 것과 반응하지 않음), 단백질은 극도로 높은 선택성을 갖는 하나 이상의 특이적 부위에서 변형될 수 있다.

[0216] 본 발명은 또한 PEG 유도체의 수용성 및 가수분해적으로 안정한 유도체 및 하나 이상의 아세틸렌 또는 아자이드 모이어티를 갖는 관련된 친수성 폴리머를 제공한다. 아세틸렌 모이어티를 함유하는 PEG 폴리머 유도체는 선택자 코돈에 반응하는 단백질 내로 선택적으로 도입된 아자이드 모이어티와 커플링에 대해 고도로 선택적이다. 유사하게, 아자이드 모이어티를 함유하는 PEG 폴리머 유도체는 선택자 코돈에 반응하는 단백질 내로 선택적으로 도입된 아세틸렌 모이어티와 커플링에 대해 매우 선택적이다.

[0217] 더 구체적으로, 아자이드 모이어티는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알킬 아자이드, 아릴 아자이드 및 이들 아자이드의 유도체를 포함한다. 아세틸렌-특이적 반응성이 유지된다면 알킬 및 아릴 아자이드의 유도체는 다른 치환체를 포함할 수 있다. 아세틸렌 모이어티는 알킬 및 아릴 아세틸렌 및 각각의 유도체를 포함한다. 아자이드-특이적 반응성이 유지된다면, 알킬 및 아릴 아세틸렌의 유도체는 다른 치환체를 포함할 수 있다.

[0218] 본 발명은 매우 다양한 작용기, 치환체 또는 모이어티를, 이에 제한되는 것은 아니지만, 표지; 염료; 폴리머; 수용성 폴리머; 폴리에틸렌 글라이콜의 유도체; 광가교제; 방사성핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이터; 보조인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오타이드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 당류, 수용성 텐드리머; 사이클로덱스트린; 억제 리보핵산; 생체재료; 나노입자; 스핀 표지; 형광단, 금속-함유 모이어티; 방사성활성 모이어티; 신규 작용기; 다른 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호작용하는 기; 포토케이지(photocage)된 모이어티; 화학 방사선 여기 모이어티; 광이성질체화 모이어티; 바이오틴; 바이오틴 유도체; 바이오틴 유사체; 중원자를 포함하는 모이어티; 화학적으로 절단가능한 기; 광절단가능 기; 연장된 측쇄; 탄소-연결 당; 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 방사성 표지된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 기; 화학 발광 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 간섭 기; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적으로 활성인 작용제; 검출가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오타이드; 방사성 트랜스미터; 뉴런-포획제 또는 상기의 임의의 조합 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질을 포함하는 분자의 부착을 포함하는 다른 물질과 함께 갖는 물질의 컨주게이트를 제공한다. 본 발명은 또한 대응하는 아세틸렌 또는 아자이드 모이어티를 갖는 PEG 폴리머 유도체와 아자이드 또는 아세틸렌 모이어티를 갖는 물질의 컨주게이트를 포함한다. 예를 들어, 아자이드 모이어티를 함유하는 PEG 폴리머는 아세틸렌 작용기를 함유하는 비-유전적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 단백질 내 위치에서 생물학적으로 활성인 분자에 커플링될 수 있다. PEG 및 생물학적으로 활성인 분자가 커플링된 결합은, 이에 제한되는 것은 아니지만, Huisgen [3+2] 사이클로첨가 생성물을 포함한다.

[0219] PEG가 생체물질의 표면을 변형시키는데 사용될 수 있다는 것은 당업계에 잘 확립되어 있다(예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제6,610,281호; 문헌[Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1): 125-136 (2000)] 참조). 본 발명은 또한 하나 이상의 반응성 아자이드 또는 아세틸렌 부위 및 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 결합을 통해 표면에 결합된 본 발명의 아자이드- 또는 아세틸렌-함유 폴리머 중 하나 이상을 갖는 표면을 포함하는 생체물질을 포함한다. 생체물질 및 다른 물질은 또한 아자이드 또는 아세틸렌 결합 이외의 결합을 통해, 예컨대 카복실산, 아민, 알코올 또는 티올 모이어티를 포함하는 결합을 통해 아자이드- 또는 아세틸렌-활성화된 폴리머 유도체에 커플링되어 이후의 반응에 대해 이용가능한 아자이드 또는 아세틸렌 모이어티를 이탈한다.

[0220] 본 발명은 본 발명의 아자이드- 및 아세틸렌-함유 폴리머를 합성하는 방법을 포함한다. 아자이드-함유 PEG 유도체의 경우에, 아자이드는 폴리머의 탄소 원자에 직접적으로 결합될 수 있다. 대안적으로, 아자이드-함유 PEG 유도체는 통상적인 활성화된 폴리머에 대해 하나의 말단에서 아자이드 모이어티를 갖는 결합체를 부착함으로써 제조될 수 있고, 따라서 얻어진 폴리머는 그것의 말단에서 아자이드 모이어티를 가진다. 아세틸렌-함유 PEG 유도체의 경우에, 아세틸렌은 폴리머의 탄소 원자에 직접 결합될 수 있다. 대안적으로, 아세틸렌-함유 PEG 유도체는 통상적인 활성화된 폴리머에 대한 한 말단에서 아세틸렌 모이어티를 갖는 결합체를 부착함으로써 제조될 수 있고, 따라서 얻어진 폴리머는 그것의 말단에서 아세틸렌 모이어티를 가진다.

[0221] 더 구체적으로는, 아자이드-함유 PEG 유도체의 경우에, 적어도 하나의 활성 하이드록실 모이어티를 갖는 수용성 폴리머는 그것에 더 반응성인 모이어티, 예컨대 메실레이트, 트레실레이트, 토실레이트 또는 할로겐 이탈기를 갖는 치환된 폴리머를 생성하는 반응을 겪는다. 설포닐 산 할로겐화물, 할로겐 원자 및 다른 이탈기를 함유하는 PEG 유도체의 제조 및 사용은 당업자에게 공지되어 있다. 그 다음에 얻어진 치환된 폴리머는 폴리머의 말단에서 더 반응성인 모이어티를 아자이드 모이어티로 치환하는 반응을 겪는다. 대안적으로 적어도 하나의 활성 친핵성

또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 폴리머는 하나의 말단에서 아자이드를 갖는 결합제와 반응하고, 따라서 PEG 폴리머와 결합제 사이에 공유 결합이 형성되며, 아자이드 모이어티는 폴리머의 말단에 위치된다. 아민, 티올, 하이드라자이드, 하이드라진, 알코올, 카복실레이트, 알데하이드, 케톤, 티오에스터 등을 포함하는 친핵성 및 친전자성 모이어티는 당업자에게 공지되어 있다.

[0222] 더 구체적으로는, 아세틸렌-함유 PEG 유도체의 경우에, 적어도 하나의 활성 하이드록실 모이어티를 갖는 수용성 폴리머는 아세틸렌 모이어티를 함유하는 전구체로부터 할로젠 또는 다른 활성화된 이탈기를 치환하는 반응을 겪는다. 대안적으로, 적어도 하나의 활성 친핵성 또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 폴리머는 하나의 말단에서 아세틸렌을 갖는 결합제와 반응하고, 따라서 PEG 폴리머와 결합제 사이에 공유 결합이 형성되며, 아세틸렌 모이어티는 폴리머의 말단에 위치된다. 유기 합성의 내용에서 할로젠 모이어티, 활성화된 이탈기, 친핵성 및 친전자성 모이어티의 사용 및 PEG 유도체의 제조 및 사용은 당업자에게 잘 확립되어 있다.

[0223] 본 발명은 또한, 이에 제한되는 것은 아니지만, 수용성 폴리머, 예컨대 아자이드 또는 아세틸렌 모이어티를 함유하는 PEG 및 PEG 유도체를 포함하는, 변형된 단백질에 다른 물질을 첨가하는 단백질의 선택적 변형 방법을 제공한다. 생체적합성, 안정성, 용해도 및 면역원성의 결여가 중요한 경우 아자이드- 및 아세틸렌-함유 PEG 유도체는 표면 및 분자의 특성을 변형시키는데 사용될 수 있는 반면, 동시에 단백질에 PEG 유도체를 부착시키는 더 선택적인 수단을 제공하는 것은 당업계에 이미 공지되어 있다.

[0224] 본 발명과 함께 사용을 위한 일반적 제조합 핵산 방법

[0225] 본 발명의 수많은 실시형태에서, 관심의 펩타이드를 암호화하는 핵산은 분리되고, 클로닝되며, 종종 제조합 방법을 사용하여 변경될 것이다. 이러한 실시형태는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 발현을 위해 또는 변이체, 유도체, 발현 카세트 또는 펩타이드로부터 유래된 다른 서열의 생성 동안 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 펩타이드를 암호화하는 서열은 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0226] 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 서열번호 1 및 서열번호 2에 표시된 아미노산 서열을 갖는 모 펩타이드의 아미노산 서열을 기준으로 합성될 수 있고, 그 다음에 적절한 아미노산 잔기(들)의 도입(즉, 포함 또는 치환) 또는 제거(즉, 결실 또는 치환)를 달성하기 위하여 뉴클레오타이드 서열을 변화시킨다. 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 방법에 따라서 부위-지정 돌연변이유발에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오타이드 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 올리고뉴클레오타이드 신시사이저를 사용하는 단계 및 제조합 펩타이드가 생성되는 숙주 세포에서 선호되는 해당 코돈을 바람직하게 선택하는 단계를 포함하는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있되, 올리고뉴클레오타이드는 원하는 펩타이드의 아미노산 서열을 기반으로 설계된다.

[0227] 본 발명은 제조합 유전학 분야에서 일상적인 기법을 이용한다. 본 발명에서 일반적인 사용 방법을 개시하는 기본적인 참고문헌은 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 및 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다.

[0228] 분자 생물학적 기법을 기재하는 일반적인 참고문헌은 문헌[Berger and Kimrnel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") 및 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, A joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) ("Ausubel")]을 포함한다. 이들 참고문헌은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비천연 아미노산, 직교 tRNA, 직교 신시타제(orthogonal synthetase) 및 이들의 쌍을 포함하는 단백질의 생성을 위한 선택자 코돈을 포함하는 유전자 또는 펩타이드의 생성을 포함하는 것에 관한 돌연변이유발, 벡터, 프로모터 및 다른 적절한 주제의 사용을 기재한다.

[0229] 다양한 유형의 돌연변이 유발이, 이에 제한되는 것은 아니지만 신규 신시타제 또는 tRNA를 생성하기 위해, tRNA 분자를 돌연변이시키기 위해, 신시타제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 돌연변이시키기 위해, tRNA의 라이브리리를 생성하기 위해, 신시타제의 라이브리리를 생성하기 위해, 선택자 코돈을 생성하기 위해, 관심의 단백질 또는 펩타이드 내 비천연 아미노산을 암호화하는 선택자 코돈을 삽입하기 위한 다양한 목적을 위하여 본 발명에서 사용된다. 그것들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 부위-지정, 무작위 점 돌연변이유발, 상동성 제조합, DNA 서플링 또는 다른 반복적 돌연변이유발 방법, 키메라 구성, 우라실 함유 주형을 사용하는

돌연변이유발, 올리고뉴클레오타이드-관련 돌연변이유발, 포스포로티오에이트-변형 DNA 돌연변이유발, 갭이 있는 듀플렉스 DNA 등을 사용하는 돌연변이유발, PCT-매개 돌연변이유발 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 추가적인 적합한 방법은 점 미스매치 복구, 복구-결핍 숙주 균주를 사용하는 돌연변이유발, 제한-선택 및 제한-정제, 결실 돌연변이유발, 전체 유전자 합성에 의한 돌연변이유발, 이중-가닥 파손 복구 등을 포함한다. 이에 제한되는 것은 아니지만 키메라 구성체를 포함하는 돌연변이유발이 또한 본 발명에 포함된다. 한 실시형태에서, 돌연변이유발은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 서열, 서열 비교, 물리적 특성, 2차, 3차 또는 4차 구조, 결정 구조 등을 포함하는 자연적으로 발생된 분자 또는 변경되거나 또는 돌연변이된 자연적으로 발생하는 분자의 공지된 정보에 의해 설명될 수 있다.

- [0230] 본 명세서에서 발견된 참고문헌 및 실시예는 이들 방법을 기재한다. 다음의 간행물 및 그 안에 인용된 참고문헌에서 추가적인 정보가 발견된다: 문헌[Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis; an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F, and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch- repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., Cassette mutagenesis: an

efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); 및 I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995)]. 다양한 돌연변이유발 방법에 의한 장애 추구(trouble-shooting) 문제에 대한 유용한 제어를 기재하는 문헌[*Methods in Enzymology Volume 154*]에서 상기 방법의 다수에서 추가적인 상세한 설명을 발견할 수 있다.

[0231] 예를 들어 신시타제의 라이브리리를 돌연변이시키거나 또는 tRNA를 변경시키는, 예를 들어 본 발명의 돌연변이 유발에서 사용을 위한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 문헌[Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981)]에 의해 기재되는 고체상 포스포로아미다이트 트라이에스터 방법에 따라, 예를 들어 문헌[Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168 (1984)]에 기재되는 자동화 신시사이저를 사용하여 화학적으로 합성된다.

[0232] 본 발명은 또한 직교 tRNA/RS 쌍을 통해 비천연 아미노산의 생체내 포함을 위한 진핵 숙주 세포, 비-진핵 숙주 세포 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 본 발명의 벡터를 포함하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 구성체에 의해 유전적으로 유전자 조작된다(이에 제한되는 것은 아니지만, 형질전환, 형질변환 또는 트랜스펙션). 예를 들어 직교 tRNA 직교 tRNA 신시타제 및 유도체화되는 단백질에 대한 암호화 영역은 원하는 숙주 세포에서 작용성인 유전자 발현 제어 요소에 작동가능하게 연결된다. 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지, 박테리아, 바이러스, 네이키드 폴리뉴클레오타이드 또는 컨쥬게이트된 폴리뉴클레오타이드의 형태일 수 있다. 벡터는 전기영동(Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985)), 바이러스 벡터에 의한 감염, 작은 비드의 매트릭스 또는 입자 내 또는 표면 상에서 핵산과 함께 작은 입자에 의한 고속 탄도 침투(Klein et al., *Nature* 327, 70-73 (1987)) 등을 포함하는 표준 방법에 의해 세포 및/또는 미생물 유기체 내에 포함된다. 시험관내 세포 내에 핵산을 전달하는 적합한 기법은 리포솜의 사용, 미세주입, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산칼슘 침전법 등을 포함한다. 생체내 유전자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 바이러스(전형적으로 레트로바이러스)로 트랜스펙션 및 바이러스 코팅 단백질-리포솜 매개된 트랜스펙션을 포함한다[Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11:205-210 (1993)]. 일부 상황에서, 표적 세포, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체 등에 대한 리간드 등을 표적화하는 작용제와 함께 핵산 공급물을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 리포솜이 사용되는 경우, 엔도사이토시스와 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질은 표적화를 위해 및/또는, 예를 들어 순환에서 인터널리제이션(internalization)을 겪는 단백질, 세포내 국소화를 표적화하고, 세포 내 반감기를 향상시키는 단백질에 대한 특정 세포 유형, 항체에 반응하는 캡시드 단백질 또는 이것의 단편의 흡수를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다.

[0233] 유전자 조작된 숙주 세포는, 예를 들어 스크리닝 단계, 프로모터 활성화 또는 형질전환체의 선택과 같은 이러한 활성화에 대해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 이들 세포는 선택적으로 유전자 이식 유기체 내로 배양될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 분리 및 배양을 위한 것(예를 들어, 이후의 핵산 분리)을 포함하는 다른 유용한 기준은 문헌[Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York] 및 이것이 인용된 참고문헌;[Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL]을 포함한다.

[0234] 세포 내에 표적 핵산을 도입하는 몇몇 잘-알려진 방법은, 본 명세서에서 사용될 수 있는 이용가능한 어떤 것이다. 이들은 DNA를 함유하는 박테리아 원형질체와 수용 세포의 융합, 전기영동, 유전자총, 바이러스 벡터에 의한 감염(이하에 추가로 논의) 등을 포함한다. 박테리아 세포는 본 발명의 DNA 구성체를 함유하는 플라스미드의 수를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 박테리아는 대수기로 성장되며, 박테리아 내 플라스미드는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 분리될 수 있다(예를 들어 Sambrook를 참조). 추가로, 키트는 박테리아로부터 플라스미드의 정제를 위해 상업적으로 입수가능하다(예를 들어, EasyPrep(상표명), FlexiPrep(상표명), 둘 다 Pharmacia

Biotech제; Stratagene제의 StrataClean(상표명); 및 Qiagen제의 QIAprep(상표명)를 참조). 분리되고 정제된 플라스미드는 그 다음에 다른 추가로 조작되어 다른 플라스미드를 생성하고, 세포를 트랜스펙션시키는데 사용되거나 또는 관련된 벡터 내에 포함되어 유기체를 감염시킨다. 전형적인 벡터는 전사 및 번역 종결자, 전사 및 번역 개시 서열 및 특정 표적 핵산의 발현 조절에 유용한 프로모터를 함유한다. 벡터는 선택적으로 적어도 하나의 독립적 종결자 서열을 함유하는 유전적 발현 카세트, 진핵 또는 원핵생물 또는 둘 다에서 카세트를 복제시키는 서열(이에 제한되는 것은 아니지만, 셔틀벡터) 및 원핵과 진핵 시스템 둘 다에서 선택 마커를 선택적으로 포함한다. 벡터는 원핵생물, 진핵생물 또는 둘 다에서 복제 및 통합에 적합하다. 문헌[Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., et al., *Protein Expr. Purif.* 6(1): 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger(모두 상기 참조)]. 클로닝에 유용한 박테리아 및 박테리오파지의 카탈로그는, 예를 들어 ATCC에 의해, 예를 들어 ATCC에 의해 공개된 문헌[The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds)]에 의해 제공된다. 분자 생물학의 시퀀싱, 클로닝 및 다른 양태 및 근본적인 이론적 사항을 위한 추가적인 기본 과정은 또한 문헌[Watson et al. (1992) *Recombinant DNA Second Edition* Scientific American Books, NY]에서 발견된다. 추가로, 본질적으로 임의의 핵산(및 표준이든 비-표준이든 사실상 임의의 표지된 핵산)은 다양한 상업적 공급원, 예컨대 Midland Certified Reagent Company(텍사스주 미들랜드 소재, 월드 와이드 웹 상의 mcr.com에서 입수가능), The Great American Gene Company(캘리포니아주 라모나에 소재, 월드 와이드 웹 상의 genco.com에서 입수가능), ExpressGen Inc.(일리노이주 시카고 소재, 월드 와이드 웹 상의 expressgen.com에서 입수가능), Operon Technologies Inc.(캘리포니아주 알라메다에 소재) 및 다수의 다른 것 중 어떤 것으로부터의 관습 또는 표준 규칙일 수 있다.

[0235] 선택자 코돈

[0236] 본 발명의 선택자 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 프레임워크를 확장한다. 예를 들어, 선택자 코돈은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 독특한 3개의 염기 코돈, 난센스 코돈, 예컨대, 이에 제한되는 것은 아니지만, 앰버코돈(UAG), 오키코돈 또는 오팔코돈(UGA)을 포함하는 정지코돈, 비천연 코돈, 4개 이상의 염기 코돈, 회귀 코돈 등을 포함한다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신 폴리펩타이드의 적어도 일부를 암호화하는 단일 폴리뉴클레오타이드 내 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상을 포함하는 원하는 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드 내에 도입될 수 있는 선택자 코돈의 수가 넓은 범위에 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 또한 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신 폴리펩타이드의 적어도 일부를 암호화하는 A 쇠 및 B 쇠 폴리뉴클레오타이드 서열에서 발견된 전체 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상을 포함하는 원하는 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드 내에 도입될 수 있는 선택자 코돈의 수가 넓은 범위에 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0237] 한 실시형태에서, 해당 방법은 생체 내 하나 이상의 비천연 아미노산의 포함을 위한 정지코돈인 선택자 코돈의 사용을 수반한다. 예를 들어, O-tRNA는, 이에 제한되는 것은 아니지만 UAG를 포함하는 정지코돈을 인식하도록 생성되며, 원하는 비천연 아미노산과 함께 O-RS에 의해 아미노아실화된다. 이 O-tRNA는 자연적으로 발생하는 숙주의 아미노아실-tRNA 신시타제에 의해 인식되지 않는다. 통상적인 부위-지정 돌연변이유발은 관심의 폴리펩타이드의 관심의 부위에서, 이에 제한되는 것은 아니지만, TAG를 포함하는 정지코돈을 도입하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sayers, J.R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 16:791-802]을 참조한다. 관심의 폴리펩타이드를 암호화하는 O-RS, O-tRNA 및 핵산이 생체내에서 조합될 때, 비천연 아미노산은 UAG 코돈에 반응하여 포함되어서 특정 위치에서 비천연 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0238] 생체내 비천연 아미노산의 포함은 진핵 숙주 세포의 상당한 동요 없이 행해질 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효율이, 이에 제한되는 것은 아니지만, 앰버 억제자 tRNA 및 진핵 방출 인자(이에 제한되는 것은 아니지만 eRF를 포함)(이는 정지 코돈에 결합되며, 리보솜으로부터 성장 펩타이드의 방출을 개시함)을 포함하는 O-tRNA 사이의 경쟁에 의존하기 때문에, 억제 효율은, 이에 제한되는 것은 아니지만 O-tRNA의 발현 수준 및/또는 억제자 tRNA를 증가시키는 것을 포함함으로써 조절될 수 있다.

[0239] 비천연 아미노산은 회귀 코돈으로 암호화될 수 있다. 예를 들어 시험관내 단백질 합성 반응에서 아르기닌 농도가 감소할 때, 회귀 아르기닌 코돈인 AGG는 알라닌으로 아실화된 합성 tRNA에 의한 삽입에 효율적이 되는 것으로 증명되었다. 예를 들어, 문헌[Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993)]을 참조한다. 이 경우에, 합성 tRNA는 에스케리키아 콜라이 내 부수적 종으로 존재 하는 자연적으로 발생하는 tRNAArg와 경쟁한다. 일부 유기체는 모든 삼중 코돈을 사용하지 않는다. 마이크로코커스 루테우스 내 할당되지 않은 코돈 AGA는 시험관내 전사/번역 추출물 내 아미노산의 삽입을 위해 이용되었다. 예를 들어, 문헌[Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*,

25:4685 (1997)]을 참조한다. 본 발명의 성분은 생체내 이들 희귀 코돈을 사용하여 만들어질 수 있다.

- [0240] 선택자 코돈은 또한, 이에 제한되는 것은 아니지만, 4개 이상의 염기 코돈, 예컨대 4, 5, 6개 이상의 염기 코돈을 포함하는 연장된 코돈을 포함한다. 4개의 염기 코돈의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 등을 포함한다. 5개 염기 코돈의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 포함한다. 본 발명의 특징은 프레임쉬프트(frameshift) 억제에 기반한 연장된 코돈을 사용하는 것을 포함한다. 4개 이상의 코돈은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나 또는 다수의 비천연 아미노산을 동일 단백질 내로 삽입시킬 수 있다. 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, 특별한 프레임쉬프트 억제자 tRNA를 포함하는 돌연변이된 0-tRNA의 존재에서, 안티코돈 루프와 함께, 예를 들어 적어도 8-10개의 nt 안티코돈 루프와 함께, 4개 이상의 염기 코돈이 단일 아미노산으로서 관독된다. 다른 실시형태에서, 안티코돈 루프는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 4-염기 코돈, 적어도 5-염기 코돈 또는 적어도 6-염기 코돈 또는 초과를 포함하여 해독할 수 있다. 256개의 가능한 4-염기 코돈이 있기 때문에, 4 이상의 염기 코돈을 사용하여 다양한 비천연 아미노산이 암호화될 수 있다. 문헌[Anderson et al., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769]을 참조한다.
- [0241] 예를 들어, 4-염기 코돈은 시험관내 생합성 방법을 사용하여 단백질 내로 비천연 아미노산을 포함시키기 위해 사용되었다. 예를 들어 문헌[Ma et al., (1993) Biochemistry, 32:7939; 및 Holsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34]을 참조한다. 2-나프틸알라닌 및 나프틸알라닌 및 리신의 NBD 유도체를 2개의 화학적으로 아실화된 프레임쉬프트 억제자 tRNA와 함께 시험관내 스트랩타빈 내로 동시에 포함시키기 위해 CGGG 및 AGGU가 사용되었다. 예를 들어 문헌[Holsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194]을 참조한다. 생체내 연구에서, Moore 등은 UAGN 코돈(N은 U, A, G 또는 C일 수 있음)을 억제하기 위한 NCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu} 유도체의 능력을 시험하였고, 4중 UAGA가 0 또는 -1 프레임에서 거의 해독되지 않는 13 내지 26%의 효율로 UCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu}에 의해 해독될 수 있다는 것을 발견하였다. 문헌[Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195]을 참조한다. 한 실시형태에서, 희귀 코돈 또는 넌센스 코돈에 기반한 연장된 코돈이 본 발명에 사용될 수 있는데, 이는 다른 원치않는 부위에서 미스센스 번역초과 및 프레임쉬프트 억제를 감소시킬 수 있다.
- [0242] 주어진 시스템에 대해, 선택자 코돈은 또한 천연의 3개 염기 코돈 중 하나를 포함하며, 해당 내인성 시스템은 천연 염기 코돈을 사용하지 않는다(또는 거의 사용하지 않는다). 예를 들어, 이는 천연 3개 염기 코돈을 인식하는 tRNA를 결여하는 시스템 및/또는 3개의 염기 코돈이 희귀 코돈인 시스템을 포함한다.
- [0243] 선택자 코돈은 선택적으로 비천연 염기쌍을 포함한다. 이들 비천연 염기쌍은 존재 하는 유전자 알파벳을 추가로 연장시킨다. 하나의 추가 염기쌍은 64개 내지 125개의 3중 코돈의 수를 증가시킨다. 제3 염기쌍의 특성은 안정하고 선택적인 염기쌍, 폴리머라제에 의해 높은 정확도로 DNA 내에 효율적인 효소적 포함 및 초기 비천연 염기쌍의 합성 후 효율적인 연속된 프라이머 연장을 포함한다. 방법 및 조성물에 적합할 수 있는 비천연 염기쌍의 기재는, 예를 들어 문헌[Hirao, et al., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182]을 포함한다. 또한 문헌[Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630]을 참조한다. 다른 적절한 간행물은 이하에 열거된다.
- [0244] 생체내 용법을 위해, 비천연 뉴클레오사이드는 막 투과성이며, 대응하는 트라이포스페이트를 형성하도록 인산화된다. 추가로, 증가된 유전자 정도는 안정하며, 세포 효소에 의해 파괴되지 않는다. Benner 및 다른 이들에 의한 이전의 노력은 고전적인 왓슨-크릭(Watson-Crick) 쌍의 수소결합 패턴과 상이한 수소 결합 패턴을 취하였고, 이것의 가장 주목할 만한 예는 아이소-C:아이소-G 쌍이다. 예를 들어, 문헌[Switzer et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322]; 및 [Piccirilli et al., (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602]을 참조한다. 이들 염기는 일반적으로 일정한 정도로 천연 염기와 잘못 짝지어지며, 효소적으로 복제될 수 있다. Kool 및 공동연구자는 염기들 간의 수소성 패킹 상호작용이 염기쌍의 형성을 구동하는 수소 결합을 대체할 수 있다는 것을 증명하였다. 문헌[Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602]; 및 [Guckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825]을 참조한다. 상기 필요조건을 모두 만족시키는 비천연 염기쌍을 개발하기 위한 노력에서, Schultz, Romesberg 및 공동연구자는 일련의 비천연 소수성 염기를 조직적으로 합성하였고 연구하였다. PICS:PICS 자기-쌍은 천연 염기쌍보다는 더 안정한 것으로 발견되며, 에스케리키아 콜라이 DNA 폴리머라제 I(KF)의 Klenow 단편 내에 효율적으로 포함될 수 있다. 예를 들어, 문헌[McMinn et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6]; 및 [Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:327

4]을 참조한다. 3MN:3MN 자기-쌍은 생물학적 기능을 위해 충분한 효율성 및 선택성으로 KF에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803]을 참조한다. 그러나, 두 염기 모두 추가 복제를 위한 쇠 종결자로서 작용한다. 돌연변이체 DNA 폴리머라제는 PICS 자기 쌍을 복제하기 위해 사용될 수 있는 것으로 최근에 진전되었다. 추가로 7AI 자기쌍이 복제될 수 있다. 예를 들어 문헌[Tae et al., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439]을 참조한다. 신규 금속염기쌍인 Dipic:Py는 Cu(II) 결합시 안정한 쌍을 형성하는 것이 또한 발견되었다. 문헌[Meggers et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714]을 참조한다. 연장된 코돈 및 비천연 코돈이 천연 코돈에 본질적으로 직교로 있기 때문에, 본 발명의 방법은 그것들에 대해 직교인 tRNA를 만들어내는 특성을 이용할 수 있다.

[0245] 번역 우회 시스템이 또한 원하는 폴리펩타이드 내 비천연 아미노산을 포함시키는데 사용될 수 있다. 번역 우회 시스템에서, 거대 서열은 유전자 내로 포함되지만, 단백질로 번역되지 않는다. 서열은 서열을 건너뛰는 리보솜을 유발하는 지시로서 작용하고, 삽입의 하류 번역을 재개하는 구조를 함유한다.

[0246] 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법 및/또는 조성물에서 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드(또는 이것의 일부)는 핵산에 의해 암호화된다. 전형적으로, 핵산은 적어도 1개의 선택자 코돈, 적어도 2개의 선택자 코돈, 적어도 3개의 선택자 코돈, 적어도 4개의 선택자 코돈, 적어도 5개의 선택자 코돈, 적어도 6개의 선택자 코돈, 적어도 7개의 선택자 코돈, 적어도 8개의 선택자 코돈, 적어도 9개의 선택자 코돈, 10개 이상의 선택자 코돈을 포함한다.

[0247] 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 돌연변이유발될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비천연 아미노산의 포함을 위해, 예를 들어 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하는 것으로 본 명세서에 기재된다. 예를 들어 관심의 단백질에 대한 핵산은 하나 이상의 비천연 아미노산의 포함을 제공하는, 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하도록 돌연변이유발된다. 본 발명은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 돌연변이체, 예를 들어 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 임의의 단백질 형태를 포함하는 임의의 이러한 변이체를 포함한다. 유사하게, 본 발명은 또한 대응하는 핵산, 즉, 하나 이상의 비천연 아미노산을 암호화하는 하나 이상의 선택자 코돈을 갖는 임의의 핵산을 포함한다.

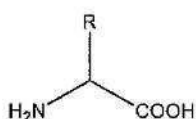
[0248] 릴랙신 폴리펩타이드와 같은 관심의 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 폴리펩타이드의 임의의 원하는 위치에서 시스테인을 도입하도록 용이하게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응 분자, 수용성 폴리머, 단백질 또는 매우 다양한 다른 분자를 관심의 단백질 상에 도입하는데 널리 사용된다. 폴리펩타이드의 원하는 위치 내로 시스테인의 포함을 위한 적합한 방법 및 표준 돌연변이유발 기법은 당업자에게 공지되어 있고, 예컨대 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제6,608,183호에 기재되어 있다.

[0249] 비-자연적으로 암호화된 아미노산

[0250] 매우 다양한 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 본 발명에서 사용에 적합하다. 임의의 수의 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 릴랙신 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다. 일반적으로, 도입된 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 20가지의 보통의 유전적으로-암호화된 아미노산(즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글라이신, 히스티딘, 아이소 류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린)에 대해 실질적으로 화학적으로 비활성이다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 20가지의 공통 아미노산(이에 제한되는 것은 아니지만, 아지도, 케톤, 알데하이드 및 아미노옥시 기)에서 발견되지 않는 작용기와 효율적이고 선택적으로 반응하는 측쇄 작용기를 포함하여 안정한 컨주게이트를 형성한다. 예를 들어, 아지도 작용기를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴랙신 폴리펩타이드는 폴리머(이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리(에틸렌 글라이콜)), 또는 대안적으로 알카인 모이어티를 함유하는 제2 폴리펩타이드와 반응되어 아자이드 및 알카인 작용기의 선택적 반응을 위한 결과의 안정한 컨주게이트를 형성하여 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 생성물을 형성한다.

[0251] 알파-아미노산의 화학식은 다음과 같이 예시된다(화학식 I):

[0252] [화학식 I]



[0253]

[0254] 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 전형적으로 상기 열거한 화학식을 갖는 임의의 구조이되, R기는 20가지의

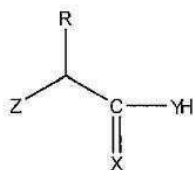
천연 아미노산에서 사용된 것 이외의 임의의 치환체이고, 본 발명에서 사용에 적합할 수 있다. 본 발명의 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 전형적으로 측쇄의 구조에서만 천연 아미노산과 상이하기 때문에, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 그것들이 자연적으로 발생하는 폴리펩타이드에서 형성된 것과 동일한 방식으로 천연 또는 비자연적으로 암호화된 것을 포함하는 다른 아미노산과 아마이드 결합을 형성한다.

[0255] 그러나, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 천연 아미노산과 구별되는 측쇄 기를 가진다. 예를 들어, R은 선택적으로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 하이드록실-, 하이드라진, 시아노-, 할로-, 하이드라자이드, 알케닐, 알킬닐, 에터, 티올, 셀레노-, 설포닐-, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헥테로사이클릭, 에논, 인라인, 알데하이드, 에스터, 티오산, 하이드록실아민, 아미노기 등 또는 이것의 임의의 조합을 포함한다. 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 관심의 다른 비-자연적으로 발생하는 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 광활성화 가능한 가교제, 스핀-표지된 아미노산, 형광 아미노산, 금속 결합 아미노산, 금속-함유 아미노산, 방사성 아미노산, 신규 작용기를 갖는 아미노산, 다른 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호작용하는 아미노산, 포토케이지된 및/또는 광이성질체화 아미노산, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 포함하는 아미노산, 당 치환된 세린과 같은 글라이코실화된 아미노산, 다른 탄수화물 변형된 아미노산, 케토-함유 아미노산, 폴리에틸렌 글라이콜 또는 폴리에터를 포함하는 아미노산, 중원자 치환된 아미노산, 화학적으로 절단 가능한 및/또는 광절단가능한 아미노산, 천연 아미노산과 비교하여 연장된 측쇄를 갖는 아미노산, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에터 또는 제한되는 것은 아니지만 약 5 초과 또는 약 10 초과를 포함하는 장쇄 탄화수소, 탄소-연결 당-함유 아미노산, 산화환원-활성 아미노산, 아미노산을 함유하는 아미노 티오산, 및 하나 이상의 독성 모이어티를 포함하는 아미노산을 포함한다.

[0256] 본 발명에서 사용에 적합할 수 있고 수용성 폴리머와 반응에 유용한 대표적인 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 카보닐, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라자이드, 세미카바자이드, 아자이드 및 알카인 반응기를 갖는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 당류 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N'-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린을 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 또한 아미노산과 당류 사이의 자연적으로 발생하는 N- 또는 O- 결합이, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알켄, 옥심, 티오에터, 아마이드 등을 포함하는, 천연에서 보통 발견되지 않는 공유 결합으로 대체되지 않는 경우의 예를 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 또한 자연적으로-발생하는 단백질에서 보통 발견되지 않는 당류, 예컨대 2-데옥시-글루코스, 2-데옥시갈락토스 등을 포함한다.

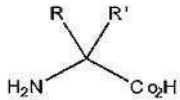
[0257] 본 명세서에 제공된 다수의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 예를 들어 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재), Novabiochem(독일 다름슈타트에 소재한 EMD Biosciences의 지사) 또는 Peptech(미국 매사추세츠주 벨링턴에 소재)로부터 상업적으로 입수가능하다. 상업적으로 입수가능하지 않은 것은 본 명세서에서 제공되는 것과 같이 또는 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 선택적으로 합성된다. 유기 합성 기법에 대해, 예를 들어 문헌[Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조한다. 또한 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호를 참조한다. 신규 측쇄를 함유하는 비천연 아미노산에 추가로, 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 비천연 아미노산은 또한 하기 화학식 II 및 III의 구조로 표시되는 것을 포함하는 변형된 백본 구조를 선택적으로 포함한다:

[0258] [화학식 II]



[0259]

[0260] [화학식 III]



[0261]

[0262] 상기 식에서 Z는 OH, NH₂, SH, NH-R' 또는 S-R'을 전형적으로 포함하며; 동일 또는 상이할 수 있는 X 및 Y는 전형적으로 S 또는 O를 포함하고, 동일 또는 상이할 수 있는 R 및 R'는 화학식 I을 갖는 비천연 아미노산에 대해 상기 기재한 R기에 대한 구성요소의 동일 목록뿐만 아니라 수소로부터 전형적으로 선택된다. 예를 들어, 본 발명의 비천연 아미노산은 화학식 II 및 III에 의해 도시되는 것과 같은 아미노 또는 카복실 기에서 선택적으로 치환을 포함한다. 이들 유형의 비천연 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 보통의 20가지 천연 아미노산에 대응하는 측쇄 또는 비천연 측쇄와 함께, 이에 제한되는 것은 아니지만, α-하이드록시산, α-티오산, α-아미노티오키아복실레이트를 포함한다. 추가로, α-탄소에서 치환은 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, L, D 또는 α-α-2치환된 아미노산, 예컨대 D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-티로신, 아미노뷰티르산 등을 포함한다. 다른 구조적 대안물은 사이클릭 아미노산, 예컨대 프롤린 유사체뿐만 아니라 3, 4, 6, 7, 8 및 9 원 고리 프롤린 유사체를 포함하고, β 및 γ 아미노산, 예컨대 치환된 β-알라닌 및 γ-아미노 뷰티르산을 포함한다.

[0263]

다른 비천연 아미노산은 천연 아미노산, 예컨대 티로신, 글루타민, 페닐알라닌 등에 기반하며, 본 발명에서 사용에 적합하다. 티로신 유사체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 파라-치환된 티로신, 오쏘-치환된 티로신 및 메타 치환된 티로신을 포함하며, 치환된 티로신은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 케토 기(이에 제한되는 것은 아니지만, 아세틸 기), 벤조일 기, 아미노기, 하이드라진, 하이드록시아민, 티올 기, 카복시 기, 아이소프로필 기, 메틸 기, C6-C20 직쇄 또는 분지 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸 기, 폴리에터 기, 나이트로 기, 알킬닐 기 등을 포함한다. 추가로, 다중 치환된 아릴 고리가 또한 생각된다. 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 글루타민 유사체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, α-하이드록시 유도체, g-치환된 유도체, 사이클릭 유도체 및 아마이드 치환된 글루타민 유도체를 포함한다. 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 페닐알라닌 유사체의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 파라-치환된 페닐알라닌, 오쏘-치환된 페닐알라닌 및 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하며, 치환체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드록시 기, 메톡시 기, 메틸 기, 알릴 기, 알데하이드, 아지도, 요오도, 브로모, A 케토 기(이에 제한되는 것은 아니지만, 아세틸 기), 벤조일, 알킬닐 기 등을 포함한다. 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 비천연 아미노산의 구체적 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트라이-O-아세틸-GlcNAc b-세린, L-Dopa, 플루오르화된 페닐알라닌, 아이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-요오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 아이소프로필-L-페닐알라닌 및 p-프로파길옥시-페닐알라닌 등을 포함한다. 본 발명에서 사용에 적합할 수 있는 다양한 비천연 아미노산의 구조의 예는, 예를 들어 WO 2002/085923(발명의 명칭, "In vivo incorporation of unnatural amino acids")에 제공된다. 또한 추가적인 메티오닌 유사체에 대해 본 명세서에 참조로서 포함된 문헌[Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24]을 참조한다. 본 명세서에 참조로서 포함된 국제특허출원 PCT/US06/47822(발명의 명칭: "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids 및 Polypeptides")는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-아미노-페닐알라닌 및 환원성 아미노화를 포함하는 방향족 아민 모이어티의 환원성 알킬화를 기재한다.

[0264]

한 실시형태에서, 비천연 아미노산(예컨대 p-(프로파길옥시)-페닐알라닌)을 포함하는 펩타이드의 조성물이 제공된다. p-(프로파길옥시)-페닐알라 및, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 및/또는 세포를 포함하는 다양한 조성물이 또한 제공된다. 한 양태에서, p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 비천연 아미노산을 포함하는 조성물은 직교 tRNA를 추가로 포함한다. 비천연 아미노산은 직교 tRNA에 결합되며(이에 제한되는 것은 아니지만, 공유적으로), 이에 제한되는 것은 아니지만, 아미노-아실 결합을 통해 직교 tRNA에 공유적으로 결합되고, 직교 tRNA의 말단 리보스 당의 3'OH 또는 2'OH에 공유적으로 결합될 수 있다.

[0265]

단백질 내로 포함될 수 있는 비천연 아미노산을 통한 화학적 모이어티는 단백질의 다양한 이점 및 조작을 제공한다. 예를 들어, 케토 작용기의 독특한 반응성은 시험관내 및 생체내 임의의 다수의 하이드라진- 또는 하이드록실 아민-함유 시약과 함께 단백질을 선택적으로 변형시킨다. 중원자 비천연 아미노산은, 예를 들어 X-레이 구

조 데이터를 위상조정하는데 유용할 수 있다. 비천연 아미노산을 사용하는 중원자의 부위-특이적 도입은 또한 중원자에 대한 위치를 선택하는 것으로 선택성 및 가요성을 제공한다. 광반응성 비천연 아미노산(이에 제한되는 것은 아니지만, 벤조페논 및 아릴아자이드(이에 제한되는 것은 아니지만, 페닐아자이드) 측쇄를 갖는 아미노산을 포함)은, 예를 들어 단백질의 생체내 및 시험관내 광가교에 효율적이다. 광반응성 비천연 아미노산의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-아지도-페닐알라닌 및 p-벤조일-페닐알라닌을 포함한다. 그 다음에 광반응성 비천연 아미노산을 갖는 단백질은 광반응성 기-제공 시간적 제어의 자극에 의해 가교될 수 있다. 한 예에서, 비천연 아미노산의 메틸기는 국소 구조 및 이에 제한되는 것은 아니지만, 핵 자기 공명 및 진동 분광법의 사용에 의하는 역학의 프로브로서 동위원소 표시된, 이에 제한되는 것은 아니지만, 메틸기로 치환될 수 있다. 알킬닐 또는 아지도 작용기는, 예를 들어 [3+2] 사이클로첨가 반응을 통해 분자에 의한 단백질의 선택적 변형을 허용한다.

[0266] 아미노 말단에서 폴리펩타이드 내에 포함된 비-천연 아미노산은 20가지의 천연 아미노산에서 사용된 것 이외의 임의의 치환체인 R기 및 α-아미노산에 보통 존재 하는 NH₂ 기와 상이한 제2 반응기로 구성될 수 있다(화학식 I 참조). 유사한 비-천연 아미노산은 α-아미노산에 보통 존재 하는 COOH 기와 상이한 제2 반응기와 함께 카복실 말단에 포함될 수 있다(화학식 I 참조).

[0267] 본 발명의 비천연 아미노산은 20가지의 천연 아미노산에서 입수가능하지 않은 추가적이나 특징을 제공하도록 선택되거나 또는 설계될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산은 그것들이 포함된 단백질의 생물학적 특성을 변형 시키도록 선택적으로 설계되거나 또는 선택될 수 있다. 예를 들어, 다음의 특성은 단백질 내에 비천연 아미노산의 포함에 의해 선택적으로 변형될 수 있다: 독성, 생체 내 분포, 용해도, 안정성, 예를 들어, 열, 가수분해, 산화, 효소 분해에 대한 저항성 등, 정제 시설 및 과정, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매적 활성, 산화환원전위, 반감기, 다른 분자와의 반응 능력, 예를 들어 공유적으로 또는 비공유적으로 등.

[0268] 비-천연 아미노산의 구조 및 합성: 카보닐, 카보닐-유사, 가리움된 카보닐, 보호된 카보닐 기 및 하이드록실아민 기.

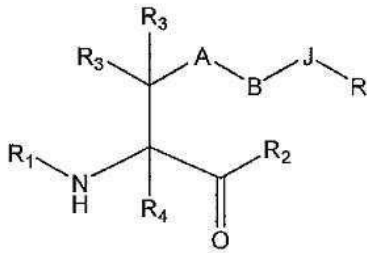
[0269] 일부 실시형태에서 본 발명은 수용성 폴리머, 예를 들어 PEG에 옥심 결합에 의해 연결된 펩타이드를 제공한다.

[0270] 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 다수의 유형은 옥심 결합의 형성에 적합하다. 이들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 카보닐, 다이카보닐 또는 하이드록실 아민 기를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다. 이러한 아미노산은, 미국특허 제2006/0194256호, 제2006/0217532호 및 제2006/0217289호 및 WO 2006/069246호(발명의 명칭: "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides")에 기재되어 있으며, 이들은 본 명세서에 그것의 전문이 참조로 포함된다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 또한 미국특허 제7,083,970호 및 미국특허 제7,045,337호에 기재되며, 이들은 본 명세서에 그것의 전문이 참조로 포함된다.

[0271] 본 발명의 일부 실시형태는 하나 이상의 위치에서 파라-아세틸페닐알라닌 아미노산으로 치환된 펩타이드를 이용한다. p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 참조로서 포함된 문헌 [Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카보닐- 또는 다이카보닐-함유 아미노산은 당업자에 의해 유사하게 제조될 수 있다. 추가로, 본 명세서에 포함된 비-천연 아미노산의 비제한적인 대표적 합성은 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된 미국특허 제7,083,970호의 도 4, 24 내지 34 및 36 내지 39에 제시된다.

[0272] 친전자성 반응기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 첨가 반응을 통해 분자를 연결시키는 다양한 반응을 허용한다. 이러한 친전자성 반응기는 카보닐 기(케토 기 및 다이카보닐 기를 포함), 카보닐-유사 기(카보닐 기(케토 기 및 다이카보닐 기를 포함)와 유사한 반응성을 가지며, 카보닐 기와 구조적으로 유사함), 가리움된 카보닐 기(카보닐 기(케토 기 및 다이카보닐 기를 포함)로 용이하게 전환될 수 있음), 또는 보호된 카보닐 기(탈보호 시 카보닐 기(케토 기 및 다이카보닐 기를 포함)와 유사한 반응성을 가짐)를 포함한다. 이러한 아미노산은 하기 화학식 IV의 구조를 갖는 아미노산을 포함한다:

[0273] [화학식 IV]



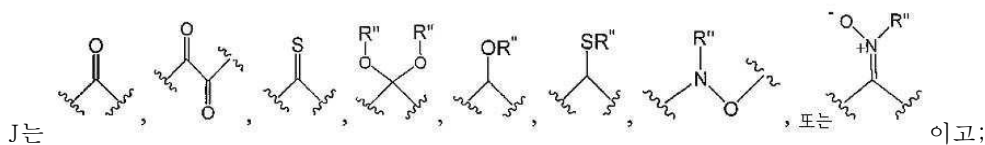
[0274]

[0275] 상기 식에서:

[0276] A는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알케닐렌, 저급 헤테로 알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로 사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0277] B는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R'), -N(R')C(O)N(R'), -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

[0278]



[0279] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0280] 각각의 R"은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬 또는 보호기이거나, 또는 하나 이상의 R"기가 존재할 때, 2개의 R"는 선택적으로 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0281] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0282] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

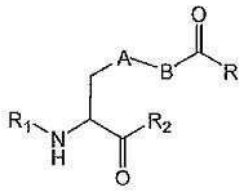
[0283] 각각의 R₃ 및 R₄는 독립적으로 H, 할로젠, 저급 알킬 또는 치환된 저급 알킬이며, 또는 R₃ 및 R₄ 또는 2개의 R₃기는 선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하거나; 또는 -A-B-J-R 기는 함께 적어도 하나의 카보닐 기, 예를 들어 보호된 다이카보닐 기를 포함하는 다이카보닐 기, 보호된 카보닐 기, 또는 가리움된 다이카보닐 기를 포함하는 가리움된 카보닐 기를 포함하는 바이사이클릭 또는 트라이사이클릭 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하며;

[0284] 또는 -J-R 기는 함께 적어도 하나의 카보닐 기, 예를 들어 보호된 다이카보닐 기를 포함하는 다이카보닐 기, 보호된 카보닐 기, 또는 가리움된 다이카보닐 기를 포함하는 가리움된 카보닐 기를 포함하는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0285] 단, A가 페닐렌일 때, 각각의 R₃은 H이고, B가 존재 하며; A가 -(CH₂)₄- 일 때, 각각의 R₃은 H이고, B는 -NHC(O)(CH₂CH₂)-가 아니며; A 및 B가 없을 때, 각각의 R₃은 H이고, R은 메틸이 아니다.

[0286] 추가로, 하기 화학식 V의 구조식이 포함된다:

[0287] [화학식 V]



[0288]

[0289] 상기 식에서:

[0290] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0291] B는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R'), -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-으로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

[0292] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

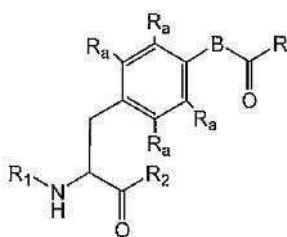
[0293] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0294] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0295] 단, A가 페닐렌 일 때, B가 존재 하고; A가 -(CH₂)₄-일 때, B는 -NHC(O)(CH₂CH₂)-가 아니고; A 및 B가 없을 때, R은 메틸이 아니다.

[0296] 추가로, 하기 화학식 VI의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

[0297] [화학식 VI]



[0298]

[0299] 상기 식에서,

[0300] B는 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R'), -N(R')C(O)N(R'), -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-,

$-N(R')=N-$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2=N=N-$, 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

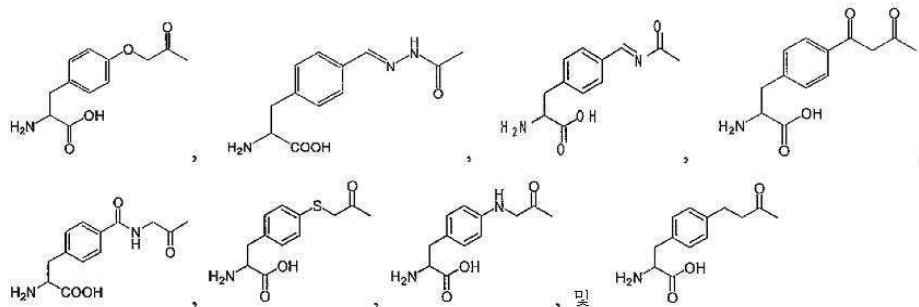
[0301] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

[0302] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0303] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0304] 각각의 R_a 는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, 및 $-S(O)_kR'$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이다.

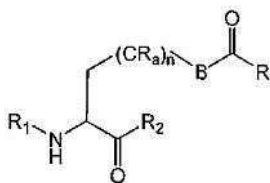
[0305] 추가로, 다음의 아미노산이 포함된다:



[0307] 이러한 화합물 또는 그것의 염은 선택적으로 보호된 아미노 기, 보호된 카복실이다. 추가로, 다음의 비-천연 아미노산 중 어떤 것은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내에 포함될 수 있다.

[0308] 추가로, 하기 화학식 VII의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0309] [화학식 VII]



[0310] 상기 식에서

[0312] B 는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, $-O-$, $-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-S-$, $-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-S(O)_k-$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-C(O)-$, $-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-C(S)-$, $-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-N(R')-$, $-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N=$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N=$, $-C(R')_2=N=N=$ 및 $-C(R')_2-N(R')N(R')$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬;

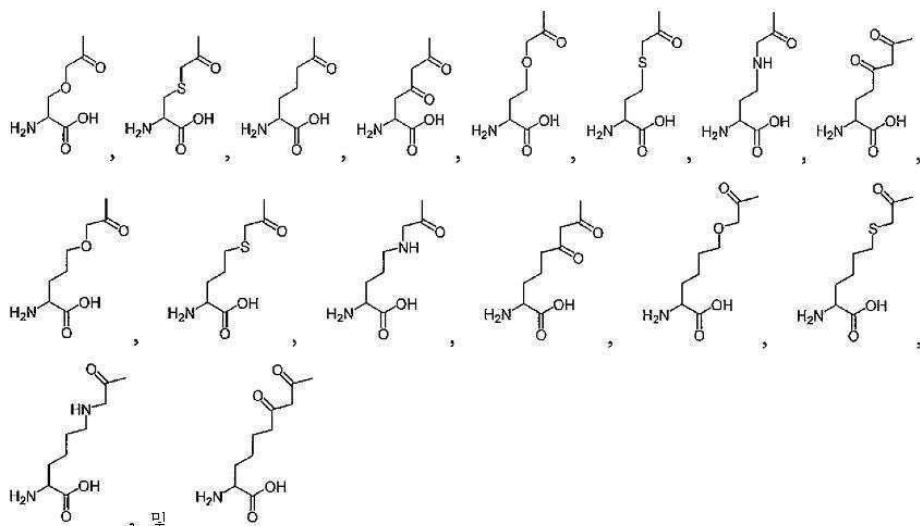
[0313] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0314] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0315] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0316] 각각의 R_4 는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, 및 $-S(O)_kR'$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이고; n 은 0 내지 8이고; 단, A가 $-(CH_2)_4$ -일 때, B는 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 이 아니다.

[0317] 추가로, 다음의 아미노산 또는 이것의 염이 포함된다:

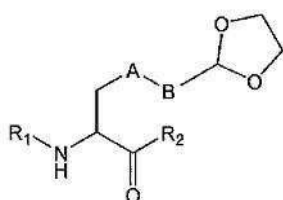


[0318]

[0319] 상기 식에서, 이러한 화합물은 선택적으로 보호된 아미노, 선택적으로 보호된 카복실, 선택적으로 보호된 아미노 및 보호된 카복실이다. 추가로, 이들 비-천연 아미노산 및 임의의 다음 비-천연 아미노산은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다.

[0320] 추가로, 하기 화학식 VIII의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0321] [화학식 VIII]



[0322]

[0323] 상기 식에서, A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

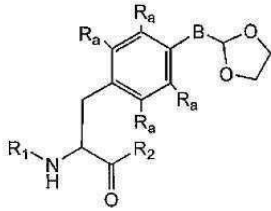
[0324] B는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, $-O-$, $-O-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-S-$, $-S-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-S(O)_k-$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(O)-$, $-C(O)-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(S)-$, $-C(S)-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')-$, $-NR'-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')CO-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

[0325] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0326] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이다.

[0327] 추가로, 하기 화학식 IX의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0328] [화학식 IX]



[0329]

[0330] B는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R'), -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

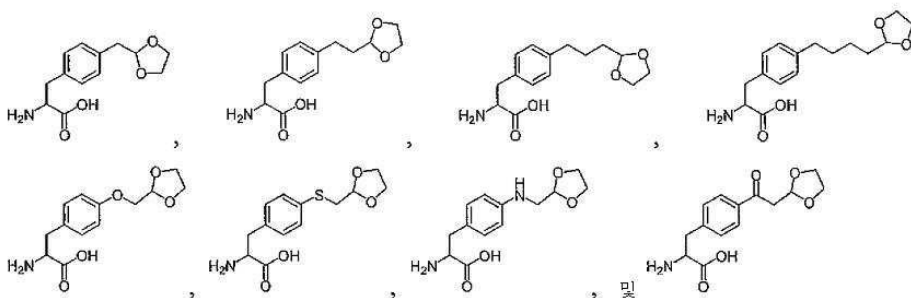
[0331] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

[0332] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0333] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0334] 각각의 R_a는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이다.

[0335] 추가로, 다음의 아미노산 또는 이것의 염이 포함되며:

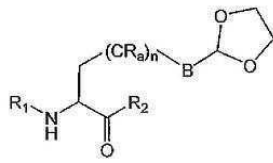


[0336]

[0337] 이러한 화합물은 선택적으로 보호된 아미노, 선택적으로 보호된 카복실, 선택적으로 보호된 아미노 및 보호된 카복실이다. 추가로, 이들 비-천연 아미노산 및 다음의 비-천연 아미노산 중 어떤 것은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다.

[0338] 추가로, 하기 화학식 X의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0339] [화학식 X]



[0340]

[0341] 상기 식에서 B는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R') CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며;

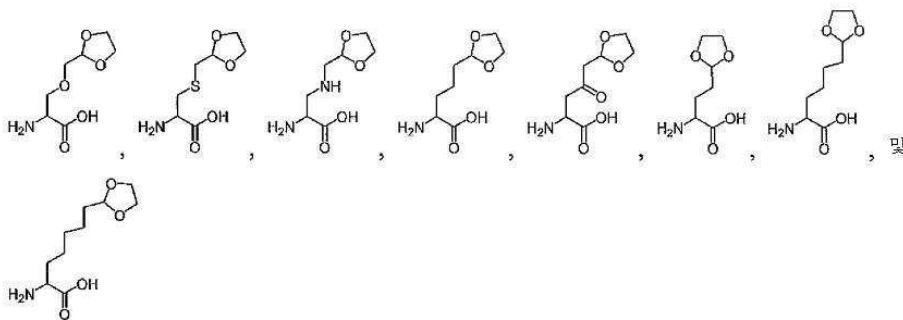
[0342] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

[0343] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0344] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0345] 각각의 Ra는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)kR'(k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)kR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이며; n은 0 내지 8이다.

[0346] 추가로, 다음의 아미노산 또는 이것의 염이 포함된다:



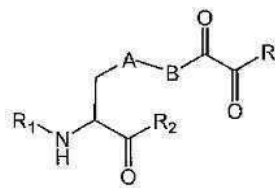
[0347]

[0348] 상기 식에서, 이러한 화합물은 선택적으로 보호된 아미노, 선택적으로 보호된 카복실, 선택적으로 보호된 아미노 및 보호된 카복실이다. 추가로, 이들 비-천연 아미노산 및 다음의 비-천연 아미노산 중 어떤 것은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다.

[0349] 추가로, 모노카보닐 구조에, 본 명세서에 기재된 비-천연 아미노산은 다이카보닐, 다이카보닐 유사, 가리움된 다이카보닐 및 보호된 다이카보닐 기와 같은 기를 포함할 수 있다.

[0350] 예를 들어, 하기 화학식 XI의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0351] [화학식 XI]



[0352]

[0353] 상기 식에서 A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0354]

B는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, C(O)-, C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, C(O)N(R')-, CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, N(R')C(O)O-, S(O)_kN(R'), N(R')C(O)N(R')-, N(R')C(S)N(R')-, N(R')S(O)_kN(R'), N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, C(R')₂-N=N- 및 C(R')₂N(R')N(R')-로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이고;

[0355]

R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0356]

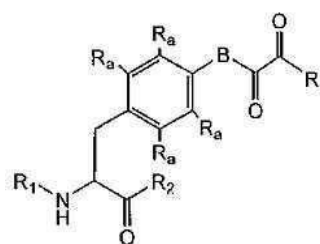
R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0357]

R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드이고,

[0358] 추가로, 하기 화학식 XII의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0359] [화학식 XII]



[0360]

[0361] B는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, S(O)_kN(R'), -N(R')C(O)N(R'), -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R'), -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이고;

[0362]

R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

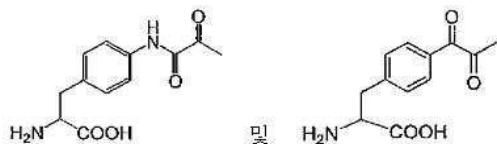
[0363]

R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0364] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0365] 각각의 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이다.

[0366] 추가로, 다음의 아미노산 또는 이것의 염이 포함된다:

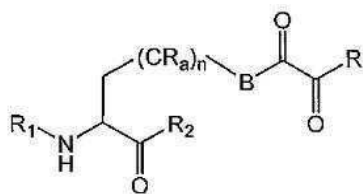


[0367]

[0368] 상기 식에서, 이러한 화합물은 선택적으로 보호된 아미노, 선택적으로 보호된 카복실, 선택적으로 보호된 아미노 및 보호된 카복실이다. 추가로, 이들 비-천연 아미노산 및 다음의 비-천연 아미노산 중 어떤 것은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다.

[0369] 추가로, 하기 화학식 XIII의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0370] [화학식 XIII]



[0371]

[0372] B는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, $-O-$, $-O-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-S-$, $-S-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-S(O)_k-(k\text{는 } 1, 2 \text{ 또는 } 3\text{임})$, $-S(O)_k(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(O)-$, $-C(O)-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(S)-$, $-C(S)-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')-$, $-NR'-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')CO-(\text{알킬렌 또는 치환된 알킬렌})-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')$, $-N(R')C(S)N(R')$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N-N=$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이고;

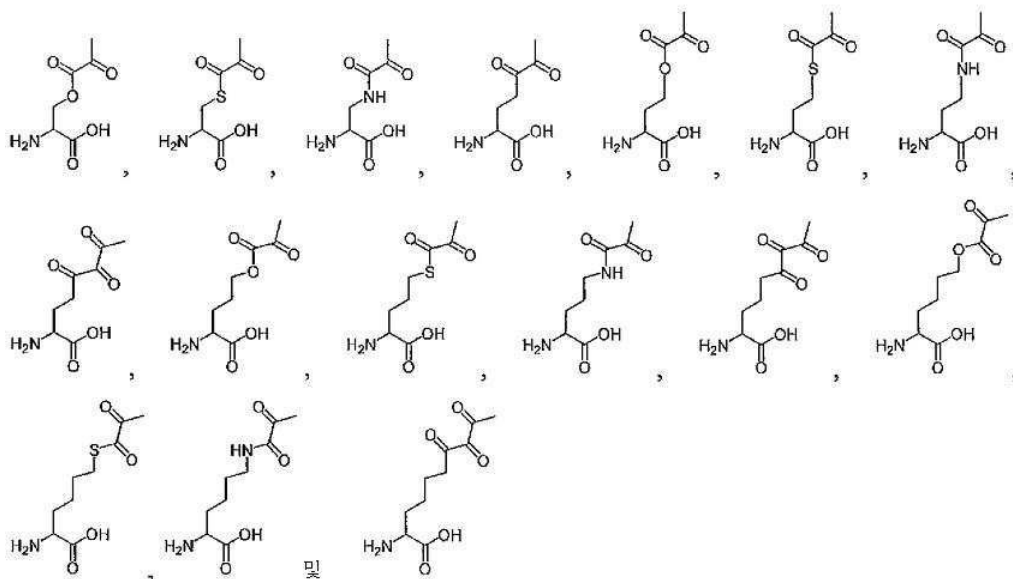
[0373] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0374] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0375] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0376] 각각의 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R' 는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이고; n 은 0 내지 8이다,

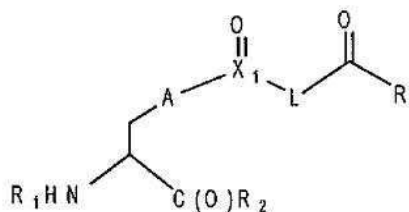
[0377] 추가로, 다음의 아미노산 또는 이것의 염이 포함된다:



[0378]

[0379] 상기 식에서, 이러한 화합물은 선택적으로 보호된 아미노, 선택적으로 보호된 카복실, 선택적으로 보호된 아미노 및 보호된 카복실이다. 추가로, 이들 비-천연 아미노산 및 다음의 비-천연 아미노산 중 어떤 것은 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다.

[0380] 추가로, 하기 화학식 XIV의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:



[0381]

[0382] 상기 식에서:

[0383] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로 사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이며;

[0384] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

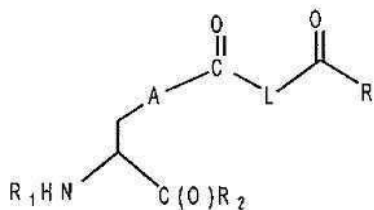
[0385] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0386] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0387] X₁은 C, S 또는 S(O)이고; L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0388] 추가로, 하기 화학식 XIV-A의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0389] [화학식 XIV-A]



[0390]

[0391] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0392] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

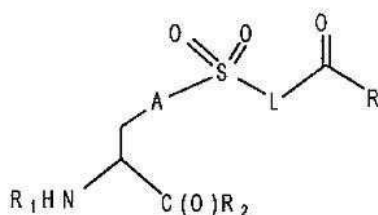
[0393] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0394] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0395] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0396] 추가로, 하기 화학식 XIV-B의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0397] [화학식 XIV-B]



[0398]

[0399] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이며;

[0400] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

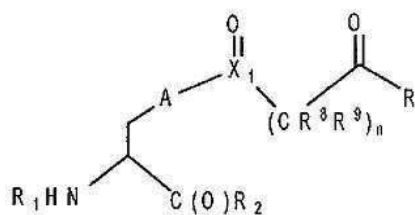
[0401] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0402] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0403] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0404] 추가로, 하기 화학식 XV의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0405] [화학식 XV]



[0406]

[0407] 상기 식에서:

[0408] A는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0409] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

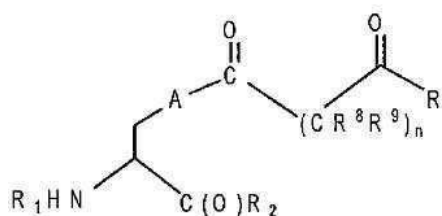
[0410] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0411] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0412] X1은 C, S 또는 S(O)이며; n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며; 각각의 CR⁸R⁹ 기 상의 각각의 R⁸ 및 R⁹는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R⁸ 및 R⁹는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 R⁸ 기에 인접한 어떤 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0413] 추가로, 하기 화학식 XV-A의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0414] [화학식 XV-A]



[0415]

[0416] 상기 식에서:

[0417] A는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0418] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0419] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

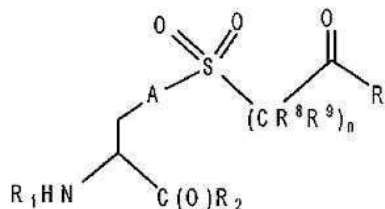
[0420] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0421] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 각각의 CR⁸R⁹ 기 상의 각각의 R⁸ 및 R⁹는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬,

아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R^8 및 R^9 중 어떤 것은 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 인접한 R^8 기에 대한 어떤 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0422] 추가로, 하기 화학식 XV-B의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0423] [화학식 XV-B]



[0424]

[0425] A는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0426] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

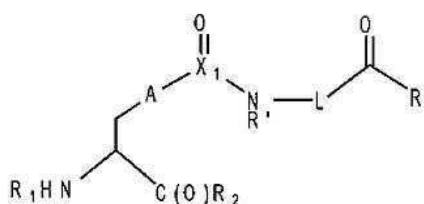
[0427] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0428] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0429] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며; 각각의 CR^8R^9 기 상의 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R^8 및 R^9 중 어떤 것은 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 인접한 R^8 기에 대한 어떤 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0430] 추가로, 하기 화학식 XVI의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0431] [화학식 XVI];



[0432]

[0433] 상기 식에서:

[0434] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0435] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

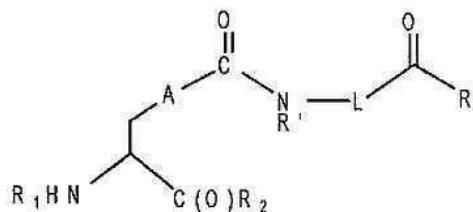
[0436] R1은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0437] R2는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0438] X_1 은 C, S 또는 S(O)이며; L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0439] 추가로, 화학식 XVI-A의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0440] [화학식 XVI-A]



[0441]

[0442] 상기 식에서:

[0443] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로 사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0444] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

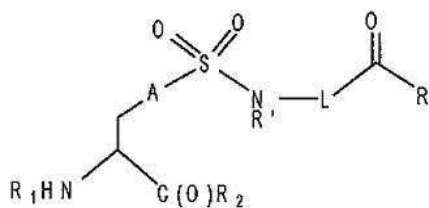
[0445] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0446] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0447] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0448] 추가로, 하기 화학식 XVI-B의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:

[0449] [화학식 XVI-B]



[0450]

[0451] 상기 식에서:

[0452] A는 선택적이며, 존재한다면, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로 사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0453] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0454] R_1 은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

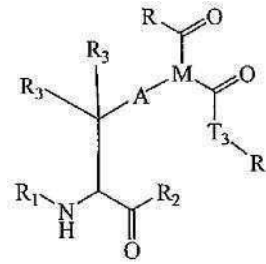
[0455] R_2 는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

[0456] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

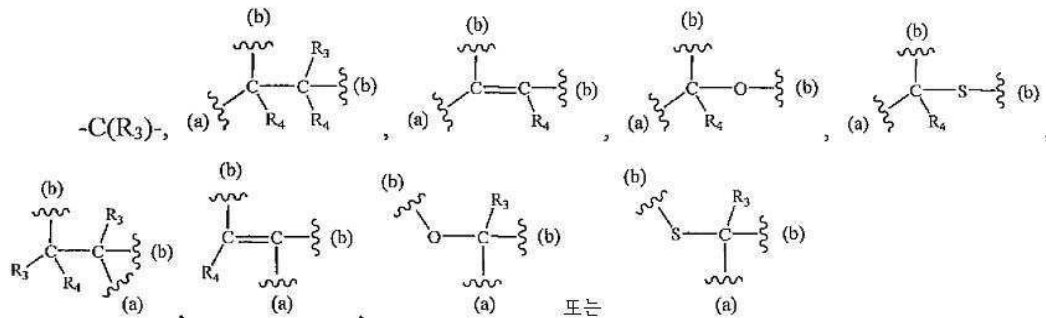
[0457] 추가로, 하기 화학식 XVII의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

[0458] [화학식 XVII]



[0460] 상기 식에서:

[0461] A는 선택적이며, 존재한다면 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;



[0462] M은 $\text{-(R}_3\text{)-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)-C(R}_4\text{)-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)=C(R}_4\text{)-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)-O-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)-S-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)-C(R}_4\text{)-}$, $\text{-(R}_3\text{)-C(R}_4\text{)=C(R}_4\text{)-}$, $\text{-(R}_3\text{)-O-C(R}_4\text{)-}$, 또는 $\text{-(R}_3\text{)-S-C(R}_4\text{)-}$ 이며, (a)는 A 기에 대한 결합을 표시하며, (b)는 각각의 카보닐 기에 대한 결합을 표시하며, R₃ 및 R₄는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R₃ 및 R₄ 또는 2개의 R₃ 기 또는 2개의 R₄ 기는 선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0463] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

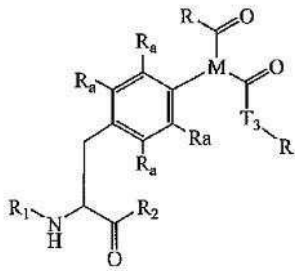
[0464] T₃는 결합, C(R)(R), O 또는 S이고, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0465] R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0466] R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이다.

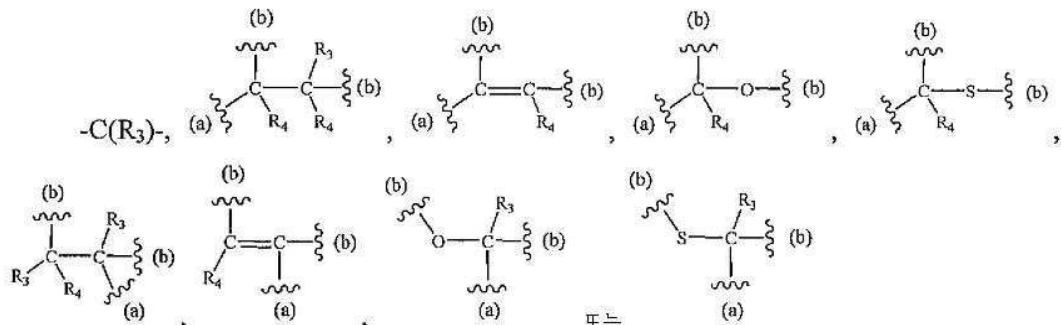
[0467] 추가로, 하기 화학식 XVIII의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

[0468] [화학식 XVIII]



[0469]

[0470] 상기 식에서:



[0471]

M은 $\text{--C(R}_3\text{)--}$, $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)--}$, $\text{--C(R}_3\text{)=C(R}_4\text{)--}$, $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)O--}$, $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)S--}$, $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)C(R}_3\text{)(R}_4\text{)--}$, $\text{--C(R}_3\text{)=C(R}_4\text{)C(R}_3\text{)(R}_4\text{)--}$, $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)OC(R}_3\text{)(R}_4\text{)--}$, 또는 $\text{--C(R}_3\text{)(R}_4\text{)SC(R}_3\text{)(R}_4\text{)--}$ 이며, (a)는 A 기에 대한 결합을 표시하고, (b)는 각각의 카보닐 기에 대한 결합을 표시하며, R₃ 및 R₄는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 또는 R₃ 및 R₄ 또는 2개의 R₃ 기 또는 2개의 R₄ 기는 선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0472]

R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0473]

T₃은 결합, C(R)(R), O 또는 S이고, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0474]

R₁은 선택적이며, 존재한다면, H, 아미노 보호 기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0475]

R₂는 선택적이며, 존재한다면, OH, 에스터 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0476]

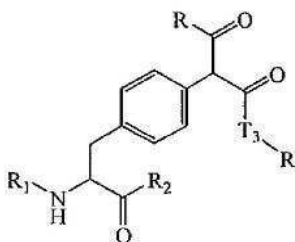
각각의 R_a는 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, --N(R')_2 , $\text{--C(O)}_k\text{R'}$ (k는 1, 2 또는 3임), --C(O)N(R')_2 , --OR' 및 $\text{--S(O)}_k\text{R'}$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 각각의 R'는 독립적으로 H, 알킬 또는 치환된 알킬이다.

[0477]

추가로, 하기 화학식 XIX의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

[0478]

[화학식 XIX]



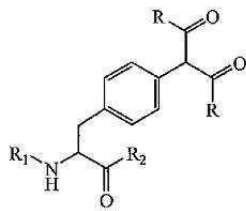
[0479]

[0480] 상기 식에서:

[0481] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고; T₃은 O 또는 S이다.

[0482] 추가로, 화학식 XX의 구조를 갖는 아미노산이 포함되며:

[0483] [화학식 XX]

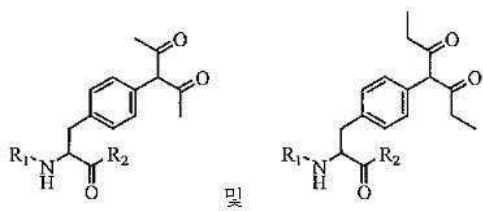


[0484]

[0485] 상기 식에서:

[0486] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0487] 추가로, 화학식 XXI의 구조를 갖는 다음의 아미노산이 포함된다:



[0488]

[0489] 일부 실시형태에서, 비-천연 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는 화학적으로 변형되어 반응성 카보닐 또는 다이카보닐 작용기를 만든다. 예를 들어, 컨주게이션 반응에 유용한 알데하이드 작용기는 인접한 아미노 및 하이드록실 기를 갖는 작용기로부터 만들어질 수 있다. 생물학적으로 활성인 분자가 폴리펩타이드인 경우, 예를 들어 N-말단 세린 또는 트레오닌(보통 존재할 수 있거나 또는 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이 사용되어 과요오드산염을 사용하는 온화한 산화적 절단 조건 하에서 알데하이드 작용기를 만들 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Strohm, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)]을 참조한다. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 N-말단으로 제한된다.

[0490] 본 발명에서, 인접한 하이드록실 및 아미노기를 함유하는 비-천연 아미노산은 "가리움된" 알데하이드 작용기로서 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시리신은 엡실론 아민에 인접한 하이드록실 기를 함유한다. 알데하이드를 만들기 위한 반응 조건은 전형적으로 폴리펩타이드 내 다른 부위에서 산화를 회피하기 위한 온화한 조건 하에서 과량 물의 메타과요오드산나트륨의 첨가를 수반한다. 산화 반응의 pH는 전형적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩타이드의 완충 용액에 약 1.5몰 과량의 메타과요오드산나트륨의 첨가 후, 암실에서 약 10분 동안 인큐베이션을 수반한다. 예를 들어, 미국특허 제6,423,685호를 참조한다.

[0491] 카보닐 또는 다이카보닐 작용기는 수용액 조건 내 온화한 조건 하에서 하이드록시아민-함유 시약과 선택적으로 반응되어 생리적 조건 하에서 안정한 대응하는 옥심 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc., 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 게다가, 카보닐 또는 다이카보닐 기의 독특한 반응성은 다른 아미노 측쇄의 존재에서 선택적 변형을 허용한다. 예를 들어, 문헌[Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F., & Strohm, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조한다.

[0492] **비-천연 아미노산: 하이드록시아민-함유 아미노산의 구조 및 합성**

[0493] 미국특허 제11/316,534호(미국 공개 제20060189529호)는 그것의 전문이 참고로서 포함된다. 따라서, 미국출원 제11/316,534(미국 공개 제20060189529호)의 부분 V(표제: "Non-natural Amino Acids"), 부분 B(표제: "Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids")에서 제공되는 개시는 이러한 개시가 본 명세서에 제시되는 것과 동일한 정도로 본 명세서에 기재된 비-천연 아미노산, 비-천연 아미노산 폴리펩타이드 및 변형된 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 제조하고, 정제하며, 특징화하고, 사

용하는 방법, 조성물(화학식 I 내지 XXXV를 포함), 기법 및 전략을 완전히 적용한다. 미국특허 공개 제 2006/0194256호, 제2006/0217532호 및 제2006/0217289호 및 WO 2006/069246(발명의 명칭: "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids 및 polypeptides")은 또한 그것의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

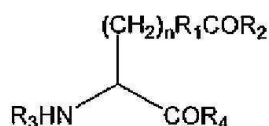
[0494] **비천연 아미노산의 화학적 합성**

[0495] 본 발명에서 사용에 적합한 다수의 비천연 아미노산은, 예를 들어 Sigma (USA) 또는 Aldrich(미국 위스콘신주 밀워키에 소재)로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 상업적으로 입수가 가능하지 않은 것은 선택적으로 본 명세서에서 제공되는 바와 같이 또는 다양한 간행물에서 제공되는 바와 같이 또는 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 선택적으로 합성된다. 유기 합성 기법에 대해, 예를 들어 문헌[Organic Chemistry by Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조한다. 비천연 아미노산의 합성을 기재하는 추가적인 간행물은, 예를 들어 WO 2002/085923(발명의 명칭: "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids"), 문헌[Matsoukas et al. (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton et al., (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; 및 Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7]을 포함한다. 또한 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 공개 제2004/0198637호(발명의 명칭: "Protein Arrays")를 참조한다.

[0496] **A. 카보닐 반응기**

[0497] 카보닐 반응기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 첨가 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자(이에 제한되는 것은 아니지만, PEG 또는 다른 수용성 분자)를 연결하는 다양한 반응을 허용한다.

[0498] 대표적인 카보닐-함유 아미노산은 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0499]

[0500] 상기 식에서 n은 0 내지 10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이고; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 및 치환된 아릴이며; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이고, R₄는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형 기이다. 일부 실시형태에서, n은 1이며, R₁은 페닐이고 R₂는 단순 알킬(즉, 메틸, 에틸 또는 프로필)이며, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치된다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며 R₂는 단순 알킬(즉, 메틸, 에틸 또는 프로필임)이고, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 메타 위치에서 위치된다.

[0501] *p*-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 *m*-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 본 명세서에 참조로서 포함된 문헌[Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카보닐-함유 아미노산은 당업자에 의

해 유사하게 제조될 수 있다.

[0502] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는 화학적으로 변형되어 반응성 카보닐 작용기를 만든다. 예를 들어, 컨쥬게이션 반응에 유용한 알데하이드 작용기는 인접한 아미노 및 하이드록실 기를 갖는 작용기로부터 만들어질 수 있다. 생물학적으로 활성인 분자가 폴리펩타이드인 경우, 예를 들어, N-말단의 세린 또는 트레오닌(보통 존재할 수 있거나 또는 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이 사용되어 과요오드산염을 사용하는 온화한 산화적 절단 조건 하에서 알데하이드 작용기를 만들 수 있다. 예를 들어 문헌[Gaertner, et al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol Chem*, 269:7224-7230 (1994)]을 참조한다. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩타이드 또는 단백질의 N-말단에서 아미노산으로 제한된다.

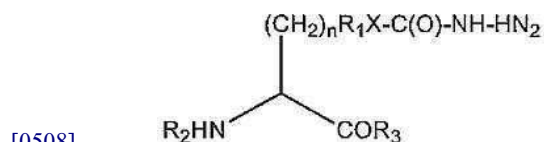
[0503] 본 발명에서, 인접한 하이드록실 및 아미노기를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 "가리움된" 알데하이드 작용기로서 폴리펩타이드 내로 포하될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시리신은 엡실론 아민에 인접한 하이드록실 기를 함유한다. 알데하이드를 만들기 위한 반응 조건은 폴리펩타이드 내의 다른 부위에서 산화를 회피하기 위한 온화한 조건하에 과량의 메타과요오드산나트륨의 첨가를 수반한다. 산화 반응의 pH는 전형적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩타이드의 완충 용액에 약 1.5 몰 과량의 메타과요오드산나트륨의 첨가 후, 암실에서 약 10분 동안 인큐베이션을 수반한다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제6,423,685호를 참조한다.

[0504] 카보닐 작용기는 수용액 중에서 온화한 조건 하에 하이드라진-, 하이드라자이드-, 하이드록실아민- 또는 세미카바자이드-함유 시약과 함께 선택적으로 반응되어 생리적 조건 하에서 안정한 대응하는 하이드라존, 옥심 또는 세미카바존 결합을 각각 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 게다가, 카보닐 기의 독특한 반응성은 다른 아미노산 측쇄의 존재에서 선택적 변형을 허용한다. 예를 들어, 문헌[Cornish, V. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997)]을 참조한다.

[0505] B. 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 반응기

[0506] 친핵성 기, 예컨대 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 다양한 친전자성 기와 반응하여 컨쥬게이트(이에 제한되는 것은 아니지만, PEG 또는 수용성 폴리머)를 형성한다.

[0507] 대표적인 하이드라진, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드-함유 아미노산은 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0509] 상기 식에서, n은 0 내지 10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이거나 또는 존재 하지 않고; X는 O, N 또는 S이거나 또는 존재 하지 않고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이며, R₃은 H, 아미노산, 리펩타이드 또는 카복시 말단 변형 기이다.

[0510] 일부 실시형태에서, n은 4이며, R₁은 존재 하지 않고, X는 N이다. 일부 실시형태에서, n은 2이며, R₁은 존재 하지 않고, X는 존재 하지 않는다. 일부 실시형태에서, n은 1이며, R₁은 페닐이고, X는 O이며, 산소 원자는 아릴 고리 상의 지방족 기에 대해 파라로 위치된다.

[0511] 하이드라자이드-, 하이드라진- 및 세미카바자이드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하다. 예를 들어, L-글루타메이트-□-하이드라자이드는 Sigma Chemical(미주리주 세인트 루이스에 소재)로부터 입수가 가능하다. 상업적으로 입수가 가능하지 않은 다른 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제6,281,211호를 참조한다.

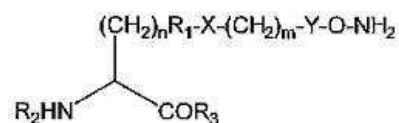
[0512] 하이드라자이드, 하이드라진 또는 세미카바자이드 작용기를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드는 유사한 화학적 반응성을 갖는 알데하이드 또는 다른 작용기를 함유하는 다양한 분자와 효율적으로 및 선택적으로 반응될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.*

117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 하이드라자이드, 하이드라진 및 세미카바자이드 작용기의 독특한 반응성은 20가지의 공통 아미노산 상에 존재 하는 친핵성 기와 비교하여 알데하이드, 케톤 및 다른 친전자성 기산(이에 제한되는 것은 아니지만, 세린 또는 트레오닌의 하이드록실 기 또는 리신의 아미노기 및 N-말단)에 대해 그것들을 상당히 더 반응성으로 만든다.

[0513] **C. 아미노옥시-함유 아미노산**

[0514] 아미노옥시(또한 하이드록실아민으로 불림) 기를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 다양한 친전자성 기와 반응되어 컨쥬게이트(이에 제한되는 것은 아니지만, PEG 또는 다른 수용성 폴리머와)를 형성한다. 하이드라진, 하이드라자이드 및 세미카바자이드와 같이, 아미노옥시 기의 향상된 친핵성은 그것이 유사한 화학적 반응성을 갖는 알데하이드 또는 다른 작용기를 함유하는 다양한 분자와 효율적이고 선택적으로 반응되도록 한다. 예를 들어, 문헌[Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001)]을 참조한다. 하이드라진 기와 반응 결과가 대응하는 하이드라존이지만, 옥심은 카보닐-함유 기, 예컨대 케톤과 아미노옥시 기의 반응으로부터 일반적으로 생긴다.

[0515] 아미노옥시기를 함유하는 대표적인 아미노산은 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0516]

[0517] 상기 식에서, n 은 0 내지 10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이거나 또는 존재 하지 않고, X 는 O, N, S이거나 또는 존재 하지 않고; m 은 0 내지 10이며; Y 는 C(O)이거나 존재 하지 않고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 아미노 말단 변형기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시형태에서, n 은 1이며, R_1 은 페닐이고, X 는 O이며, m 은 1이고, Y 는 존재한다. 일부 실시형태에서, n 은 2이며, R_1 및 X 는 존재 하지 않고, m 은 0이며, Y 는 존재 하지 않는다.

[0518] 아미노옥시-함유 아미노산은 용이하게 입수가능한 아미노산 전구체로부터 제조될 수 있다(호모세린, 세린 및 트레오닌). 예를 들어, 문헌[M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003)]을 참조한다. 특정 아미노옥시-함유 아미노산, 예컨대 L-2-아미노-4-(아미노옥시)뷰티르산은 천연 공급원으로부터 분리되었다(Rosenthal, G., *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997)). 다른 아미노옥시-함유 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다.

[0519] **D. 아자이드 및 알카인 반응기**

[0520] 아자이드 및 알카인 작용기의 독특한 반응성은 그것들이 폴리펩타이드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 극도로 유용하게 되도록 한다. 유기 아자이드, 특히 지방족 아자이드 및 알카인은 일반적으로 보통의 반응 화학 조건에 대해 안정하다. 특히, 아자이드와 알카인 작용기는 둘 다 자연적으로 발생하는 폴리펩타이드에서 발견되는 20가지의 공통 아미노산의 측쇄(즉, R 기)에 대해 비활성이다. 그러나 근접하게 될 때, 아자이드 및 알킬렌 기의 "스프링-고정(spring-loaded)" 특성이 드러나며, 그것들은 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 반응을 통해 선택적이고 효율적으로 반응하여 대응하는 트라이아졸을 만든다. 예를 들어, 문헌[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.

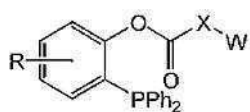
[0521] Huisgen 사이클로첨가 반응이 친핵성 치환보다는 선택적 사이클로첨가 반응을 수반하기 때문에(예를 들어, 문헌[Padwa, A., in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176)을 참조], 아자이드 및 알카인-함유 측쇄를 함유하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 포함은 얻어진 폴리펩타이드가 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형되도록 한다. 아자이드 또는 알카인-함유 펩타이드를 수반하는 사이클로첨가 반응은 촉매적 양으로 인시츄에서 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키기 위한 환원제의 존재에서 Cu(II)(이에 제한되는 것은 아니지만, 촉매적 양의 CuSO₄의 형성에서)의 첨가에 의해 수용성 조건 하에 실온에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[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)]을 참조한다. 대표적인 환원제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아스코르베이트, 금속 구리, 퀴닌, 하이드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe^{2+} , Co^{2+} 및 적용된 전기적 포텐셜을 포함한다.

[0522] 일부 경우에, 아자이드와 알카인 사이의 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 반응이 원하는 경우, 펩타이드는 알카인 모이어티를 포함하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하며, 아미노산에 부착되는 수용성 폴리머는 아자이드 모이어티를 포함한다. 대안적으로, 전환 반응(즉, 아미노산 상의 아자이드 모이어티 및 수용성 폴리머 상에 존재 하는 알카인 모이어티로)이 또한 수행될 수 있다.

[0523] 아자이드 작용기는 아릴 에스터를 함유하는 수용성 폴리머와 선택적으로 반응될 수 있고, 아릴 포스핀 모이어티와 적절하게 작용화되어 아마이드 결합을 만든다. 아릴 포스핀 기는 인시츄로 아자이드를 환원시키며, 그 다음에 얻어진 아민은 근위의 에스터 결합과 효율적으로 반응되어 대응하는 아마이드를 만든다. 예를 들어, 문헌 [Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000)]을 참조한다. 아자이드-함유 아미노산은 알킬 아자이드(이에 제한되는 것은 아니지만, 2-아미노-6-아지도-1-헥산산) 또는 아릴 아자이드(p-아지도-페닐알라닌) 중 하나 일 수 있다.

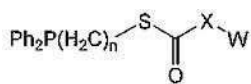
[0524] 아릴 에스터 및 포스핀 모이어티를 함유하는 대표적인 수용성 폴리머는 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0525]

[0526] 상기 식에서, X는 O, N, S 일 수 있거나 또는 존재 하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 폴리머이며 R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기일 수 있다. 대표적인 R 기는, 이에 제한되는 것은 아니지만, $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, -할로젠, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ 및 $-\text{NO}_2$ 를 포함한다. R', R'', R''' 및 R''''는 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1-3개의 할로젠, 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기로 치환된 아릴, 또는 아릴알킬 기를 지칭한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R 기를 포함할 때, 예를 들어 이들 기 중 하나 이상이 존재할 때, 각각의 R', R'', R''' 및 R'''' 기에서와 같이 각각의 R 기는 독립적으로 선택된다. R' 및 R''가 동일 질소 원자에 부착될 때, 그것들은 질소 원자와 합쳐져서 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-\text{NR}'\text{R}''$ 는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1-피롤리딘 및 4-모폴리딘을 포함하는 것으로 의 미된다. 치환체의 상기 논의로부터, 당업자는 용어 "알킬"이 수소 기 이외의 기, 예컨대 할로알킬(이에 제한되는 것은 아니지만, $-\text{CF}_3$ 및 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) 및 아실(이에 제한되는 것은 아니지만, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$) 등에 결합된 탄소 원자를 포함하는 것으로 의미된다.

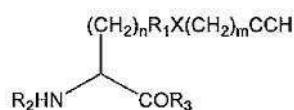
[0527] 아자이드 작용기는 또한 티오에스터를 함유하는 수용성 폴리머와 선택적으로 반응될 수 있고, 아릴 포스핀 모이어티와 적절하게 작용화되어 아마이드 결합을 만들 수 있다. 아릴 포스핀 기는 인시츄로 아자이드를 환원시키며, 그 다음에 얻어진 아민은 티오에스터 결합과 효율적으로 반응되어 대응하는 아민을 만든다. 티오에스터 및 포스핀 모이어티를 함유하는 대표적인 수용성 폴리머는 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0528]

[0529] n은 1 내지 10이고; X는 O, N, S 일 수 있거나 또는 존재 하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 폴리머이다.

[0530] 대표적인 알카인-함유 아미노산은 다음과 같이 표시될 수 있다:



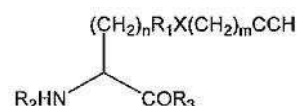
[0531]

[0532] n은 0 내지 10이고; R1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이거나 또는 존재 하지 않고; X는 O, N, S 이거나 또는 존재 하지 않으며; m은 0 내지 10이고, R2는 H, 아미노산, 펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R3은 H, 아미노산, 펩타이드 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시형태에서, n은 1이며, R1은 페닐 이고, X는 존재 하지 않으며, m은 0이며 아세틸렌 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치된다. 일부 실

시형태에서, n 은 1이며, R_1 은 페닐이고, X 는 O이며, m 은 1이고 프로파길옥시 기는 알킬 측쇄(즉, 0-프로파길-티로신)에 대해 파라 위치에 위치된다. 일부 실시형태에서, n 은 1이며, R_1 및 X 는 존재 하지 않으며, m 은 0이다(즉, 프로파길글라이신).

[0533] 알카인-함유 아미노산은 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, 프로파길글라이신은 Peptech(매사추세츠주 벨링턴에 소재)로부터 상업적으로 입수가능하다. 대안적으로, 알카인-함유 아미노산은 표준 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, *p*-프로파길옥시페닐알라닌은, 예를 들어 문헌[Deiters, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003)]에 기재된 바와 같이 합성될 수 있으며, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 문헌[Kayser, B., *et al.*, *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997)]에서 기재된 바와 같이 합성될 수 있다. 다른 알카인-함유 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다.

[0534] 대표적인 아자이드-함유 아미노산은 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0535]

[0536] 상기 식에서, n 은 0 내지 10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재 하지 않으며; X 는 O, N, S이거나 또는 존재 하지 않고; m 은 0 내지 10이고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드 또는 카복시 말단 변형 기이다. 일부 실시형태에서, n 은 1이며, R_1 은 페닐이고, X 는 존재 하지 않으며, m 은 0이고, 아자이드 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라로 위치된다. 일부 실시형태에서, n 은 0 내지 4이고, R_1 및 X 는 존재 하지 않으며, m 은 0이다. 일부 실시형태에서, n 은 1이며, R_1 은 페닐이고, X 는 O이며, m 은 2이고 β -아지도에톡시 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치된다.

[0537] 아자이드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌은 Chem-Impex International, Inc.(일리노이주 우드데일에 소재)로부터 얻을 수 있다. 상업적으로 입수가능하지 않은 해당 아자이드-함유 아미노산에 대해, 아자이드 기는 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적합한 이탈기(이에 제한되는 것은 아니지만, 할로젠화물, 메실레이트, 토실레이트)의 치환을 통해 또는 적합하게 보호된 락톤의 개방을 통해 상대적으로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[*Advanced Organic Chemistry* by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조한다.

[0538] E. 아미노티올 반응기

[0539] 베타-치환된 아미노티올 작용기의 독특한 반응성은 티아졸리딘의 변형을 통해 알데하이드 기를 함유하는 폴리펩타이드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 그것들을 극도로 유용하게 만든다. 예를 들어, 문헌[J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 베타-치환된 아미노티올 아미노산은 릴렉신 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있고, 그 다음에 알데하이드 작용기를 포함하는 수용성 폴리머와 반응될 수 있다. 일부 실시형태에서, 수용성 폴리머, 약물 컨쥬게이트 또는 다른 페이로드는 티아졸리딘의 형성을 통해 베타-치환된 아미노티올 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드에 커플링될 수 있다.

[0540] F. 추가적인 반응기

[0541] 본 발명의 릴렉식 폴리펩타이드 내에 포함될 수 있는 추가적인 반응기 및 이에 제한되는 것은 아니지만 파라-아미노-페닐알라닌을 포함하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 본 명세서에 전문이 참고로 모두 포함되는 다음의 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 공개 제2006/0194256호, 미국 특허 공개 제2006/0217532호, 미국 특허 공개 제2006/0217289호, 미국 가특허 제60/755,338호; 미국 가특허 제60/755,711호; 미국 가특허 제60/755,018호; 국제특허출원 PCT/US06/49397호; WO 2006/069246호; 미국 가특허 제 60/743,041; 미국 가특허 제 60/743,040호; 국제특허출원 PCT/US06/47822호; 미국 가특허 제60/882,819호; 미국 가특허 제 60/882,500호; 및 미국 가특허 제60/870,594호. 이들 출원은 또한, 이에 제한되는 것은 아니지만, 컨쥬게이션을 위한 하이드록실아민(아미노옥시) 기를 포함하는 PEG 또는 다른 폴리머 상에 존재할 수 있는 반응기를 논의한다.

[0542] 비천연 아미노산의 세포 흡수

[0543] 세포에 의한 비천연 아미노산 흡수는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 내로 포함을 위해 비천연 아미노산을 설계하고 선택할 때 전형적으로 고려되는 하나의 문제이다. 예를 들어, 아미노산의 높은 전하 밀도는 이들 화합물이 세포 침투성이 될 가능성이 없다는 것을 시사한다. 천연 아미노산은 단백질-기반 수송 시스템의 수집을 통해 진핵 세포 내로 취해진다. 비천연 아미노산이 세포에 의해 취해진다면 빠른 스크리닝을 행하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 제2004/0198637호(발명의 명칭: "Protein Arrays"); 및 문헌[Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785]에서 독성 분석을 참조한다. 흡수가 다양한 분석에 의해 용이하게 분석되지만, 세포 흡수 경로를 잘 받아들이는 비천연 아미노산에 대한 대안은 생체내 아미노산을 만드는 생합성 경로를 제공하는 것이다.

[0544] 비천연 아미노산의 생합성

[0545] 다수의 생합성 경로는 아미노산 및 다른 화합물의 생성을 위한 세포에서 이미 존재한다. 특정 비천연 아미노산에 대한 생합성 방법이, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 내를 포함하는 천연에서 존재 하지 않을 수 있지만, 본 발명은 이러한 방법을 제공한다. 예를 들어 비천연 아미노산에 대한 생합성 경로는 새로운 효소를 첨가하고 존재 하는 숙주 세포 경로를 변형시킴으로써 숙주 세포 내에서 선택적으로 만들어진다. 추가적인 새로운 효소는 선택적으로 자연적으로 발생하는 효소 또는 인공적으로 발달될 효소이다. 예를 들어, p-아미노페닐알라닌의 생합성(WO 2002/085923의 실시예에 제시, 발명의 명칭: "In vivo incorporation of unnatural amino acids")은 다른 유기체로부터 알려진 효소의 조합 첨가에 의존한다. 이들 효소에 대한 유전자는 유전자를 포함하는 플라스미드와 함께 세포를 형질변환시킴으로써 진핵 세포 내에 도입될 수 있다. 유전자는 세포 내에서 발현될 때, 원하는 화합물을 합성하는 효소 경로를 제공한다. 선택적으로 첨가된 효소 유형의 예는 이하의 실시예에서 제공된다. 추가적인 효소 서열은, 예를 들어 Genbank에서 발견된다. 인공적으로 발달된 효소가 또한 동일 방식으로 세포 내에 첨가된다. 이 방식에서, 세포 기구 및 세포의 재료는 조작되어 비천연 아미노산을 생성한다.

[0546] 생합성 경로에서 사용을 위해 또는 존재 하는 경로의 발전을 위해 신규 효소를 생성하기 위하여 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, Maxygen, Inc.(월드 와이드 웹 상의 maxygen.com에서 이용가능)에 의해 개발된 반복되는 재조합은 신규 효소 및 경로를 개발하기 위하여 선택적으로 사용된다. 예를 들어, 문헌[Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391]; 및 문헌[Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751]을 참조한다. 유사하게 Genencor(월드 와이드 웹 상의 genencor.com에서 이용가능)에 의해 개발된 DesignPath(상표명)는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 내 O-메틸-L-티로신을 만드는 경로를 유전자 조작하는 대사 경로 유전자 조작에 대해 선택적으로 사용된다. 이 기법은, 이에 제한되는 것은 아니지만 기능적 게놈 및 분자 발달 및 설계를 통해 확인된 것을 포함하는 새로운 유전자의 조합을 사용하여 숙주 유기체 내에서 존재 하는 경로를 재구성한다. Diversa Corporation(월드 와이드 웹 상의 diversa.com에서 입수가가능)는 또한 유전자의 라이브러리를 빠르게 스크리닝하고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 신규 경로를 만드는 유전자 경로에 대한 기법을 제공한다.

[0547] 전형적으로, 본 발명의 유전자 조작 생합성 경로에 의해 생성된 비천연 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 천연 세포양을 포함하는 효율적인 단백질 생합성에 충분한 농도로 생성되지만, 다른 아미노산 농도에 영향을 미치거나 또는 세포 자원을 고갈시키는 정도는 아니다. 이러한 방법으로 생체내에서 생성된 전형적인 농도는 약 10mM 내지 약 0.05mM이다. 일단 특이적 경로에 대해 원하는 효소를 생성하기 위해 사용된 유전자를 포함하는 플라스미드에 의해 세포가 형질전환되고 비천연 아미노산이 만들어지면, 생체내 선택은 선택적으로 사용되어 리보솜 단백질 합성과 세포 성장 둘 다에 대해 비천연 아미노산의 생성을 최적화한다.

[0548] 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩타이드

[0549] 비천연 아미노산의 포함은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 구조 및/또는 작용의 맞춤 변화, 크기 변화, 산성도, 친핵성, 수소 결합, 소수성, 프로테아제 표적 부위의 접근성, 모이어티에 표적화(이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 배열에 대해), 생물학적으로 활성인 분자의 첨가, 폴리머 부착, 방사성핵종의 부착, 혈청 민감도의 조절, 조직 침투(예를 들어, 종양)의 조절, 활성 수송의 조절, 조직, 세포 또는 기관 특이성 또는 분포의 조절, 면역원성 조절, 프로테아제 저항의 조절 등을 포함하는 다양한 목적을 위해 행해질 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은 향상된 또는 심지어 완전히 새로운 촉매적 또는 생물리적 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 다음의 특성은 단백질 내에 비천연 아미노산의 포함에 의해 선택적으로 변형된다: 독성, 생체 내 분

포, 구조적 특성, 스펙트럼 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매적 능력, 반감기(이에 제한되는 것은 아니지만, 혈청 반감기), 이에 제한되는 것은 아니지만 공유적 또는 비공유적을 포함하는 다른 분자와 반응하는 능력 등. 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 포함하는 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 신규 치료제, 진단제, 촉매적 효소, 산업적 효소, 결합 단백질(이에 제한되는 것은 아니지만, 항체)을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 구조 및 기능의 연구를 포함하는데 유용하다. 예를 들어, 문헌 [Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652]을 참조한다.

[0550] 본 발명의 한 양태에서, 조성물은 적어도 하나의, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10개 이상의 비천연 아미노산을 갖는 적어도 하나의 단백질을 포함한다. 비천연 아미노산은 동일 또는 상이할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 상이한 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 상이한 부위가 있을 수 있다. 다른 양태에서, 조성물은 적어도 하나의 아미노산을 갖는 단백질을 포함하지만 단백질 내에 존재 하는 모두 보다는 적은 특정 아미노산은 비천연 아미노산으로 치환된다. 하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 주어진 단백질에 대해, 비천연 아미노산은 동일하거나 또는 상이할 수 있다(이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질은 2개 이상의 상이한 유형의 비천연 아미노산을 포함할 수 있거나 또는 2개의 동일한 비천연 아미노산을 포함할 수 있다). 2개 이상의 비천연 아미노산을 갖는 주어진 단백질에 대해, 비천연 아미노산은 동일, 상이할 수 있고 또는 적어도 하나의 상이한 비천연 아미노산을 갖는 동일 종류의 다수의 비천연 아미노산의 조합일 수 있다.

[0551] 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드는 본 발명의 특징이다. 본 발명은 또한 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 생성된 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 부형제(이에 제한되는 것은 아니지만, 약제학적으로 허용가능한 부형제)는 또한 단백질과 함께 존재할 수 있다.

[0552] 진핵 세포 내에서 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드를 생성함으로써, 단백질 또는 폴리펩타이드는 전형적으로 진핵 번역 후 변형을 포함할 것이다. 특정 실시형태에서, 단백질은 적어도 하나의 비천연 아미노산 및 진핵 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하며, 번역 후 변형은 원핵 세포에 의해 만들어지지 않는다. 예를 들어, 번역후 변형은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 첨가, 포스포릴화, 글라이코지질-결합 변형, 글라이코실화 등을 포함한다. 한 양태에서, 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합에 의해 아스파라긴에 올리고당의 부착(이에 제한되는 것은 아니지만, (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc))을 포함한다. 진핵 단백질의 N-연결된 올리고당의 일부 예를 열거하는 표 1을 참조한다(추가적이 잔기가 또한 존재할 수 있으며, 이는 제시하지 않는다). 다른 양태에서, 번역 후 변형은 GalNAc-세린 또는 GalNAc-트레오닌 결합 또는 GlcNAc-세린 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의해 세린 또는 트레오닌에 올리고당의 부착(이에 제한되는 것은 아니지만, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc 등)을 포함한다.

[0553] (표 1)

GLCNAC-연결을 통하는 올리고당의 예

유형	염기 구조
고-만노스	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \\ \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
혼성체	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
복합체	$ \begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \quad \text{Man}\alpha 1-3 \quad \searrow \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $
자일로스	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \quad \searrow \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn} \end{array} $

[0554]

[0555]

또 다른 양태에서, 번역 후 변형은 전구체의 단백질 분해 과정(이에 제한되는 것은 아니지만, 칼시토닌 전구체, 칼시토닌 유전자-관련 펩타이드 전구체, 전전구부갑상선(preproparathyroid) 호르몬, 전전구인슐린, 프로인슐린, 프레프로오피오멜라노코르틴(preproopiomelanocortin), 프로오피오멜라노코르틴 등을 포함), 멀티 서브유닛 단백질 또는 거대분자 조립체 내로 조립, 세포 내 다른 부위(이에 제한되는 것은 아니지만, 기관, 예컨대 소포체, 골지체, 핵, 리소좀, 폐록시좀, 미토콘드리아, 엽록체, 액포 등 또는 분비 경로를 통해)로 번역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단백질은 분비 또는 국소화 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함한다.

[0556]

비천연 아미노산의 한 가지 이점은 추가적인 분자를 첨가하기 위하여 사용될 수 있는 추가적인 화학 모이어티가 존재 하는 것이다. 이들 변형은 친핵 또는 비-친핵 세포 내에서 생체내에 또는 시험관내에서 만들어질 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 번역 후 변형은 비천연 아미노산을 통한다. 예를 들어, 번역 후 변형은 친핵성-친 전자성 반응을 통할 수 있다. 단백질의 선택적 변형을 위해 현재 사용된 대부분의 반응은, 이에 제한되는 것은 아니지만, α -할로케톤과 히스티딘 또는 시스테인 측쇄의 반응을 포함하는 친핵성과 친전자성 반응 사이의 공유 결합 형성을 수반한다. 이들 경우에 선택성은 단백질 내 친핵성 잔기의 수 및 접근성에 의해 결정된다. 본 발명의 단백질에서, 다른 더 선택적인 반응, 예컨대 시험관 내 및 생체내에서 비천연 케토-아미노산과 하이드라자이드 또는 아미노옥시 화합물의 반응이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cornish, et al., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) Science 292:498-500; Chin, et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang, et al., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; 및 Chin, et al., (2003) Science, 301:964-7]을 참조하며, 이들 모두는 본 명세서에 참조로 포함된다. 이는 형광단, 가교제, 당류 유도체 및 세포독성 분자를 포함하는 다수의 시약에 의한 사실상 임의의 단백질의 선택적 표지를 허용한다. 또한 본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제 6,927,042호(발명의 명칭: "Glycoprotein synthesis")을 참조한다. 이제 제한되는 것은 아니지만, 아직도 아미노산을 통한 번역 후 변형은 또한 Staudinger 결합을 통해 만들어질 수 있다(이에 제한되는 것은 아니지만, 트라이아릴포스핀 시약에 의해). 예를 들어, 문헌[Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24]을 참조한다.

- [0557] 본 발명은 단백질의 선택적 변형을 위한 다른 가장 효율적인 방법을 제공하는데, 이는 이에 제한되는 것은 아니지만, 선택자 코돈에 반응하여 단백질 내로 아자이드 또는 알킬닐 모이어티를 함유하는 비천연 아미노산의 유전적 포함을 수반한다. 이들 아미노산 측쇄는 그 다음에, 이에 제한되는 것은 아니지만 각각 알킬닐 또는 아자이드 유도체에 의한, 이에 제한되는 것은 아니지만 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 반응(예를 들어 문헌[Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; 및 Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176] 참조)에 의해 변형될 수 있다. 이 방법이 친핵성 치환보다는 사이클로첨가를 수반하기 때문에, 단백질은 극도로 높은 선택성으로 변형될 수 있다. 이 반응은 반응 혼합물에 촉매적 양의 Cu(I) 염의 첨가에 의해 뛰어난 위치선택성(1,4 > 1,5)을 갖는 수성 조건으로 실온에서 수행된다. 예를 들어, 문헌[Tornoe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064]; 및 문헌[Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599]을 참조한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 바이아르센(bisarsenic) 화합물 상에서 테트라시스테인 모티프로 리간드 교환이다. 예를 들어, 문헌[Griffin, et al., (1998) Science 281:269-272]을 참조한다.
- [0558] [3+2] 사이클로첨가를 통해 본 발명의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 아자이드 또는 알킬닐 유도체를 갖는 임의의 분자를 사실상 포함한다. 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 염료, 형광단, 가교제, 당류 유도체, 폴리머(이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌 글라이콜의 유도체), 광가교제, 세포독성 화합물, 친화도 표지, 바이오틴의 유도체, 수지, 비드, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드(또는 그 이상), 폴리뉴클레오타이드(들)(이에 제한되는 것은 아니지만, DNA, RNA 등), 금속 킬레이터, 보조인자, 지방산, 탄수화물 등을 포함한다. 이들 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하는 알킬닐 기, 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만, p-아지도-페닐알라닌을 포함하는 아지도 기를 갖는 비천연 아미노산체 첨가될 수 있다.
- [0559] **비천연으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드의 생체내 생성**
- [0560] 본 발명의 펩타이드는 자연적으로 발생하는 시스템 내에 암호화되지 않은 아미노산에 첨가되거나 또는 치환하기 위한 변형된 tRNA 및 tRNA 신시타제를 사용하여 생체내에서 생성될 수 있다.
- [0561] 자연적으로 발생하는 시스템에 암호화되지 않은 아미노산을 사용하는 tRNAs 및 tRNA 신시타제를 만드는 방법은, 예를 들어 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 기재되어 있다. 이들 방법은 번역 시스템에 내인성인 신시타제 및 tRNA와 독립적으로 작용하는 번역 기구를 만드는 단계를 수반한다(따라서 때때로 "직교"로서 언급된다). 전형적으로, 번역 시스템은 직교 tRNA(O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신시타제(O-RS)를 포함한다. 전형적으로, O-RS는 시스템 내 다른 tRNA에 의해 인식되지 않는 적어도 하나의 선택자 코돈을 인식하는 번역 시스템 및 O-tRNA 내에서 적어도 하나의 비-자연적으로 발생하는 아미노산을 우선적으로 아미노아실화된다. 따라서 번역 시스템은 암호화된 선택자 코돈에 반응하여 시스템 내에서 생성된 단백질 내로 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 삽입하고, 따라서 암호화된 폴리펩타이드 내 위치 내로 아미노산을 "치환한다".
- [0562] 매우 다양한 직교 tRNA 및 아미노아실 tRNA 신시타제는 폴리펩타이드 내로 특정 합성 아미노산을 삽입하는 것에 대해 당업계에서 설명되며, 일반적으로 본 발명에서 사용에 적합하다. 예를 들어, 케토-특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제는 문헌[Wang, L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003)] 및 [Zhang, Z. et al., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 대표적인 O-RS 또는 이것의 일부는 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되며, 본 명세서에 각각 참조로 포함된 미국특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 개시된 아미노산 서열을 포함한다. O-RS와 함께 사용을 위한 대응하는 O-tRNA 분자는 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 기재되어 있다. O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제 쌍의 추가적인 예는 WO 2005/007870, WO 2005/007624; 및 WO 2005/019415에 기재되어 있다.
- [0563] 아자이드-특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제 시스템의 예는 문헌[Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]에 기재되어 있다. p-아지도-L-Phe에 대한 대표적인 O-RS 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제7,083,970호에 개시되는 것과 같은 뉴클레오타이드 서열 서열번호 14-16 및 29-32 및 아미노산 서열 서열번호 46-48 및 61-64을 포함한다. 본 발명에서 사용에 적합한 대표적인 O-tRNA 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제7,083,970호에 개시되는 뉴클레오타이드 서열 서열번호 1-3을 포함한다. 특정 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 특이적인 O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제 쌍의 다른 예는 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제7,045,337호에 기재되며, 사카로마이세스 세레비시애(*S. cerevisiae*) 내 케토-와 아자이드-함유 아미노산을 포함하는 O-RS 및 O-tRNA는 문헌[Chin, J. W., et al., Science 301:964-967(2003)]에 기재되어 있다.

- [0564] 몇몇 다른 직교 쌍이 보고되었다. 사카로마이세스 세레비시에 tRNA 및 신시타제로부터 유래된 글루타미닐(예를 들어, 문헌[Liu, D. R., and Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785] 참조), 아스파틸(예를 들어 문헌[Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286] 참조) 및 티로실(예를 들어 문헌[Ohno, S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068]; 및 [Kowal, A. K, et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273] 참조) 시스템은 이콜라이 내 비천연 아미노산의 잠재적인 포함에 대해 설명되었다. 이콜라이 글루타미닐로부터 유래된 시스템(예를 들어 문헌[Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273] 참조) 및 티로실(예를 들어 문헌[Edwards, H., and Schimmel, P, (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641] 참조) 신시타제는 사카로마이세스 세레비시에 내 사용에 대해 기재되었다. 이콜라이 티로실 시스템은 포유류 세포 내 3-요오도-L-티로신의 포함을 위해 사용되었다. 문헌[Sakamoto, K., et al., (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699]을 참조한다.
- [0565] O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제의 사용은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 암호화하는 특이적 코돈의 선택을 수반한다. 임의의 코돈이 사용될 수 있지만, 일반적으로 O-tRNA/아미노아실-tRNA 신시타제가 발현되는 세포 내에서 거의 사용되지 않거나 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 대표적인 코돈은 넌센스 코돈, 예컨대 정지코돈(앰버, 오키 및 오팔), 4개 이상의 염기 코돈 및 거의 사용되지 않거나 또는 사용되지 않는 다른 천연 3-염기 코돈을 포함한다.
- [0566] 특이적 선택자 코돈(들)은 당업계에 공지된 돌연변이유발 방법을 사용하여 틸락신 폴리뉴클레오타이드 암호화 서열 내 적절한 위치 내로 도입될 수 있다(이에 제한되는 것은 아니지만, 부위-특이적 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 제한 선택 돌연변이유발 등).
- [0567] 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하기 위해 사용될 수 있는 O-RSs, O-tRNA 및 직교 O-tRNA/O-RS 쌍과 같은 단백질 생합성 기구의 성분을 만드는 방법은 문헌[Wang, L., et al. Science 292: 498-500 (2001); Chin, J. W, et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. et al. Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 생체내 포함을 위한 방법 및 조성물은 본 명세서에 참조로 포함된 미국특허 제7,045,337호에 기재되어 있다. 유기체의 생체내 번역 시스템에서 사용을 위한 직교 tRNA-tRNA 신시타제 쌍을 선택하는 방법은 또한 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제7,045,337호 및 제 7,083,970호에 기재되어 있다. 본 명세서에 참조로 포함되는 국제특허출원 WO 04/035743(발명의 명칭: Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins)는 케토 아미노산의 포함을 위한 직교 RS 및 tRNA 쌍을 기재하며, 본 명세서에 참조로 포함되는 국제특허출원 WO 04/094593는 진핵 숙주 세포 내 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 포함을 위한 직교 RS 및 tRNA 쌍을 기재한다.
- [0568] 적어도 하나의 재조합 직교 아미노아실-tRNA 신시타제(O-RS)의 생성 방법은 다음 단계: (a) 이에 제한되는 것은 아니지만, 원핵 유기체, 예컨대 메타노코커스 야나시, 메타노박테리움 썬모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리키아 콜라이, 아케오글로버스 펠지더스(*A. fulgidus*), 파이로코커스 푸리오르스, 파이로코커스 호리코시, 에우로파이럼 페르닉스, 썬무스 썬모필루스(*T. thermophilus*) 등, 또는 진핵 유기체를 포함하는 처음의 유기체로부터 적어도 하나의 아미노아실-tRNA 신시타제(RS)로부터 유래된 RS(선택적으로 돌연변이체)의 라이브러리를 만드는 단계; (b) 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재에서 직교 tRNA(O-tRNA)를 아미노아실화하는 구성원에 대해 RS(선택적으로 돌연변이체 RS)의 라이브러리를 선택하고(및/또는 스크리닝하고), 이에 의해 활성(선택적으로 돌연변이체) RS의 풀을 제공하는 단계, (c) 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 없는 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 활성 RS(이에 제한되는 것은 아니지만, 돌연변이체 RS)에 대한 풀을 선택하고(선택적으로 네거티브 선택을 통해), 이에 의해 적어도 하나의 재조합 O-RS를 제공하는 단계를 포함하되; 적어도 하나의 재조합 O-RS는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화한다.
- [0569] 한 실시형태에서, RS는 불활성 RS이다. 불활성 RS는 활성 RS를 돌연변이시킴으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 불활성 RS는 적어도 약 1, 적어도 약 2, 적어도 약 3, 적어도 약 4, 적어도 약 5, 적어도 약 6 또는 적어도 약 10개 이상의 아미노산을, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알라닌을 포함하는 상이한 아미노산으로 돌연변이시킴으로써 만들어질 수 있다.
- [0570] 돌연변이체 RS의 라이브러리는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 3차원 RS 구조에 기반한 합리적 설계 또는 무작위 또는 합리적 설계 기법에서 RS 뉴클레오타이드의 돌연변이유발을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기법을 사용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체 RS는 부위-특이적 돌연변이, 무작위 돌연변이, 다양성 생성 재조합 돌연변이, 키메라 구성체, 합리적 설계 및 본 명세서에 기재된 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 만들어질 수 있다.

- [0571] 한 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재에서, 이에 제한되는 것은 아니지만 직교 tRNA(O-tRNA)를 아미노아실화하는 활성인 구성원에 대해 RS(선택적으로 돌연변이체 RS)의 라이브러리를 선택하는 것(및/또는 스크리닝하는 것)은 하기를 포함한다: 이에 제한되는 것은 아니지만, 항생제 저항 유전자 등을 포함하는 포지티브 선택 또는 스크리닝 마커 및 (선택적으로 돌연변이체) RS의 라이브러리를 다수의 세포 내로 도입하는 단계로서, 포지티브 선택 및/또는 스크리닝 마커는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 앰버, 오키 또는 오팔 코돈을 포함하는 적어도 하나의 선택자 코돈을 포함하고; 포지티브 선택 또는 스크리닝 마커 내 적어도 하나의 선택자 코돈을 억제하는 것에 의해 선택제 및/또는 스크리닝제의 존재에서 살아있는(또는 특이적 반응을 나타내는) 세포를 확인함으로써, 활성 (선택적으로 돌연변이체) RS의 풀을 함유하는 포지티브로 선택된 세포의 서브세트를 제공하는 단계. 선택적으로 선택 및/또는 스크리닝제 농도는 다를 수 있다.
- [0572] 한 양태에서, 포지티브 선택 마커는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 유전자이며, 선택자 코돈은 CAT 유전자 내 앰버 정지코돈이다. 선택적으로, 포지티브 선택 마커는 p-락타마제 유전자이며, 선택자 코돈은 β -락타마제 유전자 내 앰버 정지코돈이다. 다른 양태에서 포지티브 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성 기반 스크리닝 마커(이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 표면 마커)를 포함한다.
- [0573] 한 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 없는 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 활성 RS(선택적으로 돌연변이체)에 대한 풀을 네거티브로 선택하거나 또는 스크리닝하는 것은 다음을 포함한다: 네거티브 선택을 도입하거나 또는 포지티브 선택으로부터 활성(선택적으로 돌연변이체) RS의 풀과 함께 마커를 스크리닝하거나 또는 제2 유기체의 다수의 세포 내로 스크리닝하는 단계로서, 네거티브 선택 또는 스크리닝 마커는 적어도 하나의 선택자 코돈(이에 제한되는 것은 아니지만, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 유전자를 포함하는 이에 제한되는 것은 아니지만 항생제 저항성 유전자)을 포함하고; 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 스크리닝제 또는 선택제로 보충된 제1 배지에서 특이적 스크리닝 반응을 견뎌내거나 또는 나타내지만, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 선택제 또는 스크리닝제로 보충되지 않은 제2 배지에 특이적 반응을 견뎌내거나 또는 나타내지 않는 세포를 확인함으로써, 적어도 하나의 재조합 O-RS로 살아있는 세포 또는 스크리닝된 세포를 제조하는 단계. 예를 들어, CAT 확인 프로토콜은 적절한 O-RS 재조합의 결정에서 포지티브 선택 및/또는 네거티브 스크리닝으로서 선택적으로 작용한다. 예를 들어, 클론의 풀은 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 있거나 없는 CAT(적어도 하나의 선택자 코돈을 포함함)를 함유하는 성장 플레이트 상에서 선택적으로 복제된다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 플레이트 상에서 배타적으로 성장하는 클론은 따라서 재조합 O-RS를 함유하는 것으로 여겨진다. 한 양태에서, 선택제(및/또는 스크리닝제)의 농도는 다르다. 일부 양태에서, 제1 및 제2 유기체는 상이하다. 따라서, 제1 및/또는 제2 유기체는 선택적으로 원핵생물, 진핵생물, 포유류, 에스케리키아 콜라이, 진균, 효모, 고세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함한다. 다른 실시형태에서, 스크리닝제는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성 기반 스크리닝 마커를 포함한다.
- [0574] 다른 실시형태에서, 활성(선택적으로 돌연변이체) RS에 대한 풀을 스크리닝하거나 또는 선택하는 것은(이에 제한되는 것은 아니지만, 네거티브로 스크리닝하는 것을 포함) 다음을 포함한다: 포지티브 단계 (b)로부터 활성 돌연변이체 RS의 풀을 분리시키는 단계; 네거티브 선택 또는 스크리닝 마커 및 활성(선택적으로 돌연변이체) RS의 풀을 제2 유기체의 다수의 세포 내로 도입하는 단계로서, 네거티브 선택 또는 스크리닝 마커는 적어도 하나의 선택자 코돈 (이에 제한되는 것은 아니지만 적어도 하나의 선택자 코돈을 포함하는 리보뉴클레아제 바마제 유전자를 포함하는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 독성 마커 유전자)을 포함하고; 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 보충되지 않은 제1 배지에서 특이적 스크리닝 반응을 견뎌내거나 또는 나타내지만, 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 보충한 제2 배지에서 특이적 스크리닝 반응을 견뎌내거나 또는 나타내지 않는 세포를 확인하고, 이에 의해 적어도 하나의 재조합 O-RS를 갖는 견뎌낸 또는 스크리닝된 세포를 제공하는 단계로서, 적어도 하나의 재조합 O-RS는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 특이적이다. 한 양태에서, 적어도 하나의 선택자 코돈은 약 2개 이상의 선택자 코돈을 포함한다. 이러한 실시형태는 선택적으로 포함될 수 있되, 적어도 하나의 선택자 코돈은 2 이상의 선택자 코돈을 포함하며, 제1 및 제2 유기체는 상이하다(이에 제한되는 것은 아니지만, 각각의 유기체는 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 원핵생물, 진핵생물, 포유류, 에스케리키아 콜라이, 진균, 효모, 고세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함한다). 또한, 네거티브 선택 마커가 리보뉴클레아제 바마제 유전자(적어도 하나의 선택자 코돈을 포함함)를 포함하는 일부 양태가 포함된다. 스크리닝 마커가 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성 기반 스크리닝 마커를 선택적으로 포함하는 다른 양태가 포함된다. 본 명세서의 다른 실시형태에서, 스크리닝 및/또는 선택은 다양한 스크리닝 및/또는 선택 엄격함을 선택적으로 포함한다.
- [0575] 한 실시형태에서, 적어도 하나의 재조합 직교 아미노아실-tRNA 신시타제(O-RS)를 생성하는 방법은 추가로 하기

를 포함할 수 있다: (d) 적어도 하나의 재조합 O-RS를 분리하는 단계; (e) 적어도 하나의 재조합 O-RS로부터 유래된 O-RS(선택적으로 돌연변이됨)의 제2 설정을 생성하는 단계; 및 (f) O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 능력을 포함하는 돌연변이된 O-RS가 얻어질 때까지 단계 (b) 및 (c)를 반복하는 단계. 선택적으로, 단계 (d) 내지 (f)는, 이에 제한되는 것은 아니지만 적어도 약 2회 반복된다. 한 양태에서, 적어도 하나의 재조합 O-RS로부터 유래된 돌연변이된 O-RS의 제2 설정은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 무작위 돌연변이유발, 부위-특이적 돌연변이유발, 재조합 또는 이들의 조합을 포함하는 돌연변이 유발에 의해 만들어질 수 있다.

[0576] 상기 기재된 방법에서, 이에 제한되는 것은 아니지만, 포지티브 선택/스크리닝 단계 (b), 네거티브 선택/스크리닝 단계 (c) 또는 포지티브와 네거티브 선택/스크리닝 단계 (b) 및 (c)를 둘 다 포함하는 선택/스크리닝 단계의 엄격함은 다양한 선택/스크리닝 엄격함을 선택적으로 포함한다. 다른 실시형태에서, 포지티브 선택/스크리닝 단계 (b), 네거티브 선택/스크리닝 단계 (c) 또는 포지티브 선택/스크리닝 단계 (b) 및 (c) 둘 다는 리포터의 사용을 포함하되, 해당 리포터는 형광-활성화된 세포 정렬(fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해 검출되거나 또는 리포터는 발광에 의해 검출된다. 선택적으로, 리포터는 세포 표면 상에서, 파지 디스플레이 상 등에서 나타나며, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 또는 유사체를 수반하는 친화성 또는 촉매적 활성에 기반하여 선택된다. 한 실시형태에서, 돌연변이된 신시타제는 세포 표면 상에서, 파지 디스플레이 상 등에서 나타난다.

[0577] 재조합 직교 tRNA(O-tRNA)의 생성 방법은 다음 단계: (a) 적어도 하나의 tRNA, 이에 제한되는 것은 아니지만 제 1 유기체로부터 억제제 tRNA로부터 유래된 돌연변이체 tRNA의 라이브러리 생성 단계; (b) 제1 유기체로부터 RS가 없는 제2 유기체로부터 아미노아실-tRNA 신시타제(RS)에 의해 아미노아실화된 (선택적으로 돌연변이체) tRNA에 대한 라이브러리를 선택하거나(이에 제한되는 것은 아니지만, 네거티브로 선택) 또는 스크리닝하고, 이에 의해 tRNA(선택적으로 돌연변이체)의 풀을 제공하는 단계; 및 (c) 도입된 직교 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 구성원에 대해 tRNA(선택적으로 돌연변이체)의 풀을 선택하거나 또는 스크리닝하고, 이에 의해 적어도 하나의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계를 포함하되; 적어도 하나의 재조합 O-tRNA는 선택자 코돈을 인식하고, 제2 유기체로부터 RS에 의해 효율적으로 인식되지 않으며, O-RS에 의해 우선적으로 아미노아실화된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 tRNA는 억제제 tRNA이고/이거나 천연 및/또는 비천연 염기의 독특한 3개의 염기 코돈을 포함하거나, 또는 넌센스 코돈, 희귀 코돈, 비천연 코돈, 적어도 4개의 염기를 포함하는 코돈, 앰버 코돈, 오키 코돈 또는 오팔 정지코돈이다. 한 실시형태에서, 재조합 O-tRNA는 직교성의 개선을 소유한다. 일부 실시형태에서, O-tRNA는 변형의 필요 없이 제2 유기체로부터 제1 유기체 내로 선택적으로 도입된다는 것이 인식될 것이다. 다양한 실시형태에서, 제1 및 제2 유기체는 동일 또는 상이하하며, 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 원핵 생물(이에 제한되는 것은 아니지만, 메타노코커스 야나시, 메타노박테리움 씨모토토트로피쿰, 에스케리키아 콜라이, 할로박테리움 등을 포함), 진핵생물, 포유류, 진균, 효모, 고세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함하는 것으로부터 선택된다. 추가적으로, 재조합 tRNA는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 선택적으로 아실화되되, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 자연적으로 또는 유전자 조작을 통해 생체내에서 생합성된다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 적어도 제1 또는 제2 유기체에 대해 성장 배지에 선택적으로 첨가된다.

[0578] 한 양태에서, 아미노아실-tRNA 신시타제에 의해 아미노아실화된 (선택적으로 돌연변이체)tRNA에 대한 라이브러리를 선택하거나(이에 제한되는 것은 아니지만, 네거티브로 선택) 또는 스크리닝하는 것(단계 (b))은 다음 단계를 포함한다: 제2 유기체로부터 다수의 세포 내에 독성 마커 유전자 및 (선택적으로 돌연변이체) tRNA의 라이브러리를 도입하는 단계로서, 해당 독성 마커 유전자는 선택자 코돈(또는 독성 또는 정전기체의 생성을 유발하는 유전자 또는 유기체에 필수적인 유전자이되, 이러한 마커 유전자는 적어도 하나의 선택자 코돈을 포함함) 중 적어도 하나를 포함하고; 살아있는 세포를 선택하는 단계로서, 살아있는 세포는 적어도 하나의 직교 tRNA 또는 비작용성 tRNA를 포함하는 (선택적으로 돌연변이체)tRNA의 풀을 함유한다. 예를 들어, 살아있는 세포는 비교 비세포 밀도 분석을 사용함으로써 선택될 수 있다.

[0579] 다른 양태에서, 독성 마커 유전자는 2 이상의 선택자 코돈을 포함할 수 있다. 해당 방법의 다른 실시형태에서, 독성 마커 유전자는 리보뉴클레아제 바나제 유전자이며, 리보뉴클레아제 바나제 유전자는 적어도 하나의 앰버 코돈을 포함한다. 선택적으로, 리보뉴클레아제 바나제 유전자는 2 이상의 앰버 코돈을 포함할 수 있다.

[0580] 한 실시형태에서, 도입된 직교 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 구성원에 대한 (선택적으로 돌연변이체) tRNA의 풀을 선택하거나 또는 스크리닝하는 것은 다음 단계: 포지티브 선택을 도입하거나 또는 마커 유전자를 스크리닝하는 단계로서, 포지티브 마커 유전자는 약물 저항 유전자(이에 제한되는 것은 아니지만, 선택자 코돈 중 적어도 하나, 예컨대 적어도 하나의 앰버 정지코돈을 포함하는 □-락타마제 유전자) 또는 유기체에 필수적인 유전자, 또는 O-RS와 함께 독성 작용제의 해독을 유발하는 유전자, 및 제2 유기체로부터 다수의 세포 내로 (선

택적으로 돌연변이체) tRNA의 풀을 포함하고; 이에 제한되는 것은 아니지만, 항생제를 포함하는 선택제 또는 스크리닝제의 존재 중에서 살아있는 또는 스크리닝된 세포를 확인함으로써, 적어도 하나의 재조합 tRNA를 소유하는 세포의 풀을 제공하는 단계를 포함하며, 적어도 하나의 재조합 tRNA는 O-RS에 의해 아미노아실화되고 적어도 하나의 선택자 코돈에 반응하여 포지티브 마커 유전자에 의해 암호화된 번역 생성물 내로 아미노산을 삽입한다. 다른 실시형태에서, 선택제 및/또는 스크리닝제의 농도는 다르다.

[0581] 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍의 생성방법이 제공된다. 방법은 (a) 제1 유기체로부터 적어도 하나의 tRNA로부터 유래된 돌연변이체 tRNA의 라이브러리를 생성하는 단계; (b) 제 유기체로부터 RS가 없는 제2 유기체로부터의 아미노아실-tRNA 신시타제(RS)에 의해 아미노아실화된 (선택적으로 돌연변이체) tRNA에 대한 라이브러리를 네거티브로 선택하거나 또는 스크리닝함으로써, (선택적으로 돌연변이체) tRNA의 풀을 제공하는 단계; (c) 도입된 직교 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화된 구성원에 대한 (선택적으로 돌연변이체) tRNA의 풀을 선택하거나 또는 스크리닝 함으로써 적어도 하나의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계를 포함한다. 적어도 하나의 재조합 O-tRNA는 선택자 코돈을 인식하며, 제2 유기체로부터 RS에 의해 효율적으로 인식되지 않고, O-RS에 의해 우선적으로 아미노아실화된다. 해당 방법은 또한 (d) 제3 유기체로부터 적어도 하나의 아미노아실-tRNA 신시타제(RS)로부터 유래된 (선택적으로 돌연변이체) RS의 라이브러리를 생성하는 단계; (e) 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재에서 적어도 하나의 재조합 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 구성원에 대한 돌연변이체 RS의 라이브러리를 선택하거나 또는 스크리닝 함으로써, 활성(선택적으로 돌연변이체) RS의 풀을 제공하는 단계; 및 (f) 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 없는 적어도 하나의 재조합 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화되는 활성(선택적으로 돌연변이체) RS에 대한 풀을 네거티브로 선택하거나 또는 스크리닝함으로써 적어도 하나의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍을 제공하는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 적어도 하나의 재조합 O-tRNA에 특이적인 적어도 하나의 재조합 O-RS를 포함한다. 해당 방법에 의해 생성된 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍이 포함된다. 예를 들어, 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은, 이에 제한되는 것은 아니지만, mutRNATyr-mutTyrRS 쌍, 예컨대 mutRNATyr-SS12TyrRS 쌍, mutRNALeu-mutLeuRS 쌍, mutRNAThr-mutThrRS 쌍, mutRNAGlu-mutGluRS 쌍 등을 포함한다. 추가적으로, 이러한 방법이 포함되되, 제1 및 제3 유기체가 동일하다(이에 제한되는 것은 아니지만, 메타노코커스 야나시).

[0582] 제2 유기체의 생체내 번역 시스템에서 사용을 위한 직교 tRNA-tRNA 신시타제 쌍의 선택 방법이 또한 본 발명에 포함된다. 해당 방법은 제2 유기체로부터 세포의 제1 세트 내로 제1 유기체로부터 분리되거나 또는 유래된 마커 유전자, tRNA 및 아미노아실-tRNA 신시타제(RS)를 도입하는 단계; 마커 유전자 및 tRNA를 제2 유기체로부터의 중복 세포 세트 내로 도입하는 단계; 및 중복 세포 세트에서 생존하지 않은 제1 세트 내 생존 세포를 선택하거나 또는 중복 세포 세트에 이러한 반응을 제공하지 않는 특이적 스크리닝 반응을 나타내는 세포에 대해 스크리닝하는 단계를 포함하되, 제1 세트 및 중복 세포 세트는 선택제 또는 선택제의 존재에서 성장되고, 생존 또는 스크리닝된 세포는 제2 유기체의 생체내 번역 시스템에서 사용을 위한 직교 tRNA-tRNA 신시타제 쌍을 포함한다. 한 실시형태에서, 비교 및 선택 또는 스크리닝은 생체내 상보적 분석을 포함한다. 선택제 또는 스크리닝제의 농도는 다를 수 있다.

[0583] 본 발명의 유기체는 다양한 유기체 및 다양한 조합을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 제1 및 제2 유기체는 동일 또는 상이할 수 있다. 한 실시형태에서, 유기체는 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 메타노코커스 야나시, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리키아 콜라이, 아케오글로버스 필지더스, 파이로코커스 푸리오서스, 파이로코커스 호리코시, 에우로파이럼 페르닉스, 씨무스 씨모필루스 등을 포함하는 원핵 유기체이다. 대안적으로, 유기체는 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 식물(이에 제한되는 것은 아니지만, 단자엽식물강 또는 쌍떡잎식물강), 조류, 원생생물, 진균(이에 제한되는 것은 아니지만, 효모 등), 동물(이에 제한되는 것은 아니지만, 포유류, 곤충, 절지동물 등) 등을 포함하는 진핵 유기체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 제2 유기체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 메타노코커스 야나시, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리키아 콜라이, 아케오글로버스 필지더스, 파이로코커스 푸리오서스, 파이로코커스 호리코시, 에우로파이럼 페르닉스, 씨무스 씨모필루스 등을 포함하는 원핵 유기체이다. 대안적으로, 제2 유기체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 효모, 동물세포, 식물 세포, 진균, 포유류 세포 등을 포함하는 진핵 유기체일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 제1 및 제2 유기체는 상이하다.

[0584] **릴렉신 폴리펩타이드 내 비-자연적으로 발생하는 아미노산의 위치**

[0585] 본 발명은 릴렉신 폴리펩타이드 내로 하나 이상의 비-자연적으로 발생하는 아미노산의 포함을 고려한다. 하나 이상의 비-자연적으로 발생하는 아미노산은 폴리펩타이드의 활성을 방해하지 않는 특정 위치에 포함될 수 있다. 이는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 소수성 아미노산을 소수성 아미노산으로, 거대 아미노산을 거대 아미노산

으로, 친수성 아미노산을 친수성 아미노산으로 치환하고/하거나 활성화에 필요하지 않은 위치에서 비-자연적으로 발생하는 아미노산을 삽입하는 "보존적" 치환에 의해 달성될 수 있다.

[0586]

인슐린폴리펩타이드 내에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환을 위해 원하는 부위를 선택하기 위하여 다양한 생화학적 및 구조적 접근이 사용될 수 있다. 폴리펩타이드 쇄의 임의의 위치는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하기 위한 선택에 적합하며, 선택은 합리적 설계에 기반하거나 또는 임의의 또는 전혀 없는 특성의 원하는 목적을 위해 무작위 선택에 의할 수 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명백하다. 원하는 부위의 선택은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 작용물질, 초-작용물질, 반전 작용물질, 길항물질, 수용체 결합 조절제, 수용체 활성화 조절제, 다이머 또는 멀티머 형성, 천연 분자와 비교하여 활성화 또는 특성의 변화가 없음, 또는 용해도, 응집 또는 안정성과 같은 폴리펩타이드의 어떤 물리적 또는 화학적 특성의 조작을 포함하는 임의의 원하는 특성 또는 활성을 갖는 펩타이드 분자의 생성을 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 폴리펩타이드의 생물학적 활성화에 필요한 폴리펩타이드 내 위치는 점 돌연변이 분석, 알라닌 스캐닝, 포화 돌연변이유발 및 생물학적 활성을 위한 스크리닝 또는 당업계에 공지된 상동체 스캐닝 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 펩타이드 폴리펩타이드의 변형을 위한 잔기를 확인하는데 사용될 수 있는 다른 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 서열 프로파일링(Bowie and Eisenberg, Science 253(5016): 164-70, (1991)), 로타머 라이브러리 선택(Dahiyat and Mayo, Protein Sci 5(5): 895-903 (1996); Dahiyat and Mayo, Science 278(5335): 82-7 (1997); Desjarlais and Handel, Protein Science 4: 2006-2018(1995); Harbury et al, PNAS USA 92(18): 8408-8412(1995); Kono et al., Proteins: Structure, Function and Genetics 19: 244-255 (1994); Hellinga and Richards, PNAS USA 91: 5803-5807 (1994)); 및 잔기 쌍 포텐셜(Jones, Protein Science 3: 567-574, (1994)), 및 Protein Design Automation(등록상표) 기법을 사용하는 합리적 설계(본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허 제6,188,965호; 제6,269,312호; 제6,403,312호; W098/47089 참조)를 포함한다. 펩타이드 생물활성에 중요한 잔기, 약제학적 안정성에 수반된 잔기, 항체 에피토프 또는 수용체 결합 잔기는 돌연변이될 수 있다. 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제5,580,723호; 제5,834,250호; 제6,013,478호; 제6,428,954호; 및 제6,451,561호는 표적 물질에 의한 폴리펩타이드의 활성화에 영향을 미치는 활성화 도메인을 확인함으로써 펩타이드와 같은 폴리펩타이드의 구조 및 작용의 조직적인 분석 방법을 기재한다. 알라닌 또는 상동체 스캐닝 돌연변이유발에 의해 생물학적 활성화에 중요한 것으로 확인된 것 이외의 잔기는 폴리펩타이드에 대해 추구되는 원하는 활성화에 의존하여 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환을 위한 양호한 후보가 될 수 있다. 대안적으로, 생물학적 활성화에 중요한 것으로 확인된 부위는 또한 폴리펩타이드에 대해 추구되는 원하는 활성화에 의존하여 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환을 위한 양호한 후보가 또한 될 수 있다. 다른 대안은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 갖는 폴리펩타이드 쇄 상의 각각의 위치에서 단순히 연속 치환되도록 하며, 폴리펩타이드 활성화 상의 효과를 관찰한다. 임의의 폴리펩타이드 내 비-천연 아미노산으로 치환을 위한 위치를 선택하는 임의의 수단, 기법 또는 방법은 본 발명에서 사용에 적합하다는 것이 당업자에게 용이하게 인식된다.

[0587]

결실을 함유하는 펩타이드 폴리펩타이드 돌연변이체의 구조 및 활성화는 또한 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 용인할 가능성이 있는 단백질의 영역을 결정하도록 시험될 수 있다. 유사한 방식으로, 프로테아제 분해 및 단클론성 항체는 펩타이드 수용체에 결합을 초래하는 펩타이드의 영역을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환을 용이하지 않을 가능성이 있는 잔기가 일단 제거되면, 각각의 남은 위치에서 제안된 치환의 영향이 시험될 수 있다. 모델은 펩타이드 패밀리 구성원 및 펩타이드 수용체 이외의 3-차원 결정 구조로부터 만들어질 수 있다. Protein Data Bank(PDB, 월드 와이드 웹 상의 rcsb.org에서 입수가가능)는 단백질 및 핵산의 거대 분자의 3-차원 구조 데이터를 함유하는 집중된 데이터베이스이다. 3차 구조 데이터가 이용가능하지 않다면, 폴리펩타이드의 2차 및 3차 구조를 조사하여 모델이 만들어질 수 있다. 따라서, 당업자는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환될 수 있는 아미노산 위치를 용이하게 확인할 수 있다.

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

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

일부 실시형태에서, 본 발명의 릴랙신 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 구조를 파괴하지 않는 단백질의 영역 내에 위치한 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다.

비-자연적으로 암호화된 아미노산 포함의 대표적인 잔기는 잠재적 수용체 결합 영역으로부터 제외된 것일 수 있고, 완전히 또는 부분적으로 노출된 용매일 수 있으며, 근처의 잔기와 수소-결합 상호작용이 최소이거나 또는

전혀 없으며, 근처의 반응 잔기에 최소로 노출될 수 있고, 노출된 면 중 하나 이상에 있을 수 있고, 제2 펄렉신 또는 다른 분자 또는 이들의 단편에 병치된 부위 또는 부위들 일 수 있으며, 수용체에 결합되거나 비결합된, 또는 다른 생물학적으로 활성인 분자에 커플링되거나 또는 커플링되지 않는 3-차원의 2차, 3차 또는 4차 구조에 의해 예측되는 것과 같은 고도로 가요성 또는 구조적으로 강성인 영역일 수 있거나, 또는 원한다면 완전한 구조의 가요성 또는 강성을 변경시킴으로써 펄렉신 그 자체 또는 하나 이상의 펄렉신을 포함하는 다이머 또는 멀티머의 입체구조를 조절할 수 있다.

[0592] 당업자는 펄렉신의 이러한 분석이 단백질의 3차 구조 내에 매몰된 아미노산 잔기와 비교하여 아미노산 잔기가 노출된 표면의 결정을 가능하게 한다는 것을 인식한다. 따라서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 표면 노출된 잔기인 아미노산으로 치환하는 것은 본 발명의 실시형태이다.

[0593] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 펄렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1 앞의 A 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22(즉, 단백질의 카복실 말단에서), 및 이들의 임의의 조합(서열번호 1) 또는 위치 1 앞의 B 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31(서열번호 2).

[0594] 펄렉신의 결정 구조의 시험 및 펄렉신 수용체와 펄렉신의 상호작용은 특정 아미노산 잔기가 용매에 완전히 또는 부분적으로 접근가능한 측쇄를 가진다는 것을 표시할 수 있다. 이들 위치에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄는 단백질 표면으로부터 빗겨갈 수 있고 용매를 벗어날 수 있다.

[0595] 일부 실시형태에서, 이들 위치 중 하나 이상에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다음의 위치를 포함하는 수용성 폴리머에 연결된다: 위치 1 앞의 A 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22(즉, 단백질의 카복실 말단에서), 및 이들의 임의의 조합(서열번호 1) 또는 위치 1 앞의 B 쇠에서(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31(서열번호 2).

[0596] 매우 다양한 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 펄렉신 폴리펩타이드 내 주어진 위치로 치환되거나 또는 포함될 수 있다. 일반적으로, 특정 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 펄렉신 폴리펩타이드 또는 다른 펄렉신 패밀 리 구성원 또는 펄렉신 유사체와 그것의 수용체의 3차원 결정 구조의 시험에 기반한 포함, 보존적 치환에 대한 선호도(즉, Phe, Tyr 또는 Trp로 치환되는 아릴-기반 비-자연적으로 암호화된 아미노산, 예컨대 p-아세틸페닐알라닌 또는 O-프로파길티로신), 및 펄렉신 폴리펩타이드 내로 도입이 원하는 구체적 컨주게이션 화학(예를 들어, 알카인 모이어티를 함유하는 수용성 폴리머에 의한 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 또는 아릴 에스테르를 함유하고, 차례로 포스포인 모이어티를 포함하는 수용성 폴리머에 의한 아마이드 결합 형성을 달성할 것을 원한다면, 4-아지도페닐알라닌의 도입)을 위해 선택된다.

[0597] 한 실시형태에서, 해당 방법은 단백질 내로 비천연 아미노산을 포함시키는 단계(비천연 아미노산은 제1 반응기를 포함함); 및 단백질을 제2 반응기를 포함하는 분자(이에 제한되는 것은 아니지만, 표지, 염료, 폴리머, 수용성 폴리머, 폴리에틸렌 글라이콜의 유도체, 광가교제, 방사성핵종, 세포독성 화합물, 약물, 친화성 표지, 광친화성 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이터, 보조인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 당류, 수용성 덴드리머, 사이클로덱스트린, 억제제 리보핵산, 생체재료, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속-함유 모이어티, 방사성활성 모이어티, 신규 작용기, 다른 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 포토케이지된 모이어티, 화학 방사선 여기 모이어티, 광이성질체화 모이어티, 바이오틴, 바이오틴 유도체, 바이오틴 유사체, 중원자를 포함하는 모이어티, 화학적으로 절단가능한 기, 광절단가능 기, 연장된 측쇄, 탄소-연결 당, 산화환원-활성제, 아미노 티오산, 독성 모이어티, 방사성 표지된 모이어티, 생물물리학적 프로브, 인광성 기, 화학 발광 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 간섭 기, 발색단, 에너지 전달제, 물화적으로 활성인 작용제, 검출가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오타이드, 방사성 트랜스미터, 뉴런-포획제 또는 상기의 임의의 조합, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 제1 반응기는 [3+2] 사이클로첨가를 통해 비천연 아미노산에 분자를 부착시키는 제2 반응기와 반응한다. 한 실시형태에서, 제1 반응기는 알킬닐 또는 아지도 모이어티이며, 제2 반응기는 아지도 또는 알킬닐 모이어티이다. 예를 들어, 제1 반응기는 알킬닐 모이어티(이에 제한되는 것은 아니지만, 비천연 아미노산 p-프로파길옥시페닐알라닌 내)이며 제2 반응기는 아지도 모이어티이다. 다른 예에서, 제1 반응기는 아지도 모이어티(이에 제한되는 것은 아니지만, 비천연 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌 내)이고 제2 반응기는 알킬닐

모이어티이다.

- [0598] 일부 경우에, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 치환(들)은 틸락신 폴리펩타이드 내에서 다른 첨가, 치환 또는 결실과 조합되어 틸락신 폴리펩타이드의 다른 생물학적 특성에 영향을 미칠 것이다. 일부 경우에, 다른 첨가, 치환 또는 결실은 틸락신 폴리펩타이드의 안정성(이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 분해에 저항성)을 증가시킬 수 있거나 또는 틸락신 폴리펩타이드의 그것의 수용체에 대한 친화성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 첨가, 치환 또는 결실은 틸락신 폴리펩타이드의 약제학적 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 첨가, 치환 또는 결실은 틸락신 폴리펩타이드의 항-바이러스 활성을 향상시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 첨가, 치환 또는 결실은 틸락신 폴리펩타이드의 용해도를 증가시킬 수 있다(이에 제한되는 것은 아니지만, 이콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현될 때를 포함). 일부 실시형태에서 첨가, 치환 또는 결실은 이콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현 후 틸락신 폴리펩타이드 용해도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서 이콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현 후 폴리펩타이드 용해도의 증가를 초래하는 비-천연 아미노산의 포함을 위해 다른 부위에 추가로 자연적으로 암호화된 또는 비-천연 아미노산으로 치환을 위한 부위가 선택된다. 일부 실시형태에서, 틸락신 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 수용체, 결합 단백질 또는 관련된 리간드에 대한 친화성을 조절하고, 틸락신 수용체에 결합 후 신호 전달을 조절하며, 순환 반감기를 조절하고, 방출 또는 생체이용 가능성을 조절하며, 정제를 용이하게 하거나 또는 특정 투여 경로를 개선시키거나 또는 변경시키는 다른 첨가, 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸락신 폴리펩타이드는 틸락신 변이체의 그것의 수용체에 대한 친화도를 증가시키는 첨가, 치환 또는 결실을 포함한다. 유사하게, 틸락신 폴리펩타이드는 화학적 또는 효소 절단 서열, 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체-결합 도메인(이에 제한되는 것은 아니지만, FLAG 또는 폴리-His) 또는 다른 친화성 기반 서열(이에 제한되는 것은 아니지만, FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함) 또는 결실을 개선시키는(이에 제한되는 것은 아니지만, GFP를 포함) 연결된 분자(이에 제한되는 것은 아니지만, 바이오틴을 포함), 정제, 조질 또는 세포막을 통한 수송, 프로드러그 방출 또는 활성화, 틸락신 크기 감소 또는 폴리펩타이드의 다른 특성을 포함할 수 있다.
- [0599] 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 치환은 틸락신 길항물질을 만든다. 일부 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 수용체 결합과 함께 수반된 영역에서 치환되거나 또는 첨가된다. 일부 실시형태에서, 틸락신 길항물질은 길항물질로서 작용하는 틸락신을 야기하는 적어도 하나의 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 틸락신 길항물질은 틸락신 분자의 수용체 결합 영역 내에 존재 하는 수용성 폴리머에 연결된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다.
- [0600] 일부 경우에, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 초과 아미노산은 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다. 일부 경우에, 틸락신 폴리펩타이드는 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 자연적으로-발생하는 아미노산으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 초과 치환을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 틸락신 내 하나 이상의 잔기는 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다. 일부 경우에, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 잔기는 하나 이상의 더 낮은 분자량의 선형 또는 분지형 PEG에 연결됨으로써, 단일의, 더 높은 분자량의 PEG에 부착된 종에 대해 결합 친화도 및 상당한 혈청 반감기가 향상된다.
- [0601] 일부 실시형태에서, 틸락신의 다음의 잔기 중 2개까지 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다.
- [0602] **비-진핵생물 및 진핵생물 내 발현**
- [0603] 클로닝된 틸락신 폴리뉴클레오타이드의 높은 수준의 발현을 얻기 위하여, 전사, 전사/번역 종결자를 지시하는 강한 프로모터를 함유하는 발현 벡터 내로 본 발명의 틸락신 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 단백질을 암호화하는 핵산에 대해서는 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위를 전형적으로 서브클로닝한다. 적합한 박테리아 프로모터는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook et al. and Ausubel et al.]에 기재되어 있다.
- [0604] 본 발명의 틸락신 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 박테리아 발현 시스템은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 이콜라이, 바실러스 스테아로써모필루스, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 푸티다 및 살모넬라(Salmonella)가 이용가능하다(Palva et al., Gene 22:229-235 (1983); Mosbach et al., Nature 302:543-545 (1983)). 이러한 발현 시스템을 위한 키트는 상업적으로 입수가능하다. 포유류 세포, 효모 및 곤충 세포에 대한 진핵 발현 시스템은 당업자에게 공지되어 있으며, 또한 상업적으로 입수가능하다. 직교 tRNAs 및 아미노아실 tRNA 신시타제(상기 기재)가 사용되어 본 발명의 틸락신 폴리펩타이드를 발현시키는 경우, 발현을

위한 숙주세포는 직교 성분을 사용하는 그것의 능력을 기반으로 선택된다. 대표적인 숙주 세포는 그램-양성 박테리아(바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 또는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*))를 포함) 및 그램-음성 박테리아(이콜라이, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 푸티다)뿐만 아니라 효모 및 다른 진핵세포를 포함한다. O-tRNA/O-RS 쌍을 포함하는 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0605] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비-진핵 숙주 세포는 매우 유용한 양으로 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 합성하는 능력을 제공한다. 한 양태에서, 조성물은 비천연 아미노산을 포함하는 단백질의, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 10 마이크로그램, 적어도 50 마이크로그램, 적어도 75 마이크로그램, 적어도 100 마이크로그램, 적어도 200 마이크로그램, 적어도 250 마이크로그램, 적어도 500 마이크로그램, 적어도 1 밀리그램, 적어도 10 밀리그램, 적어도 100 밀리그램, 적어도 1 그램 또는 초과, 또는 생체내 단백질 생성 방법과 함께 달성될 수 있는 양을 포함한다(상세한 재조합 단백질 생성 및 정제가 본 명세서에 제공된다). 다른 양태에서, 단백질은 선택적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 리터 당 적어도 10 마이크로 그램의 단백질, 리터 당 적어도 50 마이크로그램의 단백질, 리터 당 적어도 75 마이크로 그램의 단백질, 리터 당 적어도 100 마이크로그램의 단백질, 리터 당 적어도 200 마이크로그램의 단백질, 리터 당 적어도 250 마이크로그램의 단백질, 리터 당 적어도 500 마이크로그램의 단백질, 리터 당 적어도 1 밀리그램의 단백질, 또는 리터 당 적어도 10 밀리그램의 단백질 또는 초과를 포함하는 농도로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 용해질, 완충제, 약제학적 완충제 또는 다른 약제 현탁액(이에 제한되는 것은 아니지만, 약 1nℓ 내지 약 100ℓ 또는 초과의 용적) 중에서 존재한다. 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 진핵 세포 내 단백질의 대량 생성(이에 제한되는 것은 아니지만, 시험관내 번역을 포함하는 다른 방법에 의해 전형적으로 가능한 것을 초과)은 본 발명의 특징이다.

[0606] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비-진핵 숙주 세포는 대량의 유용한 양으로 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 생합성하는 능력을 제공한다. 예를 들어, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은 세포 추출물, 세포 용해질, 배양배지, 완충제 등 내에서, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 10μg/리터, 적어도 50μg/리터, 적어도 75μg/리터, 적어도 100μg/리터, 적어도 200μg/리터, 적어도 250μg/리터 또는 적어도 500μg/리터, 적어도 1mg/리터, 적어도 2mg/리터, 적어도 3mg/리터, 적어도 4mg/리터, 적어도 5mg/리터, 적어도 6mg/리터, 적어도 7mg/리터, 적어도 8mg/리터, 적어도 9mg/리터, 적어도 10mg/리터, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900mg/리터, 1g/리터, 5g/리터, 10g/리터 또는 초과의 단백질을 포함하는 농도로 생성될 수 있다.

[0607] 림팩신의 발현에 적합한 다수의 벡터는 상업적으로 입수가 가능하다. 진핵 숙주를 위한 유용한 발현 벡터는, 이에 제한되는 것은 아니지만, SV40, 소유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 거대세포 바이러스로부터 발현 제어 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 이러한 벡터는 pCDNA3.1(+)\Hyg(미국 캘리포니아주 칼스베드에 소재한 Invitrogen) 및 pCI-neo(미국 캘리포니아주 라호이아에 소재한 Stratagene)를 포함한다. 박테리아 플라스미드, 예컨대 pBR322, pET3a 및 pET12a를 포함하는 이콜라이로부터의 플라스미드, RP4와 같은 더 넓은 숙주 범위 플라스미드, 파지 DNA, 예를 들어 파지 람다의 수많은 유도체, 예를 들어 NM989 및 M13 및 섬질 단일 가닥 DNA 파지와 같은 다른 DNA 파지가 사용될 수 있다. 2μ 플라스미드 및 이것의 유도체, POT1 벡터(참조로서 포함되는 미국특허 제4,931,373호), (Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202 207, 1996)에 기재된 pJS037 벡터 및 pPICZ A, B 또는 C(Invitrogen)는 효모 숙주 세포와 함께 사용될 수 있다. 곤충 세포에 대해, 벡터는, 이에 제한되는 것은 아니지만, pVL941, pBG311(Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685 98 (1986), pBluebac 4.5 및 pMelbac(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 Invitrogen)을 포함한다.

[0608] 림팩신 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 또한 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함할 수도 있고 또는 포함하지 않을 수도 있다. 폴리펩타이드가 그것이 발현된 세포로부터 분비될 때 신호 펩타이드가 존재한다. 이러한 단일 펩타이드는 임의의 서열일 수 있다. 단일 펩타이드는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 문헌[Coloma, M(1992) J. Imm. Methods 152:89 104]]는 포유류 세포 내 사용을 위한 단일 펩타이드(뮤린 Ig 카파 경쇄 단일 펩타이드)를 기재한다. 다른 신호 펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 사카로마이세스 세레비시애로부터의 α-인자 신호 펩타이드(본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제4,870,008호), 마우스 침 아밀라제의 신호 펩타이드(O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), 변형된 카복시펩티다제 신호 펩타이드(L. A. Vails et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), 효모 BARI 신호 펩타이드(본 명세서에 참조로서 포함된 WO 87/02670) 및 효모 아스파르트 프로테아제 3(yeast aspartic protease 3, YAP3) 신호 펩타이드(문헌[M. Egel-Mitani et al., Yeast 6,1990, pp. 127-137] 참조)를 포함한다.

- [0609] 적합한 포유류 숙주 세포의 예는 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 숙주 세포 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포(예를 들어, CHO-K1; ATCC CCL-61), 녹색 원숭이 세포(Green Monkey cell, COS)(예를 들어, COS 1(ATCC CRL-1650), COS 7(ATCC CRL-1651)); 마우스 세포(예를 들어, NS/O), 새끼 햄스터 신장(Baby Hamster Kidney, BHK) 세포주(예를 들어, ATCC CRL-1632 또는 ATCC CCL-10), 및 인간 세포(예를 들어, HEK 293(ATCC CRL-1573))뿐만 아니라 조직 배양물 내 식물 세포 일 수 있다. 이들 세포주 및 다른 것은 메틸렌드주 락스빌에 소재한 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection)와 같은 공공 기탁기관으로부터 입수 가능하다. 릴렉신 폴리펩타이드의 개선된 글라이코실화를 제공하기 위하여, 포유류 숙주 세포는, 예를 들어 본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제5,047,335호에 기재된 것과 같은 시알릴트랜스퍼라제, 예를 들어 1,6-시알릴트랜스퍼라제를 발현하도록 변형될 수 있다.
- [0610] 포유류 숙주 세포 내로 외인성 DNA의 도입 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 인산 칼슘-매개 트랜스펙션, 전기천공법, DEAE-텍스트란 매개 트랜스펙션, 리포솜-매개 트랜스펙션, 바이러스 벡터 및 문헌[Life Technologies Ltd, Paisley, UK using Lipofectamin 2000 and Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA using FuGENE 6. These methods are well known in the art and are described by Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA]에 기재된 트랜스펙션 방법을 포함한다. 포유류 세포의 배양은 예를 들어 (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA and Harrison Mass. and Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997)에 개시된 것과 같은 확립된 방법에 따라서 수행될 수 있다.
- [0611] **발현 시스템, 배양물 및 분리**
- [0612] 릴렉신 폴리펩타이드는, 예를 들어 효모, 곤충 세포, 포유류 세포 및 박테리아를 포함하는 임의의 수의 적합한 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 대표적인 발현 시스템의 기재는 이하에 제공된다.
- [0613] **효모** 본 명세서에 사용되는 용어 "효모"는 릴렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 발현시킬 수 있는 임의의 다양한 효모를 포함한다. 이러한 효모는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 자낭포자효모(엔도마이세탈레스(*Endomycetales*)), 담자균효모(basidiosporogenous) 및 불완전균류(*Fungi imperfecti*)(블라스토마이세테스(*Blastomycetes*)) 기에 속하는 효모를 포함한다. 자낭포자효모는 2가지의 과, 자낭포자효모과(*Speromphthoraceae*)와 효모균과(*Saccharomycetaceae*)로 나뉘어진다. 후자는 4개의 서브패밀리, 스킴조사카로마이코이테아에(*Schizosaccharomycoidae*)(예를 들어 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 속), 나드소니오이테아에(*Nadsonioideae*), 림포마이코이테아에(*Lipomycoideae*) 및 사카로마이코이테아에(*Saccharomycoidae*)(예를 들어 피키아속(*Pichia*), 클루이베로마이세스속(*Kluyveromyce*) 및 사카로마이세스속(*Saccharomyces*))으로 구성된다. 담자균효모는 류코스포리디움속(*Leucosporidium*), 로도스포리디움속(*Rhodosporidium*), 스포리디오볼루스속(*Sporidiobolus*), 필로바시디움(*Filobasidium*) 및 필로바시디엘라속(*Filobasidiella*)을 포함한다. 불완전균류(블라스토마이세스) 군에 속하는 효모는 2가지의 과, 사출포자효모(*Sporobolomycetaceae*)(예를 들어 스포로볼로마이세스(*Sporobolomyces*) 및 불레라속(*Bullera*)) 및 크립토코카세아에(*Cryptococcaceae*)(예를 들어, 칸디다속(*Candida*))으로 나뉘어진다.
- [0614] 이에 제한되는 것은 아니지만, 피키아 파스토리스, 피키아 구일러리몬디(*P. guillerimondii*), 사카로마이세스 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스베르겐시스(*S. carlsbergensis*), 사카로마이세스 디아스타티쿠스(*S. diastaticus*), 스피라이아 도우글라시이(*S. douglasii*), 사카로마이세스 클루이베리(*S. kluyveri*), 사카로마이세스 노르벤시스(*S. norbensis*), 사카로마이세스 오비포미스(*S. oviformis*), 클루이베로마이세스 락티스(*K. lactis*), 클루이베로마이세스 프라질리스(*K. fragilis*), 칸디다 알비칸스(*C. albicans*), 칸디다 말토사(*C. maltosa*) 및 한세놀라 폴리모르파(*H. polymorpha*)를 포함하는, 피키아, 클루이베로마이세스 속 및 사카로마이세스 속, 스킴조사카로마이세스 속, 한세놀라속(*Hansenula*), 토룰롭시스속 및 칸디다속의 종에 본 발명과 함께 사용을 위한 특정 관심이 있다.
- [0615] 릴렉신 폴리펩타이드의 발현을 위한 적합한 효모의 선택은 당업자의 능력 내에 있다. 발현을 위한 숙주 세포의 선택에서, 적합한 숙주는, 예를 들어 양호한 분비 능력, 낮은 단백질 분해 활성, 양호한 분비 능력, 양호한 가용성 단백질 생성 및 전반적인 강건성을 갖는 것으로 나타난 것을 포함할 수 있다. 효모는 일반적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California(캘리포니아주 버클리에 소재) 및 미국 미생물 보존센터("ATCC")(버니지아주 머내서스에 소재)를 포함하는 다수의 공급원으로부터 입수가능하다.

- [0616] 용어 "효모 숙주" 또는 "효모 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 전달 DNA에 대한 수용체로 사용될 수 있거나 또는 수용체였던 효모를 포함한다. 해당 용어는 재조합 벡터 또는 다른 전달 DNA를 수용한 본래 효모 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모 세포의 자손은 우연한 또는 고의적인 돌연변이에 기인하여 본래의 모체에 대해 형태적으로 또는 유전적으로 또는 전체 DNA 보체가 필수적으로 완전히 동일할 필요는 없다. 텔렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 존재와 같은 적절한 특성에 의해 특징지어지는 모체와 충분히 유사한 모 세포의 자손은 본 정의에 의해 의도되는 자손에 포함된다.
- [0617] 염색체 밖 레플리콘 또는 통합 벡터를 포함하는 발현 및 형질변환 벡터는 다수의 효모 숙주 내로 형질변환을 위해 개발되었다. 예를 들어, 발현 벡터는 사카로마이세스 세레비시아에 대해(Sikorski et al., GENETICS (1989) 122:19; Ito et al., J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); 칸디다 알비칸스에 대해(Kurtz et al., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); 칸디다 말토사에 대해(Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 한세놀라 폴리모파에 대해(Gleeson et al, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al, MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); 클루이베로마이세스 프라질리스에 대해(Das et al., J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); 클루이베로마이세스 락티스에 대해(De Louvencourt et al., J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg et al, BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); 피키아 구일러리몬디에 대해(Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); 피키아 파스토리스(*P. pastoris*)에 대해(미국특허 제5,324,639호; 제4,929,555호; 및 제4,837,148호; 문헌[Cregg et al, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376]); 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)에 대해(Beach et al, NATURE (1982) 300:706); 및 야로이아 리폴리티카(*Y. lipolytica*)에 대해; 아스페질러스 니둘란스(*A. nidulans*)(Ballance et al, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn et al, GENE (1983) 26:205-221; 및 Yelton et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); 아스페질러스 니거(*A. niger*)에 대해(Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); 트리코데마 리세이(*T. reesia*)에 대해(EP 0 244 234); 및 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움과 같은 섬질 진균(WO 91/00357)에 대해 개발되었으며, 각각의 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0618] 효모 벡터에 대한 대조군 서열은 당업계자에게 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 유전자로부터의 프로모터 영역, 예컨대 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH) (EP 0 284 044); 엔올라제; 글루코키나제; 글루코스-6-포스페이트 아이소머라제; 글라이세르알데하이드-3-포스페이트-탈수소효소(GAP 또는 GAPDH); 헥소키나제; 포스포 프럭토키나제; 3-포스포글라이세레이트 뮤타제; 및 파이루베이트 키나제(PyK)(EP 0 329 203)를 포함한다. 산 포스파타제를 암호화하는 효모 PH05 유전자는 또한 유용한 프로모터 서열을 제공한다(Miyahara et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). 효모 숙주와 함께 사용을 위한 다른 적합한 프로모터 서열은 3-포스포글라이세레이트 키나제(Hitzeman et al., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073); 및 다른 글라이콜 효소, 예컨대 파이루베이트 탈수소효소, 트라이오세포스페이트 아이소머라제 및 포스포글루코스 아이소머라제에 대한 프로모터를 포함할 수 있다(Holland et al., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess et al., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가적인 이점을 갖는 유도성 효모 프로모터는 알코올 탈수소효소 2로부터의 프로모터 영역; 아이소사이토크롬 C; 산 포스파타제; 메탈로티오네인; 글라이세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소; 질소 대사와 관련된 분해성 효소; 및 말토스 및 갈락토스 이용을 조절하는 효소를 포함할 수 있다. 효모 발현을 위한 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 0 073 657에 추가로 기재되어 있다.
- [0619] 효모 인핸서는 또한 효모 프로모터와 함께 사용될 수 있다. 추가로, 합성 프로모터는 또한 효모 프로모터로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 효모 프로모터의 상류 활성화 서열(upstream activating sequences; UAS)은 다른 효모 프로모터의 전사 활성화 영역과 결합되어 합성 혼성 프로모터를 만들 수 있다. 이러한 혼성 프로모터의 예는 GAP 전사 활성화 영역에 연결된 ADH 조절 서열을 포함한다. 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제 4,880,734호 및 제4,876,197호를 참조한다. 혼성 프로모터의 다른 예는 ADH2, GAL4, GAL10 또는 PH05 유전자의 조절 서열로 이루어지고 GAP 또는 PyK와 같은 글라이콜 효소 유전자의 전사 활성화 영역과 조합된 프로모터를 포함한다. EP 0 164 556을 참조한다. 더 나아가, 효모 프로모터는 효모 RNA 폴리머라제와 결합하고 전사를 개시하는 능력을 갖는 비-효모 기원의 자연적으로 발생하는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0620] 효소 발현 벡터의 부분을 포함할 수 있는 다른 제어 요소는 종결자, 예를 들어 GAPDH 또는 엔올라제 유전자로부터의 종결자를 포함한다(Holland et al, J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385). 추가로, 2 μ 플라스미드 기원으로부터의 복제 원점은 효모에 적합하다. 효모에서 사용을 위한 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 내에 존재하는 trp1 유전자이다. 문헌[Tschumper et al., GENE (1980) 10:157; Kingsman et al., GENE (1979) 7:141]을

참조한다. trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 없는 효모의 돌연변이체 균주에 대한 선택 마커를 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효소 균주(ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 함유하는 공지된 플라스미드에 의해 고려된다.

[0621] 효모 숙주 내로 외인성 DNA를 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 스페로플라스트의 형질변환 또는 알칼리 양이온으로 처리된 무결합 효모 숙주 세포의 형질변환 중 하나를 전형적으로 포함한다. 예를 들어, 효모의 형질변환은 문헌[Hsiao et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829] 및 [Van Solingen et al., J. BACT. (1977) 130:946]에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다. 그러나 세포 내에 DNA를 도입하기 위한 다른 방법, 예컨대 핵 주입, 전기천공법 또는 원형질체 융합이 또한 문헌[SAMBROOK ET AL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001)]에서 일반적으로 기재되는 것과 같이 사용될 수 있다. 그 다음에 효모 숙주 세포는 당업자에게 공지된 표준 기법을 사용하여 배양될 수 있다.

[0622] 효모 숙주 세포 내 이중성 단백질을 발현시키는 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 일반적으로 미국특허 공개 20020055169호, 미국특허 제6,361,969호; 제6,312,923호; 제6,183,985호; 제6,083,723호; 제6,017,731호; 제5,674,706호; 제5,629,203호; 제5,602,034호; 및 제5,089,398호; 미국 재심사 특허 RE37,343 및 RE35,749; 국제특허출원 공개번호 WO 99/07862; WO 98/37208; 및 WO 98/26080; 유럽특허출원 EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; 및 EP 0 164 556를 참조한다. 또한 문헌[Gellissen et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos et al., YEAST(1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7]을 참조하며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0623] 효모 숙주 균주는 당업자에게 공지된 표준 공급물 배치(batch) 발효방법을 사용하여 증폭 단계 동안 발효기 내에서 성장될 수 있다. 발효 방법은 특정 효모 숙주의 탄소 이용 경로 또는 발현 제어 방식에서 차이를 설명하기에 적합할 수 있다. 예를 들어, 사카로마이세스 효모 숙주의 발현은 단일 글루코스 공급물, 복합 질소 공급원(예를 들어, 카세인 가수분해물) 및 다양한 비타민 공급물을 필요로 할 수 있다. 대조적으로, 메탄 영양성(methylotrophic) 효모 피키아 파스토리스는 글라이세롤, 메탄올 및 미량의 무기염 공급물을 필요로 할 수 있지만, 최적의 성장 및 발현을 위해 간단한 암모늄(질소) 염만을 필요로 한다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제5,324,639호; 문헌[Elliott et al., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95]; 및 [Fieschko et al., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113]을 참조한다.

[0624] 그러나 이러한 발현 방법은 사용된 효모 숙주 균주에 독립적인 특성의 보통의 특징을 가질 수 있다. 예를 들어, 성장 제한 영양소, 전형적으로 탄소는 최대 성장을 허용하는 증폭 단계 동안 발효기에 첨가될 수 있다. 추가로, 발효 방법은 일반적으로 탄소, 질소, 기본적 염, 인 및 다른 부수적 영양분(비타민, 미량 무기염 및 염 등)의 적절한 양을 함유하도록 설계된 발효 배지를 사용한다. 피키아와 함께 사용에 적합한 발효 배지의 예는 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제5,324,639호 및 제5,231,178호에 기재되어 있다.

[0625] **바큘로바이러스-감염 곤충 세포** 용어 "곤충 숙주" 또는 "곤충 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 전달 DNA에 대한 수용자로서 사용될 수 있거나 또는 사용된 곤충을 지칭한다. 해당 용어는 트랜스펙션된 본래의 곤충 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모 세포의 자손은 우연적 또는 고의적 돌연변이에 기인하여 형태적으로 또는 유전적으로 또는 전체 DNA 보체가 필수적으로 완전히 동일할 필요는 없다. 릴렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 존재와 같은 적절한 특성에 의해 특징지어지는 모체와 충분히 유사한 모 세포의 자손은 본 정의에 의해 의도되는 자손에 포함된다. 릴렉신 폴리펩타이드의 바큘로바이러스 발현은 본 발명에서 및 rDNA 기법, 폴리펩타이드 또는 이것의 전구체의 사용에서 유용한데, 릴렉신이 박테리아, 포유류 세포, 곤충 세포, 효모 또는 진균을 포함하는 임의의 수의 숙주세포에서 생합성될 수 있기 때문이다. 본 발명의 실시형태는 박테리아, 효모 또는 포유류 세포 내 릴렉신, 변형된 릴렉신, 릴렉신 폴리펩타이드 또는 릴렉신 유사체의 생합성을 포함한다. 본 발명의 다른 실시형태는 이콜라이 또는 효모에서 행해진 생합성을 수반한다. 포유류 세포 및 유전자 이식 동물에서 생합성의 예는 문헌 Hakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69, (1997)]에 기재되어 있다.

[0626] 릴렉신 폴리펩타이드의 발현을 위한 적합한 곤충 세포의 선택은 당업자에게 공지되어 있다. 몇몇 곤충 종은 당업계에서 잘 설명되며, 이집트 숲모기(*Aedes aegypti*), 누에(*Bombyx mori*) 초파리(*Drosophila melanogaster*), 도둑나방(*Spodoptera frugiperda*) 및 양배추은무늬밤나방(*Trichoplusia ni*)을 포함하여 상업적으로 입수가능하다. 발현을 위한 곤충 숙주의 선택에서, 적합한 숙주는 특히 양호한 선택 능력, 낮은 단백질 분해 활성 및 전반적인 강건성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 곤충은 일반적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, Insect Genetic

Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California(캘리포니아주 버클리에 소재) 및 미국 미생물 보존센터("ATCC")(버니지아주 머내서스에 소재)를 포함하는 다수의 공급원으로부터 입수가가능하다.

[0627] 일반적으로, 바큇로바이러스-감염 곤충 발현 시스템의 성분은 바큇로바이러스 게놈의 단편과 발현되는 이중성 유전자의 삽입을 위한 편리한 제한 부위를 둘 다 함유하는 보통 박테리아 플라스미드인 전달 벡터; 전달 벡터에서 바큇로바이러스-특이적 단편에 상동성인 서열을 갖는 야생형 바큇로바이러스(이는 바큇로바이러스 게놈으로 이중성 유전자의 상동성 재조합을 허용함); 및 적절한 곤충 숙주 세포 및 성장 배지를 포함한다. 벡터를 구성하고, 세포를 트랜스펙션하며, 플라그를 채집하고, 배양물 내 세포를 성장시키는 것 등에 사용되는 재료, 방법 및 기법은 당업계에 공지되어 있으며, 이들 기법을 설명하는 매뉴얼이 이용가능하다.

[0628] 전달 벡터 내에 이중성 유전자를 삽입한 후, 벡터 및 야생형 바이러스 게놈은 곤충 숙주 세포 내로 트랜스펙션되며, 벡터 및 바이러스 게놈은 재조합된다. 패키징된 재조합 바이러스가 발현되며, 재조합 플라그가 확인되고 정제된다. 바큇로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 위한 재료 및 방법은, 예를 들어 Invitrogen Corp.(캘리포니아주 칼스베드에 소재)제의 키트에서 상업적으로 입수가가능하다. 이들 기법은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있으며, 본 명세서에 참조로서 포함되는 문헌[SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)]에 충분히 기재되어 있다. 또한 문헌[RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); 및 O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]을 참조한다.

[0629] 게다가, 바큇로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 사용하는 다양한 이중성 단백질의 생성은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어 미국특허 제6,368,825호; 제6,342,216호; 제6,338,846호; 제6,261,805호; 제6,245,528호; 제6,225,060호; 제6,183,987호; 제6,168,932호; 제6,126,944호; 제6,096,304호; 제6,013,433호; 제5,965,393호; 제5,939,285호; 제5,891,676호; 제5,871,986호; 제5,861,279호; 제5,858,368호; 제5,843,733호; 제5,762,939호; 제5,753,220호; 제5,605,827호; 제5,583,023호; 제5,571,709호; 제5,516,657호; 제5,290,686호; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082를 참조하며, 이들은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0630] 바큇로바이러스/곤충 세포 발현 시스템에서 유용한 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 헬퍼-독립적, 바이러스 발현 벡터인 바큇로바이러스 오토그래프 캘리포니아 핵다면체 바이러스(Autographacalifomica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV)로부터 유래된 곤충 발현 및 전달 벡터를 포함한다. 이 시스템으로부터 유래된 바이러스 발현 벡터는 이중성 유전자의 발현을 구동하는 강한 바이러스 폴리헤드린 유전자 프로모터를 보통 사용한다. 일반적으로 문헌[O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]을 참조한다.

[0631] 바큇로바이러스 게놈 내로 외래 유전자를 삽입하기 전에, 프로모터, 리더(원한다면), 관심의 암호화 서열 및 전사 종결 서열을 포함하는 상기 기재한 성분은 전형적으로 중간체 전위 구성체(전달 벡터) 내로 조립된다. 중간체 전위 구성체는 종종 박테리아와 같은 숙주 내에서 안정하게 유지될 수 있는 추가 염색체 요소(예를 들어, 플라스미드)와 같은 레플리콘 내에 유지된다. 레플리콘은 복제 시스템을 가질 것이며, 따라서 클로닝 및 증폭을 위한 적합한 숙주 내에서 유지되도록 한다. 더 구체적으로는, 플라스미드는 폴리헤드린 폴리아데닐화 신호(Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) 및 원핵 암피실린-저항성(amp) 유전자 및 이콜라이 내 선택 및 전파를 위한 복제 원점을 함유할 수 있다.

[0632] AcNPV 내로 외래 유전자를 도입하기 위해 보통 사용되는 전달 벡터는 pAc373이다. 당업자에게 공지된 다수의 다른 벡터는 또한 ATG에서 ATT로 폴리헤드린 출발 코돈을 변경하고, ATT로부터 하류의 BamHI 클로닝 부위 32 염기 쌍을 도입하는 pVL985을 포함하여 설계되었다. 문헌[Luckow and Summers, VIROLOGY 170:31 (1989)]을 참조한다. 다른 상업적으로 입수가가능한 벡터는, 예를 들어 PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 Invitrogen Corp.)를 포함한다.

[0633] 이중성 유전자의 삽입 후, 전달 벡터 및 야생형 바큇로바이러스 게놈은 곤충 세포 숙주 내로 공동 트랜스펙션된다. 바큇로바이러스 바이러스 내 원하는 부위 내로 이중성 DNA를 도입하기 위한 방법은 당업계에 공지되어

있다. 문헌[SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 170:31]을 참조한다. 예를 들어, 이중성 이중 크로스오버 재조합에 의해 폴리헤드린 유전자와 같은 유전자 내로 삽입될 수 있고; 또한 원하는 바콜로바이러스 유전자 내로 유전자조작된 제한 효소 부위 내로 삽입될 수 있다. 문헌[Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91]을 참조한다.

[0634] 트랜스펙션은 전기천공법에 의해 수행될 수 있다. 문헌[TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501]을 참조한다. 대안적으로, 리포솜은 재조합 발현 벡터 및 바콜로바이러스로 곤충 세포를 트랜스펙션시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 문헌[Liebman et al., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves et al., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura et al., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570; Schmidt et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert et al, NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS ET AL., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai et al., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin et al., NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost et al, GENE (1997) 190:139; Jakobsson et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley et al, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk et al, J. VIROL. (1994) 68(2):766; 및 Peng et al, BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274]을 참조한다. 상업적으로 입수가능한 리포솜은, 예를 들어 Cellfectin(등록상표) 및 Lipofectin(등록상표)(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 Invitrogen, Corp.)을 포함한다. 추가로, 인산칼슘 트랜스펙션이 사용될 수 있다. 문헌[TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; 및 Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501]을 참조한다.

[0635] 바콜로바이러스 발현 벡터는 보통 바콜로바이러스 프로모터를 함유한다. 바콜로바이러스 프로모터는 바콜로바이러스 RNA 폴리머라제와 결합할 수 있고 mRNA 내에 암호화 서열(예를 들어 구조적 유전자)의 하류의(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 암호화 서열의 5' 말단의 근처에 보통 위치된 전사 개시 영역을 가질 것이다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 폴리머라제 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 바콜로바이러스 프로모터는 또한 존재한다면 보통 구조적 유전자 말단에 있는, 인핸서로 불리는 제2 도메인을 가질 수 있다. 게다가, 발현은 조절되거나 또는 구성적일 수 있다.

[0636] 감염 주기의 늦은 시간에 풍부하게 전사되는 구조적 유전자는 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 예는 바콜로바이러스 폴리헤드론 단백질질을 암호화하는 유전자로부터 유래된 서열(FRIESEN ET AL, *The Regulation of Baculovirus Gene Expression in* THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839 및 0 155 476) 및 p10 단백질을 암호화하는 유전자(Vlak et al, J. GEN. VIROL. (1988) 69:765)을 포함한다.

[0637] 새로 형성된 바콜로바이러스 발현 벡터는 감염성 재조합 바콜로바이러스 내로 패키징되며, 이후에 성장된 플라그는 당업자에게 공지된 기법에 의해 정제될 수 있다. 문헌[Miller et al, BIOESSAYS (1989)11(4):91; SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)]을 참조한다.

[0638] 재조합 바콜로바이러스 발현 벡터는 몇몇 곤충 세포 내로 감염을 위해 개발되었다. 예를 들어, 재조합 바콜로바이러스는 특히, 이집트 숲모기(ATCC No. CCL-125), 누에(ATCC No. CRL-8910), 초파리(ATCC No. 1663), 도둑나방 및 양배추은무늬밤나방에 대해 개발되었다. 문헌[Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell et al., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156]을 참조한다. 일반적으로 문헌[Fraser et al., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225]을 참조한다. 더 구체적으로, 바콜로바이러스 발현 벡터 시스템에 대해 사용되는 세포주는 보통, 이에 제한되는 것은 아니지만, Sf9(도둑나방)(ATCC No, CRL-1711), Sf21(도둑나방)(Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013(캘리포니아주 칼스베드 소재)), Tri-368(양배추은무늬밤나방) 및 High-Five(상표명) BTI-TN-5B1-4(양배추은무늬밤나방)를 포함한다.

[0639] 세포 및 배양배지는 바콜로바이러스/발현 내 이중성 폴리펩타이드의 직접적 발현과 융합 발현 둘 다에 대해 상업적으로 이용가능하며, 세포 배양 기법은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다.

[0640] **이콜라이, 슈도모나스 종 및 다른 원핵생물** 박테리아 발현 기법은 당업자에게 공지되어 있다. 매우 다양한 벡터가 박테리아 숙주에서 사용을 위해 이용가능하다. 벡터는 단일 복제물 또는 낮은 또는 높은 다중복제물 벡터일 수 있다. 벡터는 클로닝 및/또는 발현을 위해 작용할 수 있다. 벡터에 관한 풍부한 문헌, 다수 벡터의 상업적 이용가능성 및 심지어 벡터 및 그것의 제한 맵 및 특징을 기재하는 매뉴얼에 대해, 본 명세서에서 광범위한 논의는 필요하지 않다. 잘 알려진 바와 같이, 벡터는 보통 마커가 세포독성제 저항성, 원형양성(protothrophy) 또

는 면역성을 제공할 수 있는 선택을 허용하는 마커를 수반한다. 빈번하게는, 다수의 마커는 상이한 특징을 제공하도록 존재한다.

[0641] 박테리아 벡터는 박테리아 RNA 폴리머라제와 결합할 수 있고 mRNA 내로 암호화 서열(예를 들어 구조적 유전자)의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 암호화 서열의 5' 말단 근위에 보통 위치된 전사 개시 영역을 가질 것이다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 폴리머라제 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 박테리아 프로모터는 또한 RNA 합성이 개시되는 인접한 RNA 폴리머라제 결합 부위와 중첩될 수 있는 오퍼레이터로 불리는 제2 도메인을 가질 수 있다. 유전자 억제 단백질이 오퍼레이터와 결합할 수 있기 때문에 오퍼레이터는 네거티브 조절된(유도성) 전사를 허용하고, 이에 의해 특이적 유전자의 전사를 억제한다. 구성 발현은 오퍼레이터와 같은 네거티브 조절 요소가 없을 때 일어날 수 있다. 추가로, 포지티브 조절은 존재한다면 RNA 폴리머라제 결합 서열 근위(5')에 있는 유전자 활성화 단백질 결합 서열에 의해 달성될 수 있다. 유전자 활성화 단백질의 예는 이화대사 활성화 단백질(catabolite activator protein, CAP)인데, 이는 에스캐리키아 콜라이(이콜라이) 내 lac 오페론의 전사를 개시하도록 한다[Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. 조절된 발현은 따라서 포지티브 또는 네거티브일 수 있으며, 이에 의해 전사를 향상시키거나 또는 감소시킨다.

[0642] 대사 경로 효소를 암호화하는 서열은 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 예는 당 대사 효소, 예컨대 갈락토스, 락토스(lac)[Chang et al., NATURE (1977) 198:1056] 및 말토스로부터 유래된 프로모터 서열을 포함한다. 추가적인 예는 트립토판(trp)과 같은 생합성 효소로부터 유래된 프로모터 서열을 포함한다[본 명세서에 참조로서 포함된 Goeddel et al., NUC. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton et al., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; 미국특허 제4,738,921호; 유럽 특허 공개 제036 776호 및 제121 775호]. β -갈락토시다제(bla) 프로모터 시스템[Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], 박테리오파지 람다 PL[Shimatake et al., NATURE (1981) 292:128] 및 T5[본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제4,689,406호] 프로모터 시스템은 또한 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법은 T7 프로모터와 같은 강한 프로모터를 이용하여 높은 수준으로 틸렉신 폴리펩타이드를 유발한다. 이러한 벡터의 예는 당업자에게 공지되어 있으며, Novagen제의 pET29 시리즈 및 본 명세서에 참조로서 포함된 W099/05297에 기재된 pPOP 벡터를 포함한다. 이러한 발현 시스템은 숙주 세포 생존력 또는 성장 변수를 해치지 않고 숙주 내 틸렉신 폴리펩타이드의 높은 수준을 생성한다. pET19(Novagen)는 당업자에게 공지된 다른 벡터이다.

[0643] 추가로, 천연에서 생기지 않는 합성 프로모터는 박테리아 프로모터로서 작용한다. 예를 들어, 하나의 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 전사 활성화 서열은 다른 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 오페론 서열과 결합될 수 있으며, 이는 합성 혼성체 프로모터를 만든다[본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제4,551,433호]. 예를 들어, tac 프로모터는 trp 프로모터와 lac 리프레서에 의해 조절되는 lac 오페론 서열을 둘 다 포함하는 혼성체 trp-lac 프로모터이다[Amann et al., GENE (1983) 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. 더 나아가, 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 폴리머라제와 결합하고 전사를 개시하는 능력을 갖는 비-박테리아 기원의 자연적으로 발생하는 프로모터를 포함할 수 있다. 비-박테리아 기원의 자연적으로 발생하는 프로모터는 또한 원핵생물 내 일부 유전자의 높은 발현 수준을 만드는 호환성 RNA 폴리머라제와 커플링될 수 있다. 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제/프로모터 시스템은 커플링된 프로모터 시스템의 예이다[Studier et al., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. 추가로, 혼성 프로모터는 또한 박테리오파지 프로모터 및 이콜라이 오퍼레이터 영역으로 구성될 수 있다(유럽특허 공개 제267 851호).

[0644] 작용성 프로모터 서열에 추가로, 효율적인 리보솜 결합 부위는 또한 원핵생물 내 외래 유전자의 발현에 유용하다. 이콜라이에서, 리보솜 결합 부위는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno, SD) 서열로 불리며, 개시 코돈(ATG) 및 개시 코돈 상류의 3 내지 11개 뉴클레오타이드에 위치된 길이로 서열 3 내지 9개의 뉴클레오타이드를 포함한다[Shine et al., NATURE (1975) 254:34]. SD 서열은 SD 서열과 이콜라이 16S rRNA의 3' 사이의 염기를 짝지음으로써 리보솜에 mRNA 결합을 촉진하는 것으로 생각된다[Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. 약한 리보솜-결합 부위를 갖는 진핵 유전자 및 원핵 유전자를 발현시키는 것[Sambrook et al. "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

[0645] 용어 "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 전달 DNA에 대한 수용자로서 사용될 수 있거나 또는 사용되었다. 해당 용어는 트랜스펙션된 본래의 박테리아 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모세포의 자손은 우연한 또는 고의적인 돌연변이에 기인하여 본래의 모체에 대해 형태적으로 또는 유전적으로 또

는 전체 DNA 보체가 필수적으로 완전히 동일할 필요는 없다. 릴렉신 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 존재와 같은 적절한 특성에 의해 특징지어지는 모체와 충분히 유사한 모 세포의 자손은 본 정의에 의해 의도되는 자손에 포함된다.

[0646] 릴렉신 폴리펩타이드의 발현을 위한 적합한 숙주 박테리아의 선택은 당업자에게 공지되어 있다. 발현을 위한 박테리아 숙주의 선택에서, 적합한 숙주는 특히 양호한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질분해 활성 및 전반적인 강건함을 갖는 것을 나타낸 것을 포함할 수 있다. 박테리아 숙주는, 이에 제한되는 것은 아니지만, Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California(캘리포니아주 버클리 소재) 및 미국 미생물 보존센터("ATCC")(버지니아주 머내서스에 소재)를 포함하는 다수의 공급원으로부터 일반적으로 입수가 가능하다. 산업적/약제학적 발효는 일반적으로 K 균주(예를 들어, W3110)로부터 유래된 박테리아 또는 B 균주(예를 들어, BL21)로부터 유래된 박테리아를 일반적으로 사용한다. 이들 균주는 그것의 성장 변수가 극히 잘 알려져 있고 강건하기 때문에 특히 유용하다. 추가로, 이들 균주는 비-병원성인데, 안전 및 환경적 이유로 상업적으로 중요하다. 적합한 이콜라이 숙주의 다른 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, BL21, DH10B 또는 이들의 유도체의 균주를 포함한다. 본 발명의 방법의 다른 실시형태에서, 이콜라이 숙주는, 이에 제한되는 것은 아니지만, OMP- 및 LON-을 포함하는 프로테아제 마이너스 균주이다. 숙주 세포 균주는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 푸티다를 포함하는 슈도모나스 종일 수 있다. 균주 MB 101로 지정된 슈도모나스 플루오레센스 생물형 1은 재조합 생성에 유용한 것으로 알려져 있으며, 치료적 단백질 생성 과정을 위해 이용가능하다. 슈도모나스 발현 시스템의 예는 숙주 균주로서 The Dow Chemical Company(미시간주 미들랜드 소재, 월드 와이드 웹 상의 dow.com에서 입수가 가능)로부터 입수가 가능한 시스템을 포함한다.

[0647] 일단 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면(즉, 발현 구성체는 숙주 세포 내로 도입되었고, 적절한 발현 구성체를 갖는 숙주 세포가 분리되면), 재조합 숙주 세포 균주는 릴렉신 폴리펩타이드의 생성에 적절한 조건 하에 배양된다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 재조합 숙주 세포 균주의 배양방법은 이용된 발현 구성체의 특성 및 숙주 세포의 동일성에 의존할 것이다. 재조합 숙주 균주는 보통 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 배양된다. 재조합 숙주 세포는 탄소, 질소 및 무기염의 동화가능한 공급원을 함유하고, 선택적으로 비타민, 아미노산, 성장 인자 및 당업자에게 공지된 다른 단백질성 배양 보충물을 함유하는 액체 배지 내에서 전형적으로 배양된다. 숙주 세포의 배양을 위한 액체 배지는 선택적으로 바람직하지 않은 미생물유기체의 성장을 방지하기 위한 항생제 또는 항진균제 및/또는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위해, 이에 제한되는 것은 아니지만, 항생제를 포함하는 화합물을 함유할 수 있다.

[0648] 재조합 숙주 세포는 세포 채취(릴렉신 폴리펩타이드가 세포내로 축적되는 경우에) 또는 배취 또는 연속 판형에서 배양 상청액의 채취에 의해 배취 또는 연속 판형에서 배양될 수 있다. 원핵 숙주 세포에서 생성을 위해, 배취 배양 및 세포 채취가 바람직하다.

[0649] 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드는 재조합 시스템에서 발현 후 보통 정제된다. 릴렉신 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 박테리아 숙주 세포에서 생성된 릴렉신 폴리펩타이드는 불량하게 가용성 또는 불용성일 수 있다(봉입체의 형태에서). 본 발명의 한 실시형태에서, 아미노산 치환은 본 명세서에 개시된 방법뿐만 아니라 당업계에 공지된 것을 이용하여 재조합적으로 생성된 단백질의 용해도를 증가시키는 목적을 위해 선택된 릴렉신 폴리펩타이드에서 용이하게 만들어질 수 있다. 불용성 단백질의 경우에, 단백질은 원심분리에 의해 숙주 세포 용해질로부터 수집될 수 있고, 이후에 추가로 세포는 균질화될 수 있다. 불량하게 가용성인 단백질의 경우에, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌 이민(PEI)을 포함하는 화합물은 부분적으로 가용성인 단백질의 침전을 유발하기 위하여 첨가될 수 있다. 그 다음에 침전된 단백질은 원심분리에 의해 편리하게 수집될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 당업자에게 공지된 다양한 방법을 사용하여 세포 내에서부터 봉입체를 방출시키기 위해 파괴되거나 또는 균질화될 수 있다. 숙주 세포 파괴 또는 균질화는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 효소 세포 파괴, 초음파처리, 돈스(dounce) 균질화 또는 고압 방출 파괴를 포함하는 잘 알려진 기법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 방법의 한 실시형태에서, 고압 방출 기법은 이콜라이 숙주 세포를 파괴하여 릴렉신 폴리펩타이드의 봉입체를 방출시키기 위해 사용된다. 릴렉신 폴리펩타이드의 봉입체를 조작할 때, 초음파처리, 기계적 전단 또는 단백질 분해와 같은 인자에 기인하는 손실 없이 봉입체의 수율을 최대로 하기 위하여 반복되는 균질화 시간을 최소화하는 것이 유리하다.

[0650] 그 다음에 불용성 또는 침전된 릴렉신 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 임의의 다수의 적합한 가용화제를 사용하여 가용화될 수 있다. 릴렉신 폴리펩타이드는 유레아 또는 구아니딘 하이드로클로라이드와 함께 가용화될 수 있다. 가용화된 릴렉신 폴리펩타이드의 용적은 최소화되어야 하며, 따라서 거대 배취는 편리하게 조작가능한 배

취 크기를 사용하여 생성될 수 있다. 이 인자는 제조합 숙주가 수천 리터의 용적인 배취 내에서 성장될 수 있는 경우 대규모 상업적 설정에서 중요할 수 있다. 추가로, 대규모 상업적 설정에서, 특히 인간 약제학적 사용을 위해 릴렉신 폴리펩타이드를 제조할 때, 기구 및 용기를 손상시킬 수 있는 강한 화학물질의 회피 또는 단백질 생성물 그 자체는 가능하다면 회피되어야 한다. 더 온화한 변성제 유레아는 더 강한 변성제 구아니딘 하이드로클로라이드 대신 릴렉신 폴리펩타이드 봉입체를 가용화시키기 위해 사용될 수 있다는 것이 본 발명의 방법에 의해 나타났다. 유레아의 사용은 릴렉신 폴리펩타이드의 제조 및 정제 과정에서 이용된 스테인레스 스틸 기구에 대한 손상 위험을 상당히 감소시키는 한편, 릴렉신 폴리펩타이드 봉입체를 효율적으로 가용화시킨다.

[0651] 가용성 릴렉신 단백질의 경우에, 릴렉신은 주변세포질 공간 내로 또는 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 추가로 가용성 릴렉신은 숙주 세포의 세포질 내에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 전 가용성 릴렉신을 농축시키는 것이 바람직할 수 있다. 당업자에게 공지된 표준 기법은 예를 들어 세포 용해질 또는 배양 배지로부터 가용성 릴렉신을 농축시키기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 당업자에게 공지된 표준 기법은 숙주 세포를 파괴하고 숙주 세포의 세포질 또는 주변세포질 공간으로부터 가용성 릴렉신을 방출시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0652] 릴렉신 폴리펩타이드가 융합 단백질로서 생성될 때, 융합 서열이 제거될 수 있다. 융합 서열의 제거는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 수행될 수 있다. 융합 서열의 효소적 제거는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 융합 서열의 제거를 위한 효소 선택은 융합의 동일성에 의해 결정될 것이며, 반응 조건은 당업자에게 명백한 바와 같은 효소의 선택에 의해 구체화될 것이다. 화학적 절단은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 브롬화시아노겐, TEV 프로테아제 및 다른 시약을 포함하는 당업자에게 공지된 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 절단된 릴렉신 폴리펩타이드는 당업자에게 공지된 방법에 의해 절단된 융합 서열로부터 정제될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 명백한 바와 같이, 융합 서열 및 릴렉신 폴리펩타이드의 동일성 및 특성에 의해 결정될 것이다. 정제 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 크기-배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피 또는 투석 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0653] 릴렉신 폴리펩타이드는 또한 단백질 용액으로부터 DNA를 제거하여 정제될 수 있고, DNA는 침전 또는 이온 교환 크로마토그래피와 같은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제거될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니지만 프로타민 설페이트와 같은 핵산 침전제에 의한 침전에 의해 제거될 수 있다. 릴렉신 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 원심분리 또는 여과를 포함하는 잘 공지된 표준 방법을 사용하여 침전된 DNA로부터 분리될 수 있다. 숙주 핵산 분자의 제거는 릴렉신 폴리펩타이드가 인간을 치료하기 위해 사용되고, 본 발명의 방법이 약제학적으로 허용가능한 수준으로 숙주 세포 DNA를 감소시키는 설정에서 중요한 인자이다.

[0654] 소규모 또는 대규모 발효를 위한 방법은 또한 이에 제한되는 것은 아니지만, 발효기, 진탕 플라스크, 유동층 바이오리액터, 중공섬유 바이오리액터, 회전병 배양 시스템 및 교반 탱크 바이오리액터 시스템을 포함하는 단백질 발현에서 사용될 수 있다. 각각의 이들 방법은 배취, 유가배양 또는 연속 방식 공정에서 수행될 수 있다.

[0655] 본 발명의 인간 릴렉신 폴리펩타이드는 일반적으로 당업계의 표준 방법을 사용하여 회수될 수 있다. 예를 들어, 배양 배지 또는 세포 배양물은 원심분리되거나 또는 여과되어 세포 파편을 제거할 수 있다. 상청액을 원하는 용적으로 농축되거나 또는 희석되거나 또는 추가 정제를 위한 제조를 좌우하는 적합한 완충제 내로 정용여과될 수 있다. 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드의 추가 정제는 곤충 형태로부터 릴렉신 폴리펩타이드 변이체의 탈아미드화되고 클리핑된 형태를 분리하는 단계를 포함한다.

[0656] 다음의 대표적인 과정 중 어떤 것은 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드의 정제를 위해 사용될 수 있다: 친화도 크로마토그래피; 음이온- 또는 양이온-교환 크로마토그래피(이에 제한되는 것은 아니지만, DEAE SEPHAROSE를 사용); 실리카 상의 크로마토그래피; 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC); 역상 HPLC; 겔 여과(이에 제한되는 것은 아니지만, SEPHADEX G-75를 사용); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기-배제 크로마토그래피; 금속-킬레이트 크로마토그래피; 초미세여과/정용여과; 에탄올 침전; 암모늄 설페이트 침전; 크로마토포커싱; 치환 크로마토그래피; 전기영동 과정(이에 제한되는 것은 아니지만 분취 등전 초점화를 포함), 분별 용해도(이에 제한되는 것은 아니지만 암모늄 설페이트 침전을 포함), SDS-PAGE 또는 추출.

[0657] 이에 제한되는 것은 아니지만 비천연 아미노산을 포함하는 단백질, 비천연 아미노산을 포함하는 펩타이드, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 항체, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 결합 상대 등을 포함하는 본 발명의 단백질은 당업자에게 공지되고 사용되는 표준 과정에 따라서 균질성에 대해 부분적으로 또는 실질적으로 정제될 수 있다. 따라서 본 발명의 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 또는 염기 추출, 칼럼 크로마토그래피, 친화성 칼럼 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트

크로마토그래피, 액틴 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업자에게 공지된 다수의 방법 중 어떤 것에 의해 회수되고 정제될 수 있다. 단백질 재폴딩 단계는, 원한다면 정확하게 폴딩된 성숙 단백질을 만드는 것에서 사용될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC), 친화성 크로마토그래피 또는 다른 적합한 방법은 고순도가 원하는 경우 최종 정제 단계에서 사용될 수 있다. 한 실시형태에서, 비천연 아미노산(또는 비천연 아미노산을 포함하는 단백질 또는 펩타이드)에 대해 만들어진 항체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나 이상의 비천연 아미노산(들)을 포함하는 단백질 또는 펩타이드의 친화성-기반 정제를 포함하는 정제 시약으로서 사용된다. 원한다면 균질성에 대해 부분적으로 일단 정제되면, 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 분석 성분, 치료적, 예방적, 진단적, 연구 시약으로서 및/또는 항체 생성을 위한 면역원으로서 매우 다양한 이용성을 위해 선택적으로 사용된다. 본 발명의 폴리펩타이드에 대해 만들어진 항체는 일상적인 프로토콜을 사용하여 동물, 바람직하게는 비-인간 동물에 폴리펩타이드 또는 에피토프-함유 단편 또는 세포를 투여함으로써 얻을 수 있다. 당업자는 다양한 공지된 기법을 사용하여 항체를 생성할 수 있다. 또한, 다른 포유류를 포함하는 유전자 이식 마우스 또는 다른 유기체가 또한 인간화된 항체를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 상기-기재한 항체는 폴리펩타이드를 발현시키는 클론을 분리하거나 또는 확인하기 위해 또는 폴리펩타이드를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 항체는 또한 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0658] 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 또한 백신으로서 사용될 수 있다. 따라서, 추가 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 질병이 개체 내에서 이미 확립되었든 그렇지 않든 상기 동물을 질병으로부터 보호하기 위하여 사이토카인-생성 T 세포 또는 세포독성 T 세포를 포함하는 항체 및/또는 T 세포 면역 반응에 적합한 본 발명의 폴리펩타이드로 포유류를 접종시키는 단계를 포함하는, 포유류에서 면역학적 반응의 유발 방법에 관한 것이다. 포유류 내 면역학적 반응은 또한 본 발명의 질병으로부터 상기 동물을 보호하기 위하여 항체를 생성하는 면역학적 반응을 유발하기 위하여 폴리뉴클레오타이드의 발현을 지시하고 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터를 통해 본 발명의 폴리펩타이드를 전달하는 단계를 포함하는 방법에 의해 유발될 수 있다. 벡터를 투여하는 한 방법은 입자 또는 다른 것 상에서 원하는 세포 내로 코팅으로서 가속화시키는 것에 의한다. 이러한 핵산 벡터는 DNA, RNA, 변형된 핵산 또는 DNA/RNA 혼성체를 포함할 수 있다. 백신으로서 사용을 위해, 폴리펩타이드 또는 핵산 벡터는 백신 조제물(조성물)로서 보통 제공될 것이다. 조제물은 적합한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 위에서 파괴될 수 있기 때문에, 비경구로 투여될 수 있다(예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경피내 주사). 비경구 투여에 적합한 조제물은 항-산화제, 완충제, 세균 발육 저지제 및 수용자의 혈액과 등장성인 조제물을 제공하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액; 현탁제 또는 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 백신 조제물은 또한 당업자에게 공지된 조제물의 면역원성을 향상시키기 위한 애주버트 시스템을 포함할 수 있다. 투약량은 백신의 특이적 활성에 의존할 것이며, 일상적인 실험에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0659] 대안의 시스템 내 발현

[0660] 비-제조함 숙주 세포, 돌연변이유발된 숙주 세포에서 또는 무세포 시스템에서 단백질 내에 비천연 아미노산을 도입하기 위하여 몇몇 전략이 사용되었다. 이들 시스템은 또한 본 발명의 펩타이드의 제조에서 사용에 적합하다. Lys, Cys 및 Tyr과 같은 반응성 측쇄를 갖는 아미노산의 유도체화는 리신의 N²-아세틸-리신으로 변환을 초래하였다. 화학적 합성은 또한 비천연 아미노산을 포함시키기 위한 간단한 방법을 제공한다. 펩타이드 단편의 효소적 결합 및 천연 화학적 합성의 최근의 개발에 의해, 더 큰 단백질의 제조가 가능하다. 예를 들어 문헌[P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000)]을 참조한다. 화학적 펩타이드 결합 및 천연 화학적 결합은 본 명세서에 참조로서 포함된 미국특허 제6,184,344호, 미국 특허 공개 제2004/0138412호, 미국 특허 공개 제2003/0208046호, WO 02/098902 및 WO 03/042235에 기재되어 있다. 원하는 비천연 아미노산에 의해 화학적으로 아실화된 역제자 tRNA가 단백질 생합성을 지지할 수 있는 시험관내 추출물에 첨가되는 일반적인 시험관내 생합성 방법은 사실상 임의의 크기의 다양한 단백질 내로 100개 이상의 비천연 아미노산을 부위-특이적으로 포함시키기 위해 사용되었다. 예를 들어 문헌[V. W. Cornish, D. Mendel and P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C. J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, *Science* 244:182-188 (1989); 및 J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dila, *Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013-8014 (1989)]을 참조한다. 작용기의 넓은 범위는 단백질 안정성, 단백질 폴딩, 효소 메커니즘 및 신호도입의 연구를 위해 단백질 내로 도입되었다.

- [0661] 본 명세서에 주목된 다른 참고문헌에 더하여, 다양한 정제/단백질 폴딩 방법은, 문헌[R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Hams and Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; 및 Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ]; 및 이들이 인용된 참고문헌을 포함하여 당업자에게 공지된 것이다.
- [0662] 진핵 숙주 세포 또는 비-진핵 숙주 세포에서 비천연 아미노산을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드 생성의 한 가지 이점은 전형적으로 단백질 또는 폴리펩타이드가 그것의 천연 입체구조 내에서 폴딩될 것이라는 점이다. 그러나, 본 발명의 특정 실시형태에서, 당업자는 합성, 발현 및/또는 정제 후 단백질 또는 펩타이드가 적절한 폴리펩타이드의 원하는 입체구조와 상이한 입체구조를 소유할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 한 양태에서, 발현된 단백질 또는 폴리펩타이드는 선택적으로 변성된 다음 재생된다. 이는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 관심의 단백질 또는 폴리펩타이드에 샤페로닌을 첨가에 의해, 단백질 다이설파이드 아이소머라제를 이용하여 구아니딘 HCl과 같은 무질서 유발제 chaotropic agent) 중에 단백질을 가용화에 의하는 것을 포함하는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행된다.
- [0663] 일반적으로, 발현된 폴리펩타이드를 변성시키거나 환원시킨 다음 폴리펩타이드가 바람직한 입체 구조로 재폴딩 되도록 야기하는 것이 때때로 바람직하다. 예를 들어, 구아니딘, 유레아, DTT, DTE 및/또는 샤페로닌은 관심의 번역 생성물에 첨가될 수 있다. 단백질을 환원시키거나, 변성시키고, 재생하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다(상기 참고문헌 및 문헌[Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; 및 Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270]을 참조한다). Debinski 등은, 예를 들어 구아니딘-DTE 내 봉입체 단백질의 변성 및 환원을 기재한다. 단백질은, 이에 제한되는 것은 아니지만 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 함유하는 산화환원 완충제 중에서 재폴딩될 수 있다. 재폴딩 시약은 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 다른 발현 생성물, 또는 그 반대로 접촉되도록 유동되거나 또는 다르게 이용될 수 있다.
- [0664] 틸락신 폴리펩타이드의 원핵 생성의 경우에, 이렇게 생성된 틸락신 폴리펩타이드는 미스폴딩될 수 있고, 따라서 생물학적 활성이 결여되거나 또는 감소된 생물학적 활성을 가질 수 있다. 단백질의 생활성은 "재폴딩"에 의해 재저장될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 틸락신 폴리펩타이드는 가용화(틸락신 폴리펩타이드가 또한 불용성인 경우), 예를 들어 하나 이상의 무질서 유발제(예를 들어 유레아 및/또는 구아니딘)를 사용하는 폴리펩타이드쇄의 미폴딩 및 환원 및 이황화 결합을 환원시킬 수 있는 환원제(예를 들어, 다이티오프레이톨, DTT 또는 2-머캅토에탄올, 2-ME)에 의해 재폴딩된다. 무질서 유발제의 적당한 농도에서, 그 다음에 산화제가 첨가되어 이황화 결합을 재형성시킨다. 틸락신 폴리펩타이드는 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제4,511,502호, 제4,511,503호 및 제4,512,922호에 기재되는 것과 같은 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 재폴딩될 수 있다. 틸락신 폴리펩타이드는 또한 다른 단백질과 함께 공동 폴딩되어 헤테로다имер 또는 헤테로멀티머를 형성할 수 있다.
- [0665] 재폴딩 후, 틸락신은 추가로 정제될 수 있다. 틸락신의 정제는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 또는 이들의 조합을 포함하는 당업자에게 공지된 다양한 기법을 사용하여 수행될 수 있다. 추가적인 정제는 또한 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 포함할 수 있다.
- [0666] 정제 후, 틸락신은 상이한 완충제와 교환될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 정용여과 및 투석을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법에 의해 농축될 수 있다. 1회 정제된 단백질로서 사용되는 틸락신은 응집 및 침전이 실시될 수 있다.
- [0667] 정제된 틸락신은 적어도 90% 순수(역상 고성능 액체 크로마토그래피, RP-HPLC 또는 도데실 황산 나트륨-폴리아클리아마이드 겔 전기영동, SDS-PAGE에 의해 측정) 또는 적어도 95% 순수 또는 적어도 98% 순수, 또는 적어도 99% 또는 초과 순수일 수 있다. 틸락신 순도의 정확한 수치에도 불구하고, 틸락신은 약제학적 생성물로서 사용

을 위해 또는 PEG와 같은 수용성 폴리머와 컨주게이션과 같은 추가 과정을 위해 충분히 순수하다.

- [0668] 특정 릴렉신 분자는 다른 활성 성분 또는 단백질(부형제, 담체 및 안정제, 혈청 알부민 등 이외)이 없는 치료제로서 사용될 수 있거나 또는 다른 단백질 또는 폴리머와 복합화될 수 있다.
- [0669] **일반적 정제 방법** 다양한 분리 단계 중 임의의 하나는, 세포 용해질, 추출물, 배양 배지, 봉입체, 숙주 세포의 주변세포질 공간, 숙주 세포의 세포질 또는 릴렉신 폴리펩타이드를 포함하는 다른 물질 상에서 또는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC"), 역상-HPLC("RP-HPLC"), 팽창층 흡착 또는 이들의 임의의 조합 및/또는 반복을 임의의 적절한 순서로 포함하는 임의의 분리로부터 초래되는 임의의 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물 상에서 수행될 수 있다.
- [0670] 본 명세서에 기재된 기법을 수행하는데 사용되는 기기 및 다른 필요 물질은 상업적으로 입수가능하다. 펌프, 분획수집기, 모니터, 기록계 및 전체 시스템은, 예를 들어 Applied Biosystems(캘리포니아주 포스터 시티에 소재), Bio-Rad Laboratories, Inc.(캘리포니아주 허큘러스에 소재) 및 Amersham Biosciences, Inc.(뉴저지주 피스카타웨이에 소재)로부터 입수가능하다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 교환 매트릭스 물질, 배지 및 완충제를 포함하는 크로마토그래피 물질은 또한 이러한 회사로부터 입수가능하다.
- [0671] 세척 및 용리와 같은 본 명세서에 기재된 칼럼 크로마토그래피 과정에서 평형화 및 다른 단계는 펌프와 같은 구동화된 기구를 사용하여 더 빠르게 수행될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 펌프는, 이에 제한되는 것은 아니지만, HILOAD(등록상표) Pump P-50, Peristaltic Pump P-1, Pump P-901 및 Pump P-903(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)을 포함한다.
- [0672] 분획 수집기의 예는 RediFrac 분획 수집기, FRAC-100 및 FRAC-200 분획 수집기 및 SUPERFRAC(등록상표) 분획 수집기(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)를 포함한다. 믹서는 또한 pH 및 선형 농도 구배를 형성하기 위해 이용가능하다. 상업적으로 입수가능한 믹서는 Gradient Mixer GM-1 및 In-Line Mixers(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)를 포함한다.
- [0673] 크로마토그래피 과정은 임의의 상업적으로 입수가능한 모니터를 사용하여 모니터링될 수 있다. 이러한 모니터는 UV, pH 및 전도도와 같은 정보를 모으기 위하여 사용될 수 있다. 검출기의 예는 Monitor UV-1, UVICORD(등록상표) S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900 및 Conductivity Monitor(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)을 포함한다. 게다가, 전체 시스템은 Amersham Biosciences(뉴저지주 피스카타웨이에 소재)로부터 다양한 AKTA(등록상표) 시스템을 포함하여 상업적으로 입수가능하다.
- [0674] 본 발명의 한 실시형태에서, 예를 들어 릴렉신 폴리펩타이드는 유레아 중에서 얻어진 정제된 릴렉신 폴리펩타이드를 우선 변성시킨 후, 적합한 pH에서 환원제(예컨대 DTT)를 함유하는 TRIS 완충제 내로 희석시킴으로써 환원되고 변성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 릴렉신은 폴리펩타이드는 약 2 M 내지 약 9 M의 농도 범위에서 유레아 중에서 변성된 다음, 약 5.0 내지 약 8.0의 범위의 pH에서 TRIS 중에서 희석에 의해 변성될 수 있다. 이 실시형태의 재폴딩 혼합물은 그 다음에 인큐베이션될 수 있다. 한 실시형태에서, 재폴딩 혼합물은 4 내지 24시간 동안 실온에서 인큐베이션된다. 환원되고 변성된 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물은 그 다음에 추가로 분리되거나 또는 정제될 수 있다.
- [0675] 본 명세서에 언급된 바와 같이, 제1 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물의 pH는 어떤 이후의 분리 단계를 수행하기 전에 조절될 수 있다. 추가로, 제1 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물 또는 이것의 어떤 이후의 혼합물은 당업계에 공지된 기법을 사용하여 농축될 수 있다. 게다가, 제1 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물 또는 이것의 임의의 이후의 혼합물을 포함하는 용리 완충제는 당업자에게 공지된 기법을 사용하여 다음 분리 단계에 대해 적합한 완충제로 교환될 수 있다.
- [0676] **이온 교환 크로마토그래피** 한 실시형태에서, 선택적으로서, 추가적인 단계, 이온 교환 크로마토그래피가 제1 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물 상에서 수행될 수 있다. 일반적으로 문헌[ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences(뉴저지주 피스카타웨이에 소재))]. 상업적으로 입수가능한 이온 교환 칼럼은 HITRAP(등록상표), HIPREP(등록상표) 및 HILOAD(등록상표) 칼럼(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)을 포함한다. 이러한 칼럼은 강한 음이온 교환기, 예컨대 Q SEPHAROSE(등록상표) Fast Flow, Q SEPIIAROSE(등록상표) High Performance 및 Q SEPHAROSE(등록상표) XL; 강항 양이온 교환기, 예컨대 SP SEPHAROSE(등록상표) High Performance, SP SEPHAROSE(등록상표) Fast Flow 및 SP SEPHAROSE(등

록상표) XL; 약한 음이온 교환기, 예컨대 DEAE SEPHAROSE(등록상표) Fast Flow; 및 약한 양이온 교환기, 예컨대 CM SEPHAROSE(등록상표) Fast Flow(뉴저지주 피스카타웨이에 소재 Amersham Biosciences)를 이용한다. 음이온 또는 양이온 교환 칼럼 크로마토그래피는 실질적으로 정제된 틸렉신 폴리펩타이드를 분리하기 위한 정제 과정 중 임의의 단계에서 틸렉신 폴리펩타이드 상에서 수행될 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 임의의 적합한 양이온 교환 매트릭스를 사용하여 수행될 수 있다. 유용한 양이온 교환 매트릭스는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 섬질, 다공성, 비-다공성, 미세과립성, 비드 또는 가교된 양이온 교환 매트릭스 물질을 포함한다. 이러한 양이온 교환 매트릭스 물질은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 셀룰로스, 아가로스, 텍스트란, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐, 폴리스타이렌, 실리카, 폴리에터 또는 앞서 언급한 것의 임의의 복합체를 포함한다.

[0677] 양이온 교환 매트릭스는 강한 및 약한 양이온 교환기를 포함하는 임의의 적합한 양이온 교환기일 수 있다. 강한 양이온 교환기는 넓은 pH 범위에 걸쳐 탈이온화된 채로 남아있을 수 있고, 따라서 넓은 pH 범위에 걸쳐 틸렉신을 결합시킬 수 있다. 그러나, 약한 양이온 교환기는 pH의 작용으로서 이온화를 상실할 수 있다. 예를 들어, 약한 양이온 교환기는 pH가 약 pH 4 또는 pH 5 미만으로 하락하였을 때 전하를 상실할 수 있다. 적합한 강한 양이온 교환기는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하전된 작용기, 예컨대 설포프로필(SP), 메틸 설포네이트(S) 또는 설포에틸(SE)을 포함한다. 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 약 2.5 내지 약 6.0의 틸렉신 결합 pH 범위를 갖는 강한 양이온 교환기일 수 있다. 대안적으로, 강한 양이온 교환기는 약 pH 2.5 내지 약 pH 5.5의 틸렉신 결합 pH 범위를 가질 수 있다. 양이온 교환 매트릭스는 약 3.0의 틸렉신 결합 pH를 갖는 강한 양이온 교환기일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 약 6.0 내지 약 8.0의 틸렉신 결합 pH 범위를 갖는 강한 양이온 교환기일 수 있다. 양이온 교환 매트릭스는 바람직하게는 약 8.0 내지 약 12.5의 틸렉신 결합 pH 범위를 갖는 강한 양이온 교환기일 수 있다. 대안적으로, 강한 양이온 교환기는 약 pH 8.0 내지 약 pH 12.0의 틸렉신 결합 pH 범위를 가질 수 있다.

[0678] 틸렉신을 로딩하기 전, 양이온 교환 매트릭스는, 예를 들어, 약산, 예를 들어 pH 3에서 20mM 아세트산의 4개 칼럼 용적을 희석시키는 몇몇 칼럼 용적을 사용하여 평형상태로 될 수 있다. 평형상태 후, 틸렉신이 첨가될 수 있고, 칼럼은 또한 약 아세트산 또는 인산 용액과 같은 약산 용액을 사용하여 실질적으로 정제된 틸렉신의 용리 전 1회 내지 수 회 세척될 수 있다. 예를 들어, 20mM 아세트산, pH 3의 대략 2-4 칼럼 용적이 사용되어 칼럼이 세척될 수 있다. 0.05M 아세트산 나트륨, pH 5.5의 2-4 칼럼 용적 또는 0.1M 염화 나트륨, pH 5.5와 혼합된 0.05M 아세트산나트륨을 사용하는 추가적인 세척이 또한 사용될 수 있다. 대안적으로, 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 양이온 교환 매트릭스는 약 염기 희석물의 몇몇 칼럼 용적을 사용하여 평형상태로 될 수 있다.

[0679] 대안적으로, 실질적으로 정제된 틸렉신은 매트릭스로부터 틸렉신을 대체하기 위하여 충분히 낮은 pH 또는 이온 강도를 갖는 완충제와 양이온 교환 매트릭스를 접촉시킴으로써 용리될 수 있다. 용리 완충제의 pH는 약 pH 2.5 내지 약 pH 6.0의 범위에 있을 수 있다. 더 구체적으로는, 용리 완충제의 pH는 약 pH 2.5 내지 약 pH 5.5, 약 pH 2.5 내지 약 pH 5.0의 범위에 있을 수 있다. 용리 완충제는 약 3.0의 pH를 가질 수 있다. 게다가, 용리 완충제의 양은 크게 다를 수 있고, 일반적으로 약 2 내지 약 10 칼럼 용적의 범위에 있을 것이다.

[0680] 양이온 교환기 매트릭스에 틸렉신 폴리펩타이드의 흡착 후, 실질적으로 정제된 틸렉신 폴리펩타이드는 매트릭스로부터 틸렉신 폴리펩타이드를 대체하기 위하여 충분히 높은 pH 또는 이온 강도를 갖는 완충제와 매트릭스를 접촉시킴으로써 용리될 수 있다. 실질적으로 정제된 틸렉신 폴리펩타이드의 높은 pH 용리에서 사용을 위한 적합한 완충제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 약 5mM 내지 적어도 약 100mM 농도 범위에서 시트레이트, 포스페이트, 포메이트, 아세테이트, HEPES 및 MES 완충제를 포함할 수 있다.

[0681] **역상 크로마토그래피** 당업자에게 공지된 적합한 프로토콜 후 단백질을 정제하기 위해 RP-HPLC가 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Pearson et al., ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier et al., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani et al., J. CHROM. (1986) 359:391-402]을 참조한다. RP-HPLC는 실질적으로 정제된 틸렉신 폴리펩타이드를 분리하기 위하여 틸렉신 폴리펩타이드 상에서 수행될 수 있다. 이에 대하여, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적어도 약 C3 내지 적어도 약 C30, 적어도 약 C3 내지 적어도 약 C20, 또는 적어도 약 C3 내지 적어도 약 C18 수지를 포함하는 매우 다양한 길이의 알킬 작용기를 갖는 실리카 유도체화된 수지가 사용될 수 있다. 대안적으로, 폴리머 수지가 사용될 수 있다. 예를 들어, TosoHaas Amberchrome CG1000sd 수지가 사용될 수 있으며, 이는 스타이렌 폴리머 수지이다. 매우 다양한 알킬 체 길이를 갖는 시아노 또는 폴리머 수지가 사용될 수 있다. 더 나아가, RP-HPLC 칼럼은 에탄올과 같은 용매로 세척될 수 있다. Source RP 칼럼은 RP-HPLC 칼럼의 다른 예이다.

[0682] 메탄올, 아이소프로판올, 테트라하이드로퓨란, 아세토나이트릴 또는 에탄올과 같은 이온 짝지음제(ion pairing

agent) 및 유기 변형제를 함유하는 적합한 용매 완충제는 RP-HPLC 칼럼으로부터 릴렉신 폴리펩타이드를 용리하기 위하여 사용될 수 있다. 가장 흔하게 사용되는 이온 짝지음제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아세트산, 포름산, 과염소산, 인산, 트라이플루오로아세트산, 헵타플루오로부티르산, 트라이에틸 아민, 테트라메틸암모늄, 테트라부틸 암모늄 및 트라이에틸암모늄 아세테이트를 포함한다. 용리는 분리 시간을 감소시키고 피크 넓이를 줄이기 위해 선호되는 구배 조건으로 하나 이상의 구배 또는 등장성 조건을 사용하여 수행될 수 있다. 다른 방법은 상이한 용매 농도 범위로 2가지 구배의 사용을 수반한다. 본 명세서에서 사용에 적합한 용리 완충제의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아세트산암모늄 및 아세트나이트릴 용액을 포함할 수 있다.

[0683] **소수성 상호작용 크로마토그래피 정제 기법**

[0684] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 릴렉신 폴리펩타이드 상에서 수행될 수 있다. 일반적으로 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS(Cat. No. 18-1020-90, Amersham Biosciences (뉴저지주 피스카타웨이에 소재)]을 참조한다. 적합한 HIC 매트릭스는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알킬- 또는 아릴-치환된 매트릭스, 예컨대 뷰틸-, 헥실-, 옥틸- 또는 페닐-치환된 매트릭스, 예를 들어 아가로스, 가교된 아가로스, 세파로스, 셀룰로스, 실리카, 텍스트란, 폴리스타이렌, 폴리(메타크릴레이트) 매트릭스, 및 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌아민 수지를 포함하는 혼합된 방식의 수지, 또는 뷰틸- 또는 페닐- 치환된 폴리(메타크릴레이트) 매트릭스를 포함한다. 소수성 상호작용 칼럼 크로마토그래피의 상업적으로 이용가능한 공급원은, 이에 제한되는 것은 아니지만, HITRAP(등록상표), HIPREP(등록상표) 및 HILOAD(등록상표) 칼럼(뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences)을 포함한다.

[0685] 간략하게는, 로딩 전, HIC 칼럼은 아세트산/염화나트륨 용액 또는 암모늄 설페이트를 함유하는 HEPES와 같은 당업자에게 공지된 표준 완충제를 사용하여 평형상태로 될 수 있다. 암모늄 설페이트는 HIC 칼럼을 로딩하기 위한 완충제로서 사용될 수 있다. 릴렉신 폴리펩타이드의 로딩 후, 그 다음에 칼럼은 표준 완충제 및 원치않는 물질을 제거하기 위한 조건을 사용하여 세척되지만, HIC 칼럼 상에 릴렉신 폴리펩타이드를 보유할 수 있다. 릴렉신 폴리펩타이드는 EDTA 및 평형상태의 완충제보다 더 낮은 암모늄 설페이트 농도를 함유하는 HEPES 완충제 또는 특히 아세트산/염화나트륨 완충제와 같은 표준 완충제의 약 3 내지 약 10 칼럼 용적으로 용리될 수 있다. 예를 들어 인산칼륨의 구배를 사용하는 선형 염 구배를 감소시키는 것은 또한 릴렉신 분자를 용리시키는데 사용될 수 있다. 그 다음에 용리액은, 예를 들어 정용여과 또는 초미세여과와 같은 여과에 의해 농축될 수 있다. 정용여과는 릴렉신 폴리펩타이드를 용리시키기 위해 사용된 염을 제거하는데 이용될 수 있다.

[0686] **다른 정제 기법** 예를 들어, 본 명세서에 참조로서 포함되는 겔 여과(GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS(Cat. No. 18-1022-18, 뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 Amersham Biosciences), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(이에 제한되는 것은 아니지만 LLA-Ultrogel, High Resolution(Calbiochem), CHT Ceramic Hydroxyapatite(BioRad), Bio-Gel HTP Hydroxyapatite(BioRad)를 포함하는 적합한 매트릭스), HPLC, 팽창층 흡착, 초미세여과, 정용여과, 동결건조 등을 사용하는 또 다른 분리 단계는 제1 릴렉신 폴리펩타이드 혼합물 또는 이것의 임의의 이후의 혼합물 상에서 수행되어, 어떤 과량의 염을 제거하고, 완충제를 다음 분리 단계를 위한 적합한 완충제로 또는 심지어 최종 약물 생성물의 조제물로 대체할 수 있다.

[0687] 실질적으로 정제된 릴렉신 폴리펩타이드를 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드의 수율은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 본 명세서에 기재된 각 단계에서 모니터링될 수 있다. 이러한 기법은 또한 마지막 분리 단계 후 실질적으로 정제된 릴렉신 폴리펩타이드의 수율을 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 릴렉신 폴리펩타이드의 수율은 다양한 알킬 쇠 길이를 갖는 몇몇 역상 고압 액체 크로마토그래피 칼럼, 예컨대 시아노 RP-HPLC, C18RP-HPLC 중 어떤 것; 뿐만 아니라 양이온 교환 HPLC 및 겔 여과 HPLC를 사용하여 모니터링될 수 있다.

[0688] 본 발명의 구체적 실시형태에서, 각 정제 단계 후 릴렉신의 수율은 각 정제 단계를 위한 출발 물질 내 릴렉신의 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 적어도 약 99.9% 또는 적어도 약 99.99%일 수 있다.

[0689] 순도는 SDS-PAGE와 같은 표준 기법을 사용하여 또는 웨스턴 블롯 및 ELISA 분석을 사용하여 릴렉신 폴리펩타이드를 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 다클론성 항체는 음성 대조군 효모 발현 및 양이온 교환 회수로부터 분리된 단백질에 대해 만들어질 수 있다. 항체는 또한 오염 숙주 세포 단백질의 존재에 대한 프로브에 사용될 수 있다.

- [0690] RP-HPLC 물질 Vydac C4(Vydac)은 C4-알킬 쇠를 운반하는 표면인 실리카겔 입자로 이루어진다. 단백질을 불순물로부터 펩타이드의 분리는 소수성 상호작용 강도의 차이에 기반한다. 용리는 희석된 트라이플루오로아세트산 내 아세트나이트릴 구배로 수행된다. 분취 HPLC는 스테인레스 스틸 칼럼(Vydac C4 실리카겔의 2.8 내지 3.2 리터로 충전시킴)을 사용하여 수행된다. 하이드록시아파타이트 Ultrogel 용리액은 트라이플루오로아세트산을 첨가함으로써 산성화되며 Vydac C4 칼럼 상에 로딩된다. 세척 및 용리를 위해, 희석된 트라이플루오로아세트산 중의 아세트나이트릴 구배가 사용된다. 분취가 수집되고 포스페이트 완충제로 즉시 중화된다. 분취가 수집되며, 포스페이트 완충제로 즉시 중화된다. IPC 제한 내에 있는 펩타이드 분취가 풀링된다.
- [0691] DEAE Sepharose(Pharmacia) 물질은 세파로스 비드의 표면에 공유적으로 결합된 다이에틸아미노에틸 (DEAE)-기로 이루어진다. DEAE 기에 펩타이드의 결합은 이온 상호작용에 의해 매개된다. 아세트나이트릴 및 트라이플루오로아세트산은 보유되지 않고 칼럼을 통과한다. 이들 물질이 세척된 후, 미량의 불순물은 낮은 pH에서 아세트산 완충제로 칼럼을 세척함으로써 제거된다. 그 다음에, 칼럼은 중성 포스페이트 완충제로 세척되고, 펩타이드는 증가된 이온 강도로 완충제로 용리된다. 칼럼은 DEAE Sepharose 속성 유동으로 채워진다. 칼럼 용적은 3-10mg 펩타이드/㎖ 겔의 범위에서 펩타이드 로딩을 보장하도록 조절된다. 칼럼은 물 및 평형화 완충제(인산나트륨/인산칼륨)로 세척된다. HPLC 용리액의 풀링된 분취가 로딩되며, 칼럼은 평형화 완충제로 세척된다. 그 다음에 칼럼은 세척 완충제(아세트산나트륨 완충제)로 세척된 후 평형화 완충제로 세척된다. 이후에, 펩타이드는 용리 완충제로 칼럼으로부터 용리되며(염화나트륨, 인산나트륨/인산칼륨), 마스터 용리 프로파일에 따라 단일 분취로 수집된다. DEAE 세파로스 칼럼의 용리액은 특정된 전도도로 조절된다. 얻어진 액물 물질은 Teflon 병 내로 멸균 여과되며, -70℃에서 저장된다.
- [0692] 사용될 수 있는 추가적인 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 엔도톡신을 제거하는 단계를 포함한다. 엔도톡신은 예를 들어, 에스케리키아 콜라이와 같은 그람-음성 속주 세포의 외막 상에 위치한 리포다당체(lipopolysaccharides, LPS)이다. 엔도톡신 수준의 감소 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 실리카 지지체, 유리 분말 또는 하이드록시아파타이트, 역상, 친화도, 크기-배제, 음이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이들 방법의 조합 등을 포함한다. 변형 또는 추가적인 방법은 관심의 펩타이드로부터 단백질을 공동이동시키는 것과 같이 오염물을 제거하는데 필요할 수 있다. 엔도톡신 수준의 측정방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, Limulus Amebocyte Lysate(LAL) 분석을 포함한다. Endosafe™-PTS 분석은 LAL 시약, 색원체 기질이 사전로딩된 카트리지를 이용하고, 소형 분광 광도계와 함께 표준 엔도톡신을 조절하는 색측정의, 단일 튜브 시스템이다. 또 다른 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 탁도계이며 96 웰 포맷을 사용하는 Kinetic LAL 방법을 포함한다.
- [0693] 매우 다양한 방법 및 과정이, 이에 제한되는 것은 아니지만, Bradford 분석, SDS-PAGE, 은 염색된 SDS-PAGE, 쿠마시 염색된 SDS-PAGE, 질량분석법(이에 제한되는 것은 아니지만, MALDI-TOF) 및 당업자에게 공지된 단백질을 특징화하기 위한 다른 방법을 포함하여, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드의 수율 및 순도를 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0694] 추가적인 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단백질 염색 방법과 커플링된 SDS-PAGE, 면역블롯팅, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화-질량분석법(MALDI-MS), 액체 크로마토그래피/질량 분석법, 등전점전기영동, 분석 양이온 교환, 크로마토포커싱 및 원색법(circular dichroism)을 포함한다.
- [0695] 선택적 압력 포함으로 칭해지는 생체내 방법은 야생형 신시타제의 뒤범벅을 활용하도록 개발되었다. 예를 들어 문헌[N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999)]을 참조한다. 특정 천연 아미노산을 세포에 공급하는 적절한 대사 경로가 꺼져있는 영양요구성 균주는 제한된 농도의 천연 아미노산을 함유하는 최소 배지 중에서 성장되는 한편, 표적 유전자의 전사는 억제된다. 성장 정체기의 개시에서, 천연 아미노산은 고갈되며 비천연 아미노산 유사체로 대체된다. 재조합 단백질 발현의 유발은 비천연 유사체를 함유하는 단백질의 축적을 초래한다. 예를 들어, 이 전략을 사용하여, o, m 및 p-플루오로페닐알라닌은 단백질 내로 포함되었고, 용이하게 확인될 수 있는 UV 스펙트럼에서 2개의 특징적 숄더(shoulder)를 나타낸다. 예를 들어 문헌[C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000)]을 참조하며; 트라이플루오로메티오닌은 ¹⁹F NMR에 의한 키토올리고당 리간드와 그것의 상호작용을 연구하기 위하여 박테리오파지 T4 라이소자임 내 메티오닌을 대체하는데 사용되었다, 예를 들어 문헌[H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997)]을 참조하며; 트라이플루오로류신은 류신 대신 포함되었고, 이는 류신-지퍼 단백질의 증가된 열적 및 화학적 안정성을 초래한다. 예를 들어, 문헌[Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nalcjima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, *Angew. Chem.*,

Int. Ed. Engl., 40:1494 (2001)]을 참조한다. 게다가, 셀레노메티오닌 및 텔루로메티오닌은 다양한 재조합 단백질 내로 포함되어 X-레이 결정학에서 용액의 단계화를 용이하게 한다. 예를 들어, 문헌[W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. Lemaster, EMBO J., 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebiada and M. Hatada, Nat. Struct. Biol., 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann and R. Huber, Eur. J. Biochem., 230:788 (1995); 및 N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder and R. Huber, J. Mol. Biol., 270:616 (1997)]을 참조한다. 알켄 및 알카인 작용기를 갖는 메티오닌 유사체가 또한 효율적으로 포함되었으며, 이는 화학적 수단에 의해 단백질을 추가적으로 변형시킨다. 예를 들어 본 명세서에 참조로 포함된 문헌[J. C. van Hest and D. A. Tirrell, FEBS Lett., 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick and D. A. Tirrell, J. Am. Chem. Soc., 122:1282(2000); 및 K. L. Kiick and D. A. Tirrell, Tetrahedron, 56:9487 (2000)]; 미국 특허 제6,586,207호; 미국 공개특허 2002/0042097호를 참조한다.

[0696] 본 방법의 성공은 아미노아실-tRNA 신시타제에 의한 비천연 아미노산 유사체의 인식에 의존하는데, 이는 일반적으로 단백질 번역의 충실함을 보장하는 높은 선택성을 필요로 한다. 본 방법의 범주를 확장하기 위한 한 방법은 아미노아실-tRNA 신시타제의 기질 특이성을 완화시키기 위한 것인데, 이는 제한된 경우의 수로 달성되었다. 예를 들어, 에스케리키아 콜라이 페닐알라닌-tRNA 신시타제(PheRS) 내 Ala²⁹⁴의 Gly으로 대체는 기질 결합 포켓의 크기를 증가시키며, 이는 p-Cl-페닐알라닌(p-Cl-Phe)에 의한 tRNA^{Phe}의 아실화를 초래한다. 문헌[M. Tbbba, P. Kast and H. Hennecke, Biochemistry, 33:7107 (1994)]을 참조한다. 이 돌연변이체 PheRS를 은닉하는 에스케리키아 콜라이 균주는 페닐알라닌 대신 p-Cl-페닐알라닌 또는 p-Br-페닐알라닌을 포함시킨다. 예를 들어, 문헌[M. Ibba and H. Hennecke, FEBS Lett., 364:272(1995); 및 N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D. A. Tirrell, FEBS Lett., 467:37 (2000)]을 참조한다. 유사하게는, 에스케리키아 콜라이 티로실-tRNA 신시타제의 아미노산 결합 부위 근처의 점 돌연변이 Phe130Ser은 티로신보다 아자티로신이 더 효율적으로 포함되도록 하는 것으로 나타났다. 문헌[F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil and S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000)]을 참조한다.

[0697] 생체내에서 단백질 내로 비천연 아미노산을 포함시키는 다른 전략은 교정 메커니즘을 갖는 신시타제를 변형시키는 것이다. 이들 신시타제는 식별할 수 없으며, 따라서 동족 천연 아미노산과 구조적으로 유사한 아미노산을 활성화시킨다. 이 오류는 별개의 부위에서 수정되는데, 이는 단백질 번역의 충실도를 유지하기 위하여 tRNA로부터 잘못 붙은 아미노산을 탈아실화한다. 신시타제의 교정 활성이 쓸모없게 된다면, 활성화되지 않는 구조적 유사체는 편집 기능으로부터 벗어날 수 있고, 포함될 수 있다. 이 접근은 발릴-tRNA 신시타제(valyl-tRNA synthetase, ValRS)에 의해 최근에 증명되었다. 문헌[V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P. Marliere, Science, 292:501 (2001)]을 참조한다. ValRS는 tRNA^{Val}을 Cys, Thr 또는 아미노뷰티레이트(Abu)로 잘못 아미노아실화 할 수 있고; 이들 비동족 아미노산은 이후에 편집 도메인에 의해 가수분해된다. 에스케리키아 콜라이 염색체의 무작위 돌연변이유발 후, 돌연변이체 에스케리키아 콜라이 균주는 ValRS의 편집 부위에서 돌연변이를 갖도록 선택되었다. 이 편집-결합 ValRS는 tRNA^{Val}을 시스테인으로 부정확하게 붙인다. Abu가 입체구조적으로 Cys와 유사하기 때문에(Cys의 -SH 기는 Abu의 -CH₃로 대체됨), 이 돌연변이체 에스케리키아 콜라이 균주가 Abu의 존재에서 성장될 때, 돌연변이체 ValRS는 단백질 내에 포함된다. 질량 분광 분석은 천연 단백질 내 각 발린 위치에서 발린의 약 24%가 Abu로 대체된다는 것을 나타낸다.

[0698] 고체상 합성 및 반합성 방법은 또한 신규 아미노산을 함유하는 다수의 단백질 합성을 허용하였다. 예를 들어, 다음의 간행물 및 다음과 같은 문헌 내 인용된 참고문헌을 참조한다: 문헌[Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. *General nature of the genetic code for proteins*, Nature, 192:1227-1232(1961); Hofmann, K., Bohn, H. *Studies on polypeptides*, XXXVI. *The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment*, J. Am. Chem. Soc. 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. *Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes*, Acc. Chem. Res. 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. *Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin*, J. Am. Chem. Soc. 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. *Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease*, Science, 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. *Semisynthetic peptides and proteins*, CRC Crit. Rev. Biochem. 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. *Protein engineering by chemical means?* Protein Eng. 1(3): 151-157 (1987); 및, Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. *A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with*

Unnatural Catalytic Residues, Science, 266(5183):243 (1994)].

- [0699] 시험관내 단백질 내로 보조인자, 스핀 라벨 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 다양한 비천연 측쇄를 도입하기 위하여 화학적 변형이 사용되었다. 예를 들어 문헌[Corey, D.R., Schultz, P.G. *Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease*, Science, 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. *The chemical modification of enzymatic specificity*, Annu Rev Biochem, 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. *Chemical mutation of enzyme active sites*, Science, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-Subtilisin, J Biol. Chem, 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L, et M.L. Bender. *A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin*, J. Am Chem Soc, 88:3153-3154 (1966); 및 Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G, *Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites*, Science, 242(4881):1038-1040 (1988)]을 참조한다.
- [0700] 대안적으로, 화학적으로 변형된 아미노아실-tRNA를 사용하는 생합성 방법은 시험관내에서 합성된 단백질 내로 몇몇 생물물리학적 프로브를 도입하기 위하여 사용될 수 있다. 다음의 간행물 및 그 안에 인용된 참고문헌을 참조한다: 문헌[Brunner, J. *New Photolabeling and crosslinking methods*, Annu. Rev Biochem, 62:483-514 (1993); 및 Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. *Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle*, Proc. Natl. Acad. Sci, 83(22):8604-8608 (1986)].
- [0701] 이전에, 비천연 아미노산은 원하는 앰버 넌센스 돌연변이를 함유하는 유전자로 프로그램된 단백질 합성 반응에 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA의 첨가에 의해 시험관내에서 단백질 내로 부위-특이적으로 포함될 수 있다. 이들 접근을 사용하여, 특정 아미노산에 영양요구성인 균주를 사용하여 페닐알라닌에 대해 플루오로페닐알라닌과 같이 밀접한 구조적 상동성을 갖는 다수의 보통의 20가지 아미노산을 치환할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, Science, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., Science 268:439-42(1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, J. Am Chem Soc, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., FASEB J, 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins*, Methods in Enz., vol. 202, 301-336 (1992); 및 Mendel, D., Comish, V.W. & Schultz, P.G. *Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code*, Annu Rev Biophys. Biomol Struct., 24, 435-62(1995)]을 참조한다.
- [0702] 예를 들어, 억제자 tRNA는 정지코돈 UAG를 인식하도록 제조되었고, 비천연 아미노산에 의해 화학적으로 아미노아실화되었다. 통상적인 부위-지정 돌연변이유발은 단백질 유전자 내 관심 부위에서 정지코돈 TAG를 도입하기 위해 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802(1988)]을 참조한다. 아실화된 억제자 tRNA 및 돌연변이체 유전자가 시험관내 전사/번역 시스템 내로 합쳐질 때, 구체화된 위치에서 해당 아미노산을 함유하는 단백질을 제공하는 UAG 코돈에 반응하여 비천연 아미노산이 포함되었다. [³H]-Phe를 사용한 실험 및 α-하이드록시산에 의한 실험은 원하는 아미노산만이 UAG 코돈에 의해 특정된 위치에 포함되고, 이 아미노산은 단백질 내 임의의 다른 부위에 포함되지 않는다는 것을 증명하였다. 예를 들어, 문헌[Norcn, et al., 상기 참조, Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432]; 및 [Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, Science, 255(5041): 197-200 (1992)]을 참조한다.
- [0703] tRNA는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 화학적 또는 효소적 아미노아실화를 포함하는 임의의 방법 또는 기법으로써 원하는 아미노산에 의해 아미노아실화될 수 있다.
- [0704] 아미노아실화는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아미노아실 tRNA 신시타제에 의해 또는 리보자임을 포함하는 다른 효소 분자에 의해 수행될 수 있다. 용어 "리보자임"은 "측매 RNA"와 상호호환가능하다. 문헌[Cech and coworkers (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem*, 64:221-226)]은 측매로서 작용할 수 있는 자연적으로 발생하는 RNA(리보자임)의 존재를 증명하였다. 그러나, 이들 천연 RNA 측매가 절단 및 스플라이싱을 위한 리보핵산 기질에서 작용하는 것으로 나타났지만, 리보자임의 인공적 발전의 최

근의 개발은 다양한 화학 반응에 대한 촉매의 레퍼토리를 확장시켰다. 연구는 그것 자체의 (2')3'-말단 상에서 아미노아실-RNA를 촉매할 수 있는 RNA 분자(Illangakekare et al., 1995 Science 267:643-647), 및 RNA 분자로 부터 다른 것에 아미노산을 전달할 수 있는 RNA 분자(Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444)를 확인하였다.

[0705] 본 명세서에 참조로 포함되는 미국특허출원 공개 제2003/0228593호는 자연적으로 암호화된 및 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의한 tRNA의 아미노아실화에서 리보자임의 구성방법 및 그것의 용도를 기재한다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 리보자임을 포함하는 tRNA를 아미노아실화할 수 있는 효소 분자의 기질-고정 형태는 아미노아실화된 생성물의 효율적인 친화성 정제를 가능하게 할 수 있다. 적합한 기질의 예는 아가로스, 세파로스 및 자기 비드를 포함한다. 아미노아실화를 위한 기질-고정 형태의 생성 및 사용은 본 명세서에 참조로서 포함되는 문헌[Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084] 및 미국특허출원 공개 2003/0228593호에 기재되어 있다.

[0706] 화학적 아미노아실화 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아미노아실화에서 신시타제의 사용을 회피하기 위하여 본 명세서에 참조로서 포함되는 Hecht 및 공동연구자에 의한(Hecht, S. M, Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517) 및 Schultz, Chamberlin, Dougherty 및 다른 사람들에 의한(Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al, Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D, A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem, 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34)에 의해 도입된 것을 포함한다. 이러한 방법 또는 다른 화학적 아미노아실화 방법은 tRNA 분자를 아미노아실화하기 위하여 사용될 수 있다.

[0707] 촉매적 RNA를 생성하기 위한 방법은 무작위화된 리보자임 서열의 분리 풀을 생성하는 단계, 바람직한 아미노아실화 활성에 대해 풀을 스크리닝하는 단계 및 원하는 아미노아실화 활성을 나타내는 해당 리보자임의 서열을 선택하는 단계를 수반할 수 있다.

[0708] 리보자임은 GGU 모티프 및 U-풍부 영역과 같은 아실화 활성을 촉진하는 모티프 및/또는 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, U-풍부 영역은 아미노산 기질의 인식을 용이하게 할 수 있으며, GGU-모티프는 tRNA의 3' 말단과 함께 염기쌍을 형성한다는 것이 보고되었다. 조합되어, GGU 및 모티프 및 U-풍부 영역은 아미노산과 tRNA 둘 다의 동시인식을 동시에 용이하게 하며, 이에 의해 tRNA의 3' 말단의 아미노아실화를 용이하게 한다.

[0709] 리보자임은 tRNA^{Asn}_{cccg}와 컨주게이션된 부분적으로 무작위화된 r24mini를 사용하여 시험관내 선택에 의한 다음 활성 클론 내에서 발견되는 공통 서열의 전체 유전자조작 만들어질 수 있다. 이 방법에 의해 얻어지는 대표적인 리보자임은 "Fx3 리보자임"으로 칭해지며, 내용이 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국 특허출원 2003/0228593호에 기재되어 있다. 동족 비-천연 아미노산과 붙은 다양한 아미노아실-tRNA의 합성을 위한 다재다능한 촉매로서 작용한다.

[0710] 기질 상에 고정된 아미노아실화된 tRNA의 효율적인 친화성 정제를 가능하게 하도록 사용될 수 있다. 적합한 기질의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아가로스, 세파로스 및 자기 비드를 포함한다. 리보자임은 RNA의 화학적 구조를 이용함으로써 수지 상에 고정될 수 있고, 예컨대 RNA 리보스 상에 3'-시스-다이올은 과요오드산염에 의해 산화되어 대응하는 다이알데하이드를 수득하여서 수지 상 RNA의 고정을 용이하게 한다. 비싸지 않은 하이드라자이드 수지를 포함하는 다양한 유형의 수지가 사용되되, 환원성 아미노화는 수지와 리보자임 사이의 상호작용이 비가역적 결합이 되도록 한다. 아미노아실-tRNA의 합성은 이 칼럼 상 아미노아실화 기법에 의해 상당히 용이하게 될 수 있다. 문헌[Kourouklis et al. Methods 2005; 36:239-4]은 칼럼-기반 아미노아실화 시스템을 기재한다.

[0711] 아미노아실화된 tRNA의 분리는 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 하나의 적합한 방법은 10mM EDTA와 함께 아세트산나트륨 용액과 같은 완충제, 50mM N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(3-프로판설폰산), 12.5mM KCl, pH 7.0, 10mM EDTA를 함유하는 완충제, 또는 단순히 EDTA 완충수(pH 7.0)를 갖는 칼럼으로부터 아미노아실화된 tRNA를 용리시키는 것이다.

[0712] 번역 반응에 의해 만들어진 폴리펩타이드 내 선택 위치에서 tRNA는 아미노아실화된 아미노산을 포함하기 위하여

아미노아실화된 tRNA가 번역 반응에 첨가될 수 있다. 본 발명의 아미노아실화된 tRNA가 사용될 수 있는 번역 시스템의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 세포 용해질을 포함한다. 세포 용해질은 입력 mRNA로부터 폴리펩타이드의 시험관내 번역에 필요한 반응 성분을 제공한다. 이러한 반응 성분의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 리보솜 단백질, rRNA, 아미노산, tRNA, GTP, ATP, 번역 개시 및 연장 인자 및 번역과 관련된 추가적인 인자를 포함한다. 추가적으로, 번역 시스템은 배척 번역 또는 구획화된 번역일 수 있다. 배척 번역 시스템은 단일 구획 내 반응 성분을 조합하는 반면, 구획화된 번역 시스템은 번역 효율을 억제할 수 있는 반응 생성물로부터 번역 반응 성분을 분리시킨다. 이러한 번역 시스템은 상업적으로 입수가능하다.

[0713] 추가로, 커플링된 전사/번역 시스템이 사용될 수 있다. 커플링된 전사/번역 시스템은 대응하는 mRNA 내로 입력 DNA의 전사를 둘 다 허용하는데, 이는 차례로 반응 성분에 의해 번역된다. 상업적으로 입수가능한 커플링된 전사/번역의 예는 Rapid Translation System(RTS, Roche Inc.)이다. 해당 시스템은 리보솜 및 번역 인자와 같은 번역 성분을 제공하기 위한 이콜라이 용해질을 함유하는 혼합물을 포함한다. 추가적으로, 번역에서 사용을 위한 mRNA 주형 내로 입력 DNA의 전사를 위해 RNA 폴리머라제가 포함된다. RTS는 공급물/폐기물 구획 및 전사/번역 구획을 포함하는 반응 구획 사이에 끼여있는 막을 거쳐 반응 성분의 구획화를 사용할 수 있다.

[0714] tRNA의 아미노아실화는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 트랜스퍼라제, 폴리머라제, 촉매적 항체, 다기능성 단백질 등을 포함하는 다른 작용제에 의해 수행될 수 있다.

[0715] 문헌[Stephan in Scientist 2005 Oct 10; 페이지 30-33]은 단백질 내로 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함시키는 추가적인 방법을 기재한다. 문헌[Lu et al. in Mol Cell. 2001 Oct;8(4):759-69]은 비천연 아미노산을 함유하는 합성 펩타이드에 단백질이 화학적으로 결합된 방법을 기재한다(발현된 단백질 결합).

[0716] 단백질 내로 비천연 아미노산을 포함시키기 위해 미세주입 기법이 또한 사용되었다. 예를 들어 문헌[M, W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Science*, 268:439 (1995); 및 D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000)]을 참조한다. 개구리 난세포(Xenopus 난 모세포)를 시험관내에서 만들어진 2개의 RNA 종, 즉 관심의 아미노산 위치에서 UAG 정지코돈으로 표적 단백질을 암호화하는 mRNA 및 원하는 비천연 아미노산에 의해 아미노아실화된 앰버 억제자 tRNA와 공동주입하였다. 그 다음에 난모세포의 번역 기구는 UAG에 의해 특정된 위치에서 비천연 아미노산을 삽입한다. 이 방법은 통합 막 단백질의 생체내 구조-작용 연구에서 허용되는데, 일반적으로 시험관내 발현 시스템에 따르지 않는다. 예는 형광 공명에너지전달에 의해 거리를 측정하기 위하여 타치카이닌 뉴로키닌-2-수용체 내로 형광 아미노산의 포함을 포함한다. 예를 들어 문헌[G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271:19991 (1996)]을 참조하며, 이온 채널에서 표면-노출된 잔기를 확인하기 위하여 바이오틴화된 아미노산의 포함은, 예를 들어 문헌[J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997)]을 참조하고; 실시간 이온 채널에서 입체구조 변화를 모니터링하기 위해 케이지된 티로신 유사체의 사용은, 예를 들어 문헌[J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Neuron*, 20:619 (1998)]을 참조하며; 신경생리학적경로를 프로빙하기 위한 이온 채널 백본을 변화시키는 알파 하이드록시 아미노산의 사용은, 예를 들어 문헌[P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Cell*, 96:89 (1999); 및 T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001)]을 참조한다.

[0717] 생체내 단백질 내로 직접 비천연 아미노산을 포함시키는 능력은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 고수율의 돌연변이체 단백질, 기법의 용이성, 세포 내 또는 가능하게는 살아있는 유기체에서 돌연변이체 단백질을 연구하는 잠재력 또는 치료적 처치 및 진단적 사용에서 이들 돌연변이체 단백질의 사용을 포함하는 매우 다양한 이점을 제공한다. 단백질 내로 다양한 크기, 산도, 친핵성, 소수성 및 다른 특성을 갖는 비천연 아미노산을 포함시키는 능력은 단백질의 구조를 합리적으로 및 조직적으로 조작하는 본 발명자의 능력을 크게 확장시켜 단백질 기능을 프로브하고 신규 특성을 갖는 새로운 단백질 또는 유기체를 만들 수 있다.

[0718] 부위-특이적으로 파라-F-Phe를 포함시키는 한 시도에서, 효모 앰버 억제자 tRNA^{Phe}CUA/페닐알라닌-tRNA 신시타제 쌍은 p-F-Phe 저항성인 Phe 영양 요구성 에스케리키아 콜라이 균주에 사용되었다. 예를 들어 문헌[R. Furter, *Protein Sci.*, 7:419(1998)]을 참조한다.

[0719] 또한 무세포(시험관내) 번역 시스템을 사용하여 본 발명의 틸락신 폴리뉴클레오타이드의 발현을 얻는 것이 가능할 수 있다. 번역 시스템은 세포 또는 무세포일 수 있고, 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 세포 번역 시스템은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 투과성 세포 또는 세포 배양물과 같은 전세포 제제를 포함하되, 원하는 핵산

서열은 mRNA로 전사될 수 있고, mRNA는 번역되었다. 무세포 번역 시스템은 상업적으로 입수가능하며, 다수의 상이한 유형 및 시스템은 잘 공지되어 있다. 무세포 시스템의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 원핵 용해질, 예컨대 에스케리키아 콜라이 용해질, 진핵세포 용해질, 예컨대 밀배아 추출물, 곤충 세포 추출물, 토끼 망상적혈구 용해질, 토끼 난모세포 용해질 및 인간 세포 용해질을 포함한다. 진핵 추출물 또는 용해질은 얻어진 단백질이 글라이코실화되고, 인산화되거나 또 다르게 변형될 때 바람직할 수 있는데, 다수의 이러한 변형은 단지 진핵세포 시스템에서만 가능하기 때문이다. 이들 추출물 및 용해질 중 일부는 상업적으로 입수가능하다(위스콘신주 매디슨에 소재한 Promega; 캘리포니아주 라호야에 소재한 Stratagene; 알링턴 하이츠 111에 소재한 Amersham; 뉴욕주 그랜드 아일랜드에 소재한 GIBCO/BRL). 마이크로솜 막을 함유하는 개 체장 추출물과 같은 막 추출물이 또한 이용가능하며, 이는 분비 단백질을 번역하는데 유용하다. 주형(시험관내 번역)으로서 mRNA 또는 주형으로서 DNA(조합된 시험관내 전사 및 번역)를 포함할 수 있는 이들 시스템에서, 시험관내 합성은 리보솜에 의해 지시된다. 무세포 단백질 발현 시스템의 발현에 상당한 노력이 적용되었다. 예를 들어, 문헌[Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); 및 Patnaik, R. and J.R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998)]; 미국특허 제6,337,191호; 미국특허 공개 제2002/0081660호; WO 00/55353; WO 90/05785을 참조하며, 이들은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드의 발현에 적용될 수 있는 다른 접근은 mRNA-펩타이드 융합 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[R. Roberts and J. Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302(1997); A. Frankel, et al., Chemistry & Biology 10:1043-1050 (2003)]을 참조한다. 이 접근에서, 퓨로마이신에 연결된 mRNA 주형은 리보솜 상의 펩타이드로 번역된다. 하나 이상의 tRNA 분자가 변형되었다면, 비-천연 아미노산은 펩타이드 내로도 포함될 수 있다. 마지막 mRNA 코돈이 판독된 후, 퓨로마이신은 펩타이드의 C-말단을 포획한다. 얻어진 mRNA-펩타이드 컨주게이트가 시험관내 분석에서 관심의 특성을 갖는 것으로 발견된다면, 그것의 동일성은 mRNA 서열로부터 용이하게 드러날 수 있다. 이 방법으로, 원하는 특성을 갖는 폴리펩타이드를 확인하기 위하여 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드의 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 더 최근에, 정제된 성분에 의한 시험관내 리보솜은 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된 펩타이드의 합성을 허용한다는 것이 보고되었다. 예를 들어, 문헌[A. Forster et al., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003)]을 참조한다.

[0720] 재구성된 번역 시스템이 또한 사용될 수 있다. 정제된 번역 인자의 혼합물은 단백질뿐만 아니라 용해질의 조합 또는 정제된 번역 인자, 예컨대 개시 인자-1 (IF-1), IF-2, IF-3(α 또는 β), 연장 인자 T (EF-Tu) 또는 종결 인자로 보충된 용해질로 mRNA를 번역하기 위하여 성공적으로 사용되었다. 무세포 시스템은 또한 전사/번역 시스템과 커플링될 수 있되, DNA는 mRNA로 전사된 시스템에 도입되고, mRNA는 본 명세서에 참조로서 구체적으로 포함되는 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al, editors, Wiley Interscience, 1993)]에 기재된 바와 같이 번역된다. 진핵 전사 시스템에서 전사된 RNA는 이종핵 RNA(heteronuclear, hnRNA) 또는 5'-말단 캡(7-메틸 구아노신) 및 3'-말단 폴리 A 맞춤 성숙 mRNA의 형태 일 수 있는데, 이는 특정 번역 시스템에서 유리할 수 있다. 예를 들어, 캡핑된 mRNA는 망상적혈구 용해질 시스템에서 고효율로 번역된다.

[0721] **펩타이드 폴리펩타이드에 커플링된 거대분자 폴리머**

[0722] 본 명세서에 기재된 비-천연 아미노산 폴리펩타이드의 다양한 변형은 본 명세서에 기재된 조성물, 방법, 기법 및 전략을 사용하여 달성될 수 있다. 이들 변형은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 표지; 염료; 폴리머; 수용성 폴리머; 폴리에틸렌 글라이콜의 유도체; 광가교제; 방사성핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이터; 보조인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오타이드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오타이드; 당류, 수용성 텐드리머; 사이클로덱스트린; 억제 리보핵산; 생체재료; 나노입자; 스핀 표지; 형광단, 금속-함유 모이어티; 방사성활성 모이어티; 신규 작용기; 다른 분자와 공유적으로 또는 비공유적으로 상호작용하는 기; 포토케이지된 모이어티; 화학 방사선 여기 모이어티; 광이성질체화 모이어티; 바이오틴; 바이오틴 유도체; 바이오틴 유사체; 중원자를 포함하는 모이어티; 화학적으로 절단가능한 기; 광절단가능 기; 연장된 측쇄; 탄소-연결 당; 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 방사성 표지된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 기; 화학 발광 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 간섭 기; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적으로 활성인 작용제; 검출가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오타이드; 방사성 트랜스미터; 뉴런-포획제 또는 상기의 임의의 조합 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질을 포함하는 폴리펩타이드의 비천연 아미노산 성분 상에 추가 작용기의 포함을 포함한다. 예시한 바와 같이, 본 명세서에 기재된 조성물, 방법, 기법 및

전략의 비제한적 예에서, 다음의 기재는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 열거된 다른 작용기를 첨가하는 것에 적용될 수 있는(필요하다면 적절한 변형과 함께 당업자가 본 명세서의 개시에 의해 만드는) 본 명세서에 기재된 해당 조성물, 방법, 기법 및 전략을 이해하는 비-천연 아미노산 폴리펩타이드에 거대분자 폴리머를 첨가하는 것에 초점을 둘 것이다.

[0723] 매우 다양한 거대분자 폴리머 및 다른 분자가 본 발명의 펩타이드에 연결되어 펩타이드의 생물학적 특성을 조절할 수 있고/있거나 펩타이드 분자의 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이들 거대분자 폴리머는 자연적으로 암호화된 아미노산을 통해, 비-자연적으로 암호화된 아미노산 또는 천연 또는 비-천연 아미노산의 어떤 작용적 치환체, 또는 천연 또는 비천연 아미노산에 첨가된 임의의 치환체 또는 작용기를 통해 연결될 수 있다. 폴리머의 분자량은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약 100Da 내지 약 100,000Da 또는 초과를 포함하는 넓은 범위에 있을 수 있다. 폴리머의 분자량은 약 100Da 내지 약 100,000Da, 이에 제한되는 것은 아니지만, 100,000Da, 95,000Da, 90,000Da, 85,000Da, 80,000Da, 75,000Da, 70,000Da, 65,000Da, 60,000Da, 55,000Da, 50,000Da, 45,000Da, 40,000Da, 35,000Da, 30,000Da, 25,000Da, 20,000Da, 15,000Da, 10,000Da, 9,000Da, 8,000Da, 7,000Da, 6,000Da, 5,000Da, 4,000Da, 3,000Da, 2,000Da, 1,000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da 및 100 Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리머의 분자량은 약 100Da 내지 약 50,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머의 분자량은 약 100Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머의 분자량은 약 5,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머의 분자량은 약 10,000Da 내지 약 40,000Da이다.

[0724] 본 발명은 폴리머:단백질 컨쥬게이트의 실질적으로 상동성인 제제를 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 상동성인"은 폴리머:단백질 컨쥬게이트 분자가 전체 단백질의 절반보다 더 큰 것으로 관찰되었다는 것을 의미한다. 폴리머:단백질 컨쥬게이트는 생물학적 활성을 가지며, 본 명세서에 제공된 "실질적으로 상동성인" 폐쇄화된 펩타이드 제제는 상동성 제제의 이점, 예를 들어 로트에서 로트로 약동학의 예측가능성의 임상적 적용의 용이함을 나타내기에 충분히 상동성이다.

[0725] 또한 폴리머:단백질 컨쥬게이트 분자의 혼합물을 제조하는 것을 선택할 수 있으며, 본 명세서에 제공된 이점은 혼합물에 포함을 위해 모노-폴리머:단백질 컨쥬게이트의 비율을 선택할 수 있다는 것이다. 따라서, 원한다면 다수의 폴리머 모이어티가 부착된(즉, 다이-, 트라이-, 테트라- 등) 다양한 단백질의 혼합물을 제조할 수 있으며, 본 발명의 방법을 사용하여 모노-폴리머 단백질 컨쥬게이트와 상기 컨쥬게이트를 조합할 수 있고, 모노-폴리머:단백질-컨쥬게이트의 사전결정된 비율로 혼합물을 가진다.

[0726] 선택된 폴리머는 수용성일 수 있으며, 따라서 부착된 단백질은 생리학적 환경과 같은 수성 환경에서 침전되지 않는다. 폴리머는 분지되거나 또는 분지되지 않을 수 있다. 최종-생성물 제제의 치료적 용도를 위해, 폴리머는 약제학적으로 허용가능할 것이다.

[0727] 폴리머의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리알킬 에터 및 이것의 알콕시-캡핑된 유사체(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 글라이콜, 폴리옥시에틸렌/프로필렌 글라이콜 및 이것의 메톡시 또는 에톡시-캡핑된 유사체, 특히 폴리옥시에틸렌 글라이콜, 후자는 또한 폴리에틸렌글라이콜 또는 PEG로서 알려져 있음); 폴리비닐피롤리돈; 폴리비닐알킬 에터; 폴리옥사졸린, 폴리알킬 옥사졸린 및 폴리하이드록시알킬 옥사졸린; 폴리아크릴아마이드, 폴리알킬 아크릴아마이드, 및 폴리하이드록시알킬 아크릴아마이드(예를 들어, 폴리하이드록시프로필메타크릴아마이드 및 이것의 유도체); 폴리하이드록시알킬 아크릴레이트; 폴리시알산 및 이것의 유사체; 친수성 펩타이드 서열; 다당류 및 그것의 유도체, 예컨대 덱스트란 및 덱스트란 유도체, 예를 들어 카복시메틸덱스트란, 덱스트란 설페이트, 아미노덱스트란; 셀룰로스 및 그것의 유도체, 예를 들어 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시알킬 셀룰로스; 키틴 및 그것의 유도체, 예를 들어 키토산, 숙시닐 키토산, 카복시메틸키틴, 카복시메틸키토산; 히알루론산 및 그것의 유도체; 전분; 알기네이트; 콘드로이틴 설페이트; 알부민; 폴루란 및 카복시메틸 폴루란; 폴리아미노산 및 이것의 유도체, 예를 들어 폴리글루탐산, 폴리리신, 폴리아스파르트산, 폴리아스파르트아마이드; 말레산 무수물 공중합체, 예컨대: 스타이렌 말레산 무수물 공중합체, 다이비닐에틸 에터 말레산 무수물 공중합체; 폴리비닐 알코올; 이것의 공중합체; 이것의 삼중합체; 이것의 혼합물; 및 앞서 언급한 것의 유도체를 포함한다.

[0728] 폴리에틸렌 글라이콜 분자 대 단백질 분자의 비율은 반응 혼합물 내 그것의 농도에 따라 다를 것이다. 일반적으로 최적의 비(반응 효율성에 대해 최소 과량의 미반응 단백질 또는 폴리머가 있다는 점에서)는 선택된 폴리에틸렌 글라이콜의 분자량 및 이용가능한 반응기의 수에 의해 결정될 것이다. 분자량과 관련하여, 전형적으로 폴리머의 분자량이 클수록 단백질에 부착될 수 있는 폴리머 분자의 수는 더 적다. 유사하게, 이들 변수를 최적화할 때, 폴리머의 분지가 고려되어야 한다. 일반적으로, 분자량이 더 크면(또는 분자가 더 많으면) 폴리머:단백질

비는 더 크다.

- [0729] 본 명세서에서 사용되는 것과 같이, PEG: 킬렉신 폴리펩타이드 컨주게이트를 고려할 때, 용어 "치료적 유효량"은 모체에 원하는 이점을 제공하는 양을 말한다. 해당 양은 개체마다 서로 다를 것이며, 환자의 전반적인 생리적 조건 및 치료되는 조건의 근본적인 원인을 포함하는 다수의 인자에 의존할 것이다. 치료를 위해 사용된 킬렉신 폴리펩타이드의 양은 허용가능한 변화율을 제공하며 유리한 수준으로 원하는 반응을 유지한다. 본 발명 조성물의 치료적 유효량은 공공연하게 입수가능한 물질 및 과정을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.
- [0730] 수용성 폴리머는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 포크형 또는 분지형을 포함하는 임의의 구조 형태일 수 있다. 전형적으로, 수용성 폴리머는 폴리(알킬렌 글라이콜), 예컨대 폴리(에틸렌 글라이콜)(PEG)이지만, 다른 수용성 폴리머가 또한 사용될 수 있다. 예로써, PEG가 본 발명의 특정 실시형태를 설명하기 위해 사용된다.
- [0731] PEG는 상업적으로 입수가능하거나 또는 당업자에게 공지된 방법에 따른 에틸렌 글라이콜의 고리 열림 중합에 의해 제조될 수 있는 잘 알려진 수용성 폴리머이다(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). 용어 "PEG"는 PEG 말단에서 크기 또는 변형을 고려하지 않고 임의의 폴리(에틸렌 글라이콜) 분자를 포함하도록 널리 사용되며, 화학식 $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$ 에 의해 킬렉신 폴리펩타이드에 연결되는 것으로 표시될 수 있고, n 은 2 내지 10,000이며 X 는 H 또는 이에 제한되는 것은 아니지만, C_{1-4} 알킬, 보호기, 또는 말단 작용기를 포함하는 말단 변형이다.
- [0732] 일부 경우에, 본 발명에서 사용된 PEG는 하이드록시 또는 메톡시를 갖는(즉, X 는 H 또는 CH_3 ("메톡시 PEG")임) 하나의 말단 상에서 종결된다. 대안적으로, PEG는 반응기로 종결될 수 있으며, 이에 의해 2작용성 폴리머를 형성한다. 전형적인 반응기는 20가지의 공통 아미노산(이에 제한되는 것은 아니지만, 말레이미드 기, 활성화된 카보네이트(이에 제한되는 것은 아니지만, p -나이트로페닐 에스터), 활성화된 에스터(이에 제한되는 것은 아니지만, N -하이드록시숙신이미드, p -나이트로페닐 에스터) 및 알데하이드)에서 발견된 작용기와 반응하는데 보통 사용되는 해당 반응기뿐만 아니라 20가지의 공통 아미노산에 삽입되지만 비-자연적으로 암호화된 아미노산 내 존재 하는 상보적 작용기와 특이적으로 반응하는 작용기를 포함할 수 있다. PEG의 다른 말단(상기 화학식에서 Y 로 나타냄)은 자연적으로 발생하는 또는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 통해 킬렉신 폴리펩타이드에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다는 것이 주목된다. 예를 들어, Y 는 폴리펩타이드의 아민 기(이에 제한되는 것은 아니지만, 리신 또는 N -말단의 엡실론 아민)에 아마이드, 카바메이트 또는 유레아 결합될 수 있다. 대안적으로, Y 는 티올 기에 말레이미드 결합될 수 있다(이에 제한되는 것은 아니지만, 시스테인의 티올 기). 대안적으로, Y 는 20가지 보통의 아미노산을 통해 보통 접근가능하지 않은 잔기에 대한 결합될 수 있다. 예를 들어, PEG 상의 아자이드 기는 킬렉신 폴리펩타이드 상의 알킬렌 기와 반응되어 Huisgen [3+2] 사이클로첨가 생성물을 형성할 수 있다. 대안적으로, PEG 상의 알킬렌 기는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 존재 하는 아자이드 기와 반응되어 유사한 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 강한 친핵체(이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드라진, 하이드라자이드, 하이드록실 아민, 세미카바자이드)는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 존재 하는 알데하이드 또는 케톤 기와 반응되어 하이드라존, 옥심 또는 세미카바존을 형성할 수 있는데, 적용가능하다면, 일부 경우에 적절한 환원제로 처리에 의해 추가로 환원될 수 있다. 대안적으로, 강한 친핵체는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 통해 킬렉신 폴리펩타이드 내로 포함될 수 있고, 수용성 폴리머에 존재 하는 케톤 또는 알데하이드와 우선적으로 반응하기 위해 사용된다.
- [0733] PEG에 대한 임의의 분자량은 실제로 원하는 것과 같이, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약 100 달톤(Da) 내지 100,000Da 또는 원한다면 초과(이에 제한되는 것은 아니지만, 때때로 0.1 내지 50kDa 또는 10 내지 40kDa)로서 사용될 수 있다. PEG의 분자량은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약 100Da 내지 약 100,000Da 또는 초과를 포함하는 넓은 범위를 가질 수 있다. PEG는 약 100Da 내지 약 100,000Da, 이에 제한되는 것은 아니지만, 100,000Da, 95,000Da, 90,000Da, 85,000Da, 80,000Da, 75,000Da, 70,000Da, 65,000Da, 60,000Da, 55,000Da, 50,000Da, 45,000Da, 40,000Da, 35,000Da, 30,000Da, 25,000Da, 20,000Da, 15,000Da, 10,000Da, 9,000Da, 8,000Da, 7,000Da, 6,000Da, 5,000Da, 4,000Da, 3,000Da, 2,000Da, 1,000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da 및 100 Da에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 100Da 내지 약 50,000Da 이다. 일부 실시형태에서, PEG 약 100Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 1,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 5,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 10,000Da 내지 약 40,000Da이다. 1 내지 100kDa(이에 제한되는 것은 아니지만, 1 내지 50kDa 또는 5 내지 20kDa)의 범위에 있는 MW를 갖는 각 쇄를 지니는 PEG 분자를 포함하는 분지쇄 PEG가 또한 사용될 수 있다. 분지

쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약 1,000Da 내지 약 100,000Da 또는 초과일 수 있다. 분지쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 100,000Da, 이에 제한되는 것은 아니지만, 100,000Da, 95,000Da, 90,000Da, 85,000Da, 80,000Da, 75,000Da, 70,000Da, 65,000Da, 60,000Da, 55,000Da, 50,000Da, 45,000Da, 40,000Da, 35,000Da, 30,000Da, 25,000Da, 20,000Da, 15,000Da, 10,000Da, 9,000Da, 8,000Da, 7,000Da, 6,000Da, 5,000Da, 4,000Da, 3,000Da, 2,000Da 및 1,000Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, 분지쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 50,000Da이다. 일부 실시형태에서, 분지쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 분지쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 5,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 분지쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 5,000Da 내지 약 20,000Da이다. 넓은 범위의 PEG 분자가, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 명세서에 참조로서 포함되는 문헌[Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog]에 기재되어 있다.

[0734] 일반적으로, PEG 분자의 적어도 하나의 말단은 비-자연적으로 암호화된 아미노산과 반응을 위해 이용가능하다. 예를 들어, 아미노산 측쇄와 반응을 위한 PEG 유도체 함유 알카인 및 아자이드 모이어티는 본 명세서에 기재된 바와 같이 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 PEG를 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 아자이드를 포함한다면, PEG는 [3+2] 사이클로첨가 생성물의 형성을 달성하는 알카인 모이어티 또는 아미드 결합의 형성을 달성하는 포스핀 기를 함유하는 활성화된 PEG 중(즉, 에스터, 카보네이트) 중 하나를 전형적으로 함유할 것이다. 대안적으로, 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 알카인을 포함한다면, PEG는 [3+2] Huisgen 사이클로첨가 생성물의 형성을 달성하는 아자이드 모이어티를 전형적으로 함유할 것이다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산이 카보닐 기를 포함한다면, PEG는 대응하는 하이드라존, 옥심 및 세미카바존 결합의 형성을 각각 달성하기 위하여 강력한 친핵체(이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드라자이드, 하이드라진, 하이드록실아민 또는 세미카바자이드 작용기)를 전형적으로 포함할 것이다. 다른 대안에서, 상기 기재된 반응기의 반대 방향이 사용될 수 있으며, 즉 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 아자이드 모이어티는 알카인을 함유하는 PEG 유도체와 반응될 수 있다.

[0735] 일부 실시형태에서, PEG 유도체를 갖는 틸렉신 폴리펩타이드 변이체는 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄 상에 존재 하는 화학적 작용기와 반응하는 화학적 작용기를 함유한다.

[0736] 본 발명은 일부 실시형태에서 약 800Da 내지 약 100,000 Da의 평균 분자량을 갖는 수용성 폴리머를 포함하는 폴리머 유도체를 함유하는 아자이드- 및 아세틸렌-을 제공한다. 수용성 폴리머의 폴리머 백본은 폴리(에틸렌 글라이콜)일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리(에틸렌)글라이콜을 포함하는 매우 다양한 수용성 폴리머 및 폴리(텍스트란) 및 폴리(프로필렌 글라이콜)를 포함하는 다른 관련된 폴리머가 본 발명의 실행에서 사용에 적합하며, 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌 글라이콜)의 사용은 모든 이러한 분자를 포괄하고, 포함하는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 용어 PEG는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 2작용성 PEG, 멀티암(multiarmed) PEG, 유도체화된 PEG, 포크형 PEG, 분지형 PEG, 현수 PEG(즉, PEG 또는 폴리머 백본에 현수된 하나 이상의 작용기를 갖는 관련 폴리머) 또는 분해성인 결합을 갖는 PEG를 포함하는 형태 중 어떤 것에서 폴리(에틸렌 글라이콜)을 포함한다.

[0737] PEG는 수중에서 전형적으로 맑고, 무색이며, 무취이고, 가용성이고, 열에 안정하며, 다수의 화학적 작용제에 비활성이고, 가수분해되거나 또는 약화되지 않으며, 일반적으로 비독성이다. 폴리(에틸렌 글라이콜)은 생체에 적합한 것으로 고려되는데, 다시 말해서 PEG는 유해함을 야기하지 않고 살아있는 조직 또는 유기체와 공존할 수 있다는 것이다. 더 구체적으로, PEG는 실질적으로 비-면역원성인데, 다시 말해서 PEG는 생체 내 면역반응을 생성하는 경향이 없다. 생물학적으로 활성인 작용제와 같이 생체 내에서 일부 바람직한 기능을 갖는 분자에 부착될 때, PEG는 작용제를 가리는 경향이 있고, 어떤 면역 반응을 감소시키거나 또는 제거시킬 수 있어서, 유기체는 작용제의 존재를 견딜 수 있다. PEG 컨쥬게이트는 실질적인 면역 반응을 생성하지 않거나 또는 응고 또는 다른 바람직하지 않은 효과를 야기하지 않는 경향이 있다. 화학식 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 를 갖는 PEG(n 은 약 3 내지 약 4000, 전형적으로 약 20 내지 약 2000임)는 본 발명에서 사용에 적합하다. 약 800Da 내지 약 100,000Da의 분자량을 갖는 PEG는 본 발명의 일부 실시형태에서 폴리머 백본으로서 특히 유용하다. PEG의 분자량은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약 100Da 내지 약 100,000Da 또는 초과인 넓은 범위를 가질 수 있다. PEG의 분자량은 약 100Da 내지 약 100,000Da, 이에 제한되는 것은 아니지만, 100,000Da, 95,000Da, 90,000Da, 85,000Da, 80,000Da, 75,000Da, 70,000Da, 65,000Da, 60,000Da, 55,000Da, 50,000Da, 45,000Da, 40,000Da, 35,000Da, 30,000Da, 25,000Da, 20,000Da, 15,000Da, 10,000Da, 9,000Da, 8,000Da, 7,000Da, 6,000Da, 5,000Da, 4,000Da, 3,000Da, 2,000Da, 1,000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da 및 100Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 100Da 내지 약 50,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG

의 분자량은 약 100Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 5,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 10,000Da 내지 약 40,000Da이다.

[0738] 폴리머 백본은 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 폴리머 백본은 당업계에 일반적으로 공지되어 있으며, 전형적으로 분지형 폴리머는 중심 분지 코어 모이어티 및 중심 분지 코어에 연결된 다수의 선형 폴리머 쇄를 가진다. PEG는 글라이세롤, 글라이세롤 올리고머, 펜타에리트리톨 및 솔비톨과 같은 다양한 폴리올에 에틸렌 산화물의 첨가에 의해 제조될 수 있는 분지된 형태로 보통 사용된다. 중심 분지 모이어티는 리신과 같은 몇몇 아미노산으로부터 유래될 수 있다. 분지된 폴리(에틸렌 글라이콜)은 일반 형태 $R(-PEG-OH)_m$ 로서 표시될 수 있으며, 여기서 R은 코어 모이어티, 예컨대 글라이세롤, 글라이세롤 올리고머 또는 펜타에리트리톨로부터 유래되며, m은 암의 수를 나타낸다. 본 명세서에 전문이 각각 참조로서 포함되는 멀티암 PEG 분자, 예컨대 미국특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 제5,229,490호; 제4,289,872호; 미국특허 2003/0143596호; WO 96/21469; 및 WO 93/21259에 기재된 것은 또한 폴리머 백본으로서 사용될 수 있다.

[0739] 분지형 PEG는 또한 $PEG(--YCH_2)_n$ 로 표시되는 포크형 PEG의 형태로 있을 수 있으며, 여기서 Y는 연결기이고, Z는 한정된 길이의 원자 쇄에 의해 연결된 활성화된 말단 기이다.

[0740] 또 다른 분지된 형태인 현수 PEG는 PEG 쇄의 말단에서보다 PEG 백본을 따라서 카복실과 같은 반응기를 가진다.

[0741] PEG의 이들 형태에 더하여, 폴리머는 또한 백본에서 약한 또는 분해성인 결합을 지니도록 제조될 수 있다. 예를 들어, PEG는 가수분해가 실시되는 폴리머 백본 내에 에스터 결합을 지니도록 제조될 수 있다. 이하에 나타난 바와 같이, 이 가수분해는 더 낮은 분자량의 단편으로 폴리머의 절단을 초래한다:

[0742] $-PEG-CO_2-PEG-H_2O \rightarrow PEG-CO_2H+HO-PEG-$

[0743] 용어 폴리(에틸렌 글라이콜) 또는 PEG는 이에 제한되는 것은 아니지만 본 명세서에 개시된 것을 포함하여 알려진 모든 형태를 표시하거나 또는 포함한다는 것이 당업자에 의해 이해된다.

[0744] 다수의 다른 폴리머가 또한 본 발명에서 사용에 적합하다. 일부 실시형태에서, 2 내지 약 300개의 말단을 갖는 수용성인 폴리머 백본은 본 발명에서 특히 유용하다. 적합한 폴리머의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리(알킬렌 글라이콜), 예컨대 (프로필렌 글라이콜)("PPG"), 이것의 공중합체(이에 제한되는 것은 아니지만, 에틸렌 글라이콜 및 프로필렌 글라이콜의 공중합체), 이것의 삼중합체, 이것의 혼합물 등을 포함한다. 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량이 다를 수 있지만, 전형적으로 약 800Da 내지 약 100,000Da, 종종 약 6,000Da 내지 약 80,000 Da의 범위 내에 있다. 폴리머 백본의 각 쇄의 분자량은 약 100Da 내지 약 100,000Da, 이에 제한되는 것은 아니지만, 100,000Da, 95,000Da, 90,000Da, 85,000Da, 80,000Da, 75,000Da, 70,000Da, 65,000Da, 60,000Da, 55,000Da, 50,000Da, 45,000Da, 40,000Da, 35,000Da, 30,000Da, 25,000Da, 20,000Da, 15,000Da, 10,000Da, 9,000Da, 8,000Da, 7,000Da, 6,000Da, 5,000Da, 4,000Da, 3,000Da, 2,000Da, 1,000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da 및 100Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량은 약 100Da 내지 약 50,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량은 약 100Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량은 약 1,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량은 약 5,000Da 내지 약 40,000Da이다. 일부 실시형태에서, 폴리머 백본의 각각의 쇄의 분자량은 약 10,000Da 내지 약 40,000Da이다.

[0745] 당업자는 실질적으로 수용성인 백본에 대해 앞서 언급한 목록이 결코 완벽하지 않으며, 단지 예시적이고, 상기 기재된 성질을 갖는 모든 폴리머 물질은 본 발명에서 사용에 적합한 것으로 고려된다는 것을 인식할 것이다.

[0746] 본 발명의 일부 실시형태에서, 폴리머 유도체는 "멀티-작용성"인데, 이는 폴리머 백본이 적어도 2개의 말단, 가능하다면 약 300개만큼 많은 말단을 가지며, 작용기에 의해 작용화되거나 또는 활성화된다는 것을 의미한다. 다작용성 폴리머 유도체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 2개의 말단을 갖는 선형 폴리머를 포함하며, 각각의 말단은 동일 또는 상이할 수 있는 작용기에 결합된다.

[0747] 한 실시형태에서, 폴리머 유도체는 다음의 구조식을 가진다:

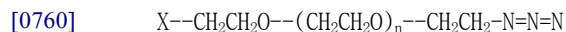
[0748] $X-A-POLY-B-N=N=N$

[0749] 상기 식에서:

- [0750] N=N=N은 아자이드 모이어티이고;
- [0751] B는 연결 모이어티인데, 이는 존재할 수도 있고 또는 없을 수도 있으며;
- [0752] POLY는 수용성 비-항원성 폴리머이고;
- [0753] A는 연결 모이어티인데, 이는 존재할 수도 있고 또는 없을 수도 있으며, B와 동일할 수도 있고 또는 상이할 수도 있으며;
- [0754] X는 제2 작용기이다.
- [0755] A 및 B에 대한 연결 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 18개까지를 함유하는 다중-작용화된 알킬기를 포함하며, 1 내지 10개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 질소, 산소 또는 황과 같은 헤테로원자는 알킬쇄에 포함될 수 있다. 알킬쇄는 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 10개까지를 함유하는 다중 작용화된 아릴기를 포함하며, 5 내지 6개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적합한 연결기의 다른 예는 미국특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 및 미국특허 출원 공개 2003/0143596호에 기재된 해당 연결기를 포함하는데, 이것의 각각은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 당업자는 연결 모이어티에 대해 앞서 언급한 목록이 결코 완벽하지 않으며, 단지 예시적이라는 것을 인식할 것이고, 상기 기재된 성질을 갖는 모든 폴리머 물질은 본 발명에서 사용에 적합한 것으로 고려된다는 것을 인식할 것이다.
- [0756] X로서 사용을 위한 적합한 작용기의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스터, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 에스터 및 1-벤조트라이아졸릴 에스터, 활성 카보네이트, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트 및 1-벤조트라이아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라자이드, 보호된 하이드라자이드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 아이소시아네이트, 아이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세타마이드, 에폭사이드, 글라이옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아자이드를 포함한다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는와 호환성이어야 하며, 따라서 아자이드 기와 반응은 일어나지 않는다. 아자이드-함유 폴리머 유도체는 호모2작용성(homobifunctional)일 수 있는데, 이는 제2 작용기(즉, X)가 또한 아자이드 모이어티 또는 헤테로2작용성이라는 것을 의미하며, 제2 작용기는 상이한 작용기라는 것을 의미한다.
- [0757] 용어 "보호된"은 특정 반응 조건 하에 화학적으로 반응성인 작용기의 반응을 방지하는 보호기 또는 모이어티의 존재를 지칭한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응기의 유형에 따라서 다를 것이다. 예를 들어, 화학적 반응기가 아민 또는 하이드라자이드라면, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오렌메톡시카보닐(Fmoc)의 기로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응기가 티올이라면, 보호기는 오소피리딜다이설파이드일 수 있다. 화학적 반응기가 카복실산, 예컨대 뷰탄산 또는 프로피온산 또는 하이드록실 기라면, 보호기는 벤질 또는 알킬 기, 예컨대 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 당업계에 공지된 다른 보호기는 또한 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0758] 문헌에서 말단 작용기의 구체적 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, N-숙신이미딜 카보네이트(예를 들어, 미국특허 제5,281,698호, 제5,468,478호), 아민(예를 들어, 문헌[Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)] 참조), 하이드라자이드(예를 들어, 문헌[Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)] 참조), 숙신이미딜 프로피오네이트 및 숙신이미딜 뷰타노에이트(예를 들어, 문헌[Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997] 참조; 또한 미국특허 제5,672,662호 참조), 숙신이미딜 숙시네이트(예를 들어 문헌[Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) 및 Joppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979)] 참조), 숙신이미딜 에스터(예를 들어, 미국특허 제4,670,417호 참조), 벤조트라이아졸릴 카보네이트(예를 들어, 미국특허 제5,650,234호 참조), 글라이시딜 에터(예를 들어, 문헌[Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)] 참조), 옥시카보닐이미다졸(예를 들어, 문헌[Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985) 참조), p-나이트로페닐 카보네이트(예를 들어, 문헌[Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); 및 Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)] 참조), 알데하이드(예를 들어, 문헌[Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)], 미국특허 제5,824,784호, 미국특허 제5,252,714호 참조), 말레이미드(예를 들어, 문헌[Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984) 및 Kogan, Synthetic

Comm. 22:2417 (1992)] 참조), 오쏘피리딘-다이설파이드(예를 들어, 문헌[Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993)] 참조), 아크릴롤(예를 들어, 문헌[Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)] 참조), 비닐 설폰(예를 들어, 미국특허 제5,900,461호 참조)를 포함한다. 상기 참고문헌 및 특허 모두는 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0759] 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리머 유도체는 다음 구조를 갖는 폴리머 백본을 포함한다:



[0761] 상기 식에서:

[0762] X는 상기 기재한 바와 같은 작용기이고; n은 약 20 내지 약 4000이다.

[0763] 다른 실시형태에서, 본 발명의 폴리머 유도체는 다음의 구조를 갖는 폴리머 백본을 포함한다:

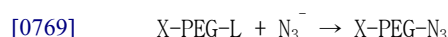


[0765] 상기 식에서:

[0766] W는 1 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 지방족 또는 방향족 링커 모이어티이고; n은 약 20 내지 약 4000이며;

[0767] X는 상기 기재한 바와 같은 작용기이고, m은 1 내지 10이다.

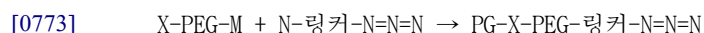
[0768] 본 발명의 아자이드-함유 PEG 유도체는 당업계에 공지된 및/또는 본 명세서에 개시된 다수의 방법에 의해 제조될 수 있다. 한 방법에서, 이하에 나타낸 바와 같이, 수용성 폴리머 백본은 약 800Da 내지 약 100,000Da의 평균 분자량을 가지며, 해당 폴리머 백본은 제1 작용기에 결합된 제1 말단 및 적합한 이탈기에 결합된 제2 말단을 가지고, 아자이드 음이온(이는 다수의 적합한 반대-이온 중 어떤 것, 예컨대 나트륨, 칼륨, tert-부틸암모늄 등과 쌍을 이룰 수 있음)과 반응된다. 이탈기는 친핵성 치환을 겪으며, 아자이드 모이어티로 대체되어 원하는 아자이드-함유 PEG 폴리머를 얻는다.



[0770] 나타낸 바와 같이, 본 발명에서 사용을 위한 적합한 폴리머 백본은 화학식 X-PEG-L을 가지되, PEG는 폴리(에틸렌 글라이콜)이며, X는 아자이드 기와 반응성이 아닌 작용기이며, L은 적합한 이탈기이다. 적합한 작용기의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드록실, 보호된 하이드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 하이드라자이드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 말레이미드, 다이티오피리딘 및 비닐 피리딘 및 케톤을 포함한다. 적합한 이탈기의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트를 포함한다.

[0771] 본 발명의 아자이드-함유 폴리머 유도체의 다른 제조방법에서, 아자이드 작용기를 함유하는 결합체는 약 800Da 내지 약 100,000Da의 평균 분자량을 갖는 수용성 폴리머 백본과 접촉되되, 결합체는 PEG 폴리머 상의 화학적 작용기와 선택적으로 반응할 화학적 작용기를 함유하여 아자이드-함유 폴리머 유도 생성물을 형성하고, 아자이드는 결합체에 의해 폴리머 백본으로부터 분리된다.

[0772] 대표적인 반응식을 이하에 나타낸다:



[0774] 상기 식에서:

[0775] PEG는 폴리(에틸렌 글라이콜)이며, X는 알콕시와 같은 캡핑 기 또는 상기 기재한 것과 같은 작용기이고;

[0776] M은 아자이드 작용기와 반응성이 아닌 작용기이지만, N 작용기와 효율적으로 및 선택적으로 반응하지 않을 것이다.

[0777] 적합한 작용기의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, N이 아민이라면 M은 카복실산, 카보네이트 또는 활성 에스터를 포함하며; N이 하이드라자이드 또는 아미노옥시 모이어티라면 M은 케톤이고; N이 친핵체라면, M은 이탈기이다.

[0778] 조질 생성물의 정제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 생성물의 침전을 포함하는 공지된 방법 다음에 필요하면 크로마토그래피가 수행될 수 있다.

- [0779] 더 구체적인 예는 PEG 다이아민의 경우에서 이하에 나타내며, 여기서 아민 중 하나는 tert-부틸-Boc과 같은 보호기 모이어티에 의해 보호되고, 얻어진 1-보호된 PEG 다이아민은 아자이드 작용기를 함유하는 연결 모이어티와 반응된다:
- [0780] $\text{BocHN-PEG-NH}_2 + \text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}=\text{N}=\text{N}$
- [0781] 이 예에서, 아민 기는 다양한 활성화제, 예컨대 염화티오닐 또는 카보다이이미드 시약 및 N-하이드록시숙신이미드 또는 N-하이드록시벤조트라이아졸을 사용하여 카복실산 기에 커플링되어 모노아민 PEG 유도체와 아자이드-함유 링커 모이어티 사이에 아마이드 결합을 만들 수 있다. 아마이드 결합의 성공적인 형성 후, 얻어진 N-tert-부틸-Boc-보호된 아자이드-함유 유도체는 생활성 분자를 변형시키기 위해 직접 사용될 수 있고, 또는 다른 유용한 작용기를 붙이기 위해 추가로 만들어 질 수 있다. 예를 들어, N-t-Boc 기는 강산으로 처리에 의해 가수분해되어 오메가-아미노-PEG-아자이드를 만들어낼 수 있다. 얻어진 아민은 중요한 헤테로2작용성 시약을 만들기 위해 다른 유용한 작용기, 예컨대 말레이미드 기, 활성화된 다이설파이드, 활성화된 에스터 등을 붙이도록 합성 조작으로서 사용될 수 있다.
- [0782] 헤테로2작용성 유도체는 폴리머의 각 말단에 상이한 분자를 부착할 것이 요망될 때 특히 유용하다. 예를 들어, 오메가-N-아미노-N-아지도 PEG는 PEG의 한 말단에 활성화된 친전자성 기, 예컨대 알데하이드, 케톤, 활성화된 에스터, 활성화된 카보네이트 등을 갖는 분자 및 PEG의 다른 말단에 아세틸렌 기를 갖는 분자의 부착을 허용한다.
- [0783] 본 발명의 다른 실시형태에서, 폴리머 유도체는 다음의 구조를 가진다:
- [0784] $\text{X-A-POLY-B-C}\equiv\text{C-R}$
- [0785] 상기 식에서:
- [0786] R은 H 또는 알킬, 알켄, 알킬옥시, 또는 아릴 또는 치환된 아릴 기일 수 있으며;
- [0787] B는 연결 모이어티인데, 이는 존재할 수도 있고 없을 수도 있으며;
- [0788] POLY는 수용성 비-항원성 폴리머이고;
- [0789] A는 연결 모이어티인데, 이는 존재할 수도 있고 없을 수도 있으며, B와 동일 또는 상이할 수 있고;
- [0790] X는 제2 작용기이다.
- [0791] A 및 B의 연결 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 18개까지를 함유하는 다중-작용화된 알킬 기를 포함하며, 1 내지 10개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 헤테로원자, 예컨대 질소, 산소 또는 황은 알킬 쇄와 함께 포함될 수 있다. 알킬 쇄는 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 10개까지를 함유하는 다중 작용화된 아릴 기를 포함하며, 5 내지 6개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 아릴 기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적합한 연결 기의 다른 예는 본 명세서에 각각 참조로서 포함된 미국특허 제5,932,462호 및 제5,643,575호 및 미국특허 출원 공개 2003/0143596호에 기재된 해당 연결 기를 포함한다. 당업자는 연결 모이어티에 대해 앞서 언급한 목록이 결코 완벽하지 않으며, 단지 예시적이고, 상기 기재된 성질을 갖는 모든 폴리머 물질은 본 발명에서 사용에 적합한 것으로 고려된다는 것을 인식할 것이다.
- [0792] X로서 사용에 적합한 작용기의 예는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스터, 예컨대 N-하이드록시숙신이미드 에스터 및 1-벤조트라이아졸릴 에스터, 활성 카보네이트, 예컨대 N-하이드록시숙신이미드 카보네이트 및 1-벤조트라이아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라자이드, 보호된 하이드라자이드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 아이소시아네이트, 아이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세타마이드, 에폭사이드, 글라이옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트 및 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아세틸렌을 포함한다. 상기 이해되는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는 아세틸렌 기와 호환성이어야 하며, 따라서 아세틸렌 기와 반응은 일어나지 않는다. 아세틸렌-함유 폴리머 유도체는 호모이작용성일 수 있는데, 이는 제2 작용기(즉, X)가 또한 아세틸렌 모이어티 또는 헤테로2작용성이라는 것을 의미하며, 제2 작용기는 상이한 작용기라는 것을 의미한다.
- [0793] 본 발명의 다른 실시형태에서, 폴리머 유도체는 하기 구조를 갖는 폴리머 백본을 포함한다:

- [0794] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C\equiv CH$
- [0795] 상기 식에서:
- [0796] X는 상기 기재된 바와 같은 작용기이고;
- [0797] n은 약 20 내지 약 4000이며;
- [0798] m은 1 내지 10이다.
- [0799] 각각의 하테로2작용성 PEG 폴리머의 구체적 예는 이하에 나타낸다.
- [0800] 본 발명의 아세틸렌-함유 PEG 유도체는 당업자에게 공지되고/되거나 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 한 방법에서, 수용성 폴리머 백본은 약 800Da 내지 약 100,000Da의 평균 분자량을 가지며, 해당 폴리머 백본은 제1 작용기에 결합된 제1 말단 및 적합한 친핵성 기에 결합된 제2 말단을 가지고, 아세틸렌 작용기와 PEG 상의 친핵성 기와 반응에 적합한 이탈기를 둘 다 함유하는 화합물과 반응된다. 친핵성 모이어티를 함유하는 PEG 폴리머 및 이탈기를 함유하는 분자가 조합될 때, 이탈기는 친핵성 치환을 겪으며, 친핵성 모이어티로 대체되고, 원하는 아세틸렌-함유 폴리머를 얻는다.
- [0801] $X-PEG-Nu + L-A-C \rightarrow X-PEG-Nu-A-C\equiv CR'$
- [0802] 나타내는 바와 같이, 반응에서 사용을 위한 바람직한 폴리머 백본은 화학식 X-PEG-Nu을 가지되, PEG는 폴리(에틸렌 글라이콜)이고, Nu은 친핵성 모이어티이며 X는 Nu, L 또는 아세틸렌 작용기와 반응성이 아닌 작용기이다.
- [0803] Nu의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 주로 SN2-형 메커니즘을 통해 반응하는 아민, 알콕시, 아릴옥시, 설프하이드릴, 이미노, 카복실레이트, 하이드라자이드, 아미노옥시기를 포함한다. Nu 기의 추가적인 예는 주로 친핵성 첨가 반응을 통해 반응되는 해당 작용기를 포함한다. L 기의 예는, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트 및 친핵성 치환을 겪을 것으로 예상되는 다른 기뿐만 아니라 케톤, 알데하이드, 티오에스터, 올레핀, 알파-베타 불포화된 카보닐기, 카보네이트 및 친핵체에 의한 첨가를 겪을 것으로 예상되는 다른 친전자성 기를 포함한다.
- [0804] 본 발명의 다른 실시형태에서, A는 1 내지 10개의 탄소 원자의 지방족 링커 또는 6 내지 14개의 탄소 원자의 치환된 아릴 고리이다. X는 아자이드 기와 반응되지 않는 작용기이며, L은 적합한 이탈기이다.
- [0805] 본 발명의 아세틸렌-함유 폴리머 유도체의 제조를 위한 다른 방법에서, 약 800Da 내지 약 100,000Da의 평균 분자량을 가지며, 한 말단에서 보호된 작용기 또는 캡핑 작용제 및 다른 말단에서 적합한 이탈기를 함유하는 PEG 폴리머는 아세틸렌 음이온에 의해 접촉된다.
- [0806] 대표적인 반응식은 이하에 나타낸다;
- [0807] $X-PEG-L + C\equiv CR' \rightarrow X-PEG-C\equiv CR'$
- [0808] 상기 식에서:
- [0809] PEG는 폴리(에틸렌 글라이콜)이며, X는 알콕시와 같은 캡핑기 또는 상기 기재된 바와 같은 작용기이고;
- [0810] R'은 H, 알킬, 알콕시, 아릴 또는 아릴옥시 기 또는 치환된 알킬, 알콕실, 아릴 또는 아릴옥시 기 중 하나이다.
- [0811] 상기 예에서, 이탈기 L은 충분한 농도의 아세틸렌 음이온과 접촉될 때 SN2-형 치환을 겪도록 충분히 반응성이어야 한다. 아세틸렌에 의한 이탈기의 SN2 치환을 수행하는데 필요한 반응 조건은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0812] 조절 생성물의 정제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 생성물의 침전 후 필요하다면 크로마토그래피를 포함하는 당업계에 공지된 방법에 의해 보통 수행될 수 있다.
- [0813] 수용성 폴리머는 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드에 연결될 수 있다. 수용성 폴리머는 틸렉신 폴리펩타이드에 포함된 비-자연적으로 암호화된 아미노산 또는 비-자연적으로 암호화된 또는 자연적으로 암호화된 아미노산의 임의의 작용기 또는 치환체 또는 비-자연적으로 암호화된 또는 자연적으로 암호화된 아미노산에 첨가된 임의의 작용기 또는 치환체를 통해 연결될 수 있다. 대안적으로, 수용성 폴리머는 자연적으로 발생하는 아미노산을 통해 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드에 연결된다(이에 제한되는 것은 아니지만, N-말단 잔기의 시스테인, 리신 또는 아민 기). 일부 경우에, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 비-천연 아미노산을 포함하되, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산(들)은 수용성

폴리머(들)(이에 제한되는 것은 아니지만, PEG 및/또는 올리고당)에 연결된다. 일부 경우에, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 수용성 폴리머에 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 초과와 자연적으로-암호화된 아미노산(들)을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 수용성 폴리머에 연결된 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산(들) 및 수용성 폴리머에 연결된 하나 이상의 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 사용된 수용성 폴리머는 비컨쥬게이트 형태에 비해 틸렉신 폴리펩타이드의 혈청 반감기를 향상시킨다.

[0814] 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드에 연결된 수용성 폴리머의 수(즉, 폐길화 또는 글라이코실화 정도)는 생체내 반감기와 같은 변경된(이에 제한되는 것은 아니지만, 증가되거나 또는 감소된) 약물학적, 약동학적, 또는 약력학적 특징을 제공하도록 조절될 수 있다. 일부 실시형태에서, 틸렉신의 반감기는 비변형 폴리펩타이드보다 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 백분율, 2-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 20-배, 25-배, 30-배, 35-배, 40-배, 50-배 또는 적어도 약 100-배 증가된다.

[0815] **강한 친핵성 기(즉, 하이드라자이드, 하이드라진, 하이드록실아민 또는 세미카바자이드)를 함유하는 PEG 유도체**

[0816] 본 발명의 한 실시형태에서, 카보닐-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 PEG 백본에 직접 연결된 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다.

[0817] 일부 실시형태에서, 하이드록실아민-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0818] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0819] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다(즉, 평균 분자량은 5 내지 40kDa이다).

[0820] 일부 실시형태에서, 하이드라진- 또는 하이드라자이드-함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0821] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0822] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이고, X는 선택적으로 존재 하거나 없을 수 있는 카보닐 기(C=O)이다.

[0823] 일부 실시형태에서, 세미카바자이드-함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0824] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0825] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다.

[0826] 본 발명의 다른 실시형태에서, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 아마이드 결합에 의해 PEG 백본에 연결되는 말단 하이드록실아민, 하이드라자이드, 하이드라진 또는 세미카바자이드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다

[0827] 일부 실시형태에서, 하이드록실 아민-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가진다:

[0828] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$

[0829] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다(즉, 평균 분자량은 5 내지 40kDa이다).

[0830] 일부 실시형태에서, 하이드라진- 또는 하이드라자이드-함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가지며:

[0831] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0832] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이며, X는 선택적으로 존재 하거나 없을 수 있는 카보닐 기(C=O)이다.

[0833] 일부 실시형태에서, 세미카바자이드-함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가진다:

[0834] $R-O-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0835] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다.

- [0836] 본 발명의 다른 실시형태에서, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라자이드 또는 세미카바자이드 모이더를 함유하는 분지된 PEG 유도체에 의해 변형되며, 각 분지된 PEG의 각각의쇄는 10 내지 40kDa의 범위에 있는 MW를 가지고, 5 내지 20kDa일 수 있다.
- [0837] 본 발명의 다른 실시형태에서, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 분지된 구조를 갖는 PEG 유도체로 변형된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 하이드라진- 또는 하이드라자이드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:
- [0838] $[R_0-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$
- [0839] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이고, X는 선택적으로 존재 하거나 없을 수 있는 카보닐 기($C=O$)이다.
- [0840] 일부 실시형태에서, 세미카바자이드 기를 함유하는 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0841] $[R_0-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$
- [0842] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S, C(O)이거나 또는 존재 하지 않고, m은 2 내지 10이며 n은 100 내지 1,000이다.
- [0843] 일부 실시형태에서, 하이드록실아민 기를 함유하는 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0844] $[R_0-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$
- [0845] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S, C(O)이거나 또는 존재 하지 않고, m은 2 내지 10이며 n은 100 내지 1,000이다.
- [0846] 수용성 폴리머(들)이 틸렉신 폴리펩타이드에 연결된 정도 및 부위는 틸렉신 폴리펩타이드 수용체에 틸렉신 폴리펩타이드의 결합을 조절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합은 정렬되므로 틸렉신 폴리펩타이드는 문헌 [Spencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867(1988)]에서 기재된 것과 같은 평형상태 결합 분석에 의해 측정되는 바와 같은 약 400 nM 이하의 Kd, 150nM이하의 Kd, 및 일부 경우에는 약 100 nM 이하의 Kd를 갖는 틸렉신 폴리펩타이드 수용체에 결합된다.
- [0847] 폴리머의 활성화뿐만 아니라 펩타이드의 컨쥬게이션을 위한 방법 및 화학물질은 문헌에 기재되며, 당업계에 공지되어 있다. 폴리머의 활성화를 위해 흔히 사용되는 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 브롬화시아노젠, 과요오드산 염, 글루타르알데하이드, 바이오폭사이드, 에피클로로하이드린, 다이비닐설폰, 카보다이이미드, 설포닐 할로겐화물, 트라이클로로트라이아진 등을 갖는 작용기의 활성화를 포함한다. (문헌[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] 참조).
- [0848] PEG의 작용화 및 컨쥬게이션 상의 몇몇 검토 및 논문이 이용가능하다. 예를 들어, 문헌[Hams, 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)]을 참조한다.
- [0849] 폴리머의 활성화를 위한 방법은 또한 WO 94/17039, 미국특허 제5,324,844호, WO 94/18247, WO 94/04193, 미국특허 제5,219,564, 미국특허 제5,122,614호, WO 90/13540, 미국특허 제5,281,698호 및 WO 93/15189에서 찾을 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 혈액응고인자 VIII(WO 94/15625), 헤모글로빈(WO 94/09027), 산소 운반 분자(미국특허 제4,412,989), 리보뉴클레아제 및 슈퍼옥사이드 디스무타제(Veronese et al., App, Biochem. Biotech. 11: 141-52(1985))를 포함하는 활성화된 폴리머와 효소 사이의 컨쥬게이션에 대해 찾을 수 있다. 인용된 모든 참고문헌 및 특허는 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0850] p-아지도-L-페닐알라닌과 같은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 틸렉신 폴리펩타이드의 페길화(즉, 임의의 수용성 폴리머의 첨가)는 임의의 편리한 방법에 의해 수행된다. 예를 들어, 틸렉신 폴리펩타이드는 알카인-종결된 mPEG 유도체로 페길화된다. 간략하게 과량의 고체 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH가 실온에서 교반되면서 p-아지도-L-Phe-함유 틸렉신 폴리펩타이드의 수용액에 첨가된다. 전형적으로, 수용액은 반응이 수행되

는 pH(일반적으로 약 pH 4 내지 10) 근처의 pKa를 갖는 완충제로 완충된다. 예를 들어 pH 7.5에서 폐길화를 위한 적합한 완충제의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, HEPES, 포스페이트, 보레이트, TRIS-HCl, EPPS 및 TES를 포함한다. pH는 연속적으로 모니터링되며, 필요하다면 조절된다. 반응은 전형적으로 약 1 내지 48 시간 동안 지속된다.

[0851] 이후에 반응 생성물에 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH 및 차단되지 않은 PEG가 분자의 양 말단에서 활성화될 때 형성될 수 있는 폐길화된 틸렉신 폴리펩타이드의 임의의 고분자량 복합체로부터 폐길화된 틸렉신 폴리펩타이드 변이체를 분리시키는 소수성 상호작용 크로마토그래피가 실시되고, 이에 의해 틸렉신 폴리펩타이드 변이체 분자는 가교된다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 동안 조건은 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH가 칼럼을 통해 흐르는 반면, 임의의 가교된 폐길화 틸렉신 폴리펩타이드 변이체 복합체는 하나 이상의 PEG 기에 컨쥬게이트된 하나의 틸렉신 폴리펩타이드 변이체 분자를 함유하는 원하는 형태 다음에 용리되는 것이다. 적합한 조건은 원하는 컨쥬게이트에 대한 가교 복합체의 상대적 크기에 따라 다르며, 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 원하는 컨쥬게이트를 함유하는 용리액은 초미세여과에 의해 농축되며, 정용여과에 의해 탈염된다.

[0852] 필요하다면, 소수성 크로마토그래피로부터 얻어진 폐길화된 틸렉신 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 친화성 크로마토그래피; 음이온- 또는 양이온- 교환 크로마토그래피(이에 제한되는 것은 아니지만, DEAE SEPHAROSE를 사용); 실리카 상의 크로마토그래피; 역상 HPLC; 겔 여과(이에 제한되는 것은 아니지만, SEPHADEX G-75); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기-배제 크로마토그래피, 금속-킬레이트 크로마토그래피; 초미세여과/정용여과; 에탄올 침전; 암모늄 설페이트 침전; 크로마토포키싱; 치환 크로마토그래피; 전기영동법(이에 제한되는 것은 아니지만, 분취 등전점 포커싱, 차별적인 용해도(이에 제한되는 것은 아니지만, 암모늄 설페이트 침전) 또는 추출을 포함하는 당업자에게 공지된 하나 이상의 과정에 의해 추가로 정제될 수 있다. 분명한 분자량은 공모양 단백질 표준과 비교함으로써 GPC에 의해 추정될 수 있다(Preneta, AZ in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH(Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). 틸렉신-PEG 컨쥬게이트의 순도는 단백질 분해(이에 제한되는 것은 아니지만, 트립신 절단) 후 질량분석법 분석에 의해 평가될 수 있다. 문헌[Pepinsky RB., et al., J, Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001)].

[0853] 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드의 아미노산에 연결된 수용성 폴리머는 제한없이 추가로 유도체화되거나 또는 치환될 수 있다.

[0854] 아자이드-함유 PEG 유도체

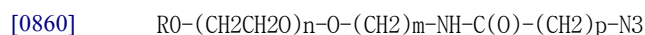
[0855] 본 발명의 다른 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄 상에 존재 하는 알카인 모이어티와 반응할 아자이드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다. 일반적으로, PEG 유도체는 1 내지 100kDa, 일부 실시형태에서 10 내지 40kDa 범위의 평균 분자량을 가질 것이다.

[0856] 일부 실시형태에서, 아자이드-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0858] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다(즉, 평균 분자량은 5 내지 40kDa이다).

[0859] 다른 실시형태에서, 아자이드-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0861] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, p는 2 내지 10이고 n은 100 내지 1,000이다(즉, 평균 분자량은 5 내지 40kDa이다).

[0862] 본 발명의 다른 실시형태에서, 알카인-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 10 내지 40kDa 범위에 있는 MW를 갖는 분지된 PEG의 각 쇄와 함께 말단 아자이드 모이어티를 함유하는 분지된 PEG 유도체에 의해 변형되며, 5 내지 20kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 아자이드-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0864] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, p는 2 내지 10이고, n은 100 내지 1,000이며, X는 선택적으로 각 경우에 존재할 수 있고 없을 수 있는 O, N, S 또는 카보닐 기(C=O)이다.

[0865] **알카인-함유 PEG 유도체**

[0866] 본 발명의 다른 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄 상에 존재 하는 아자이드 모이어티와 반응하는 알카인 모이어티를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다.

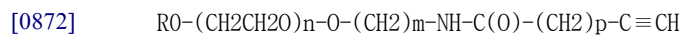
[0867] 일부 실시형태에서, 알카인-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:



[0869] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, n은 100 내지 1,000이다(즉, 평균 분자량은 5 내지 40kDa이다).

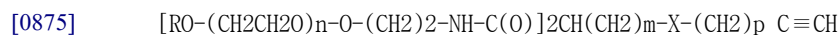
[0870] 본 발명의 다른 실시형태에서, 알카인-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 아자이드 결합에 의해 PEG 백본에 연결된 말단 아자이드 또는 말단 알카인 모이어티를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다.

[0871] 일부 실시형태에서, 알카인-말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0873] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, p는 2 내지 10이고, n은 100 내지 1,000이다.

[0874] 본 발명의 다른 실시형태에서, 아자이드-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 10 내지 40kDa 범위에 있는 MW를 갖는 분지된 PEG의 각 쇄와 함께 말단 아자이드 모이어티를 함유하는 분지된 PEG 유도체에 의해 변형되며, 5 내지 20kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 알카인-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

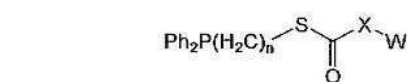


[0876] R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2 내지 10이며, p는 2 내지 10이고, n은 100 내지 1,000이며, X는 선택적으로 O, N, S 또는 카보닐 기($C=O$)이거나 또는 존재 하지 않는다.

[0877] **포스핀-함유 PEG 유도체**

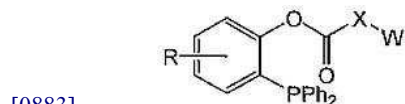
[0878] 본 발명의 다른 실시형태에서, 틸렉신 폴리펩타이드는 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 측쇄 상에 존재 하는 아자이드 모이어티와 반응하는 아릴 포스핀 기를 추가로 포함하는 활성화된 작용기(이에 제한되는 것은 아니지만, 에스터, 카보네이트)를 함유하는 PEG 유도체에 의해 변형된다. 일반적으로, PEG 유도체는 1 내지 100kDa, 일부 실시형태에서 10 내지 40kDa의 범위에서 평균 분자량을 가질 것이다.

[0879] 일부 실시형태에서, PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0881] 상기 식에서 n은 1 내지 10이고; X는 O, N, S이거나 또는 존재 하지 않을 수 있고, Ph는 페닐이고, W는 수용성 폴리머이다.

[0882] 일부 실시형태에서, PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0884] X는 O, N, S이거나 또는 존재 하지 않을 수 있고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 폴리머이고 R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기일 수 있다. 대표적인 R 기는, 이에 제한되는 것은 아니지만, $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-할로젠$, $-C(O)R'$, $-CONR'R''$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-CN$ 및 $-NO_2$ 를 포함한다. R' , R'' , R''' 및 R'''' 는 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1 내지 3개의 할로젠으로 치환된 아릴을 포함하는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기 또는 아릴 알킬 기를 지칭한다. 본 발명의 화합물이 하나 이상의 R기를 포함할 때, 예를 들어, 독립적으로 선택된 각각의 R 기는 이들 기 중 하나 이상이 존재할 때 각각 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기이다.

R' 및 R"가 동일 질소 원자에 부착될 때, 그것들은 질소 원자와 조합되어 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R"는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1-피롤리디닐 및 4-모폴리닐을 포함하는 것으로 의 미된다. 치환체의 상기 논의로부터, 당업자는 용어 "알킬"이 수소 기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예컨대 할로알킬(이에 제한되는 것은 아니지만, -CF₃ 및 -CH₂CF₃) 및 아실(이에 제한되는 것은 아니지만, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂CH₃ 등)을 포함하는 것을 의미한다는 것을 이해할 것이다.

[0885] **다른 PEG 유도체 및 일반적 폐길화 기법**

[0886] 릴렉신 폴리펩타이드뿐만 아니라 폐길화 방법에 연결될 수 있는 다른 대표적인 PEG 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 명세서에 참조로서 포함된 예를 들어 미국 특허 공개 제2004/0001838호; 제2002/0052009호; 제 2003/0162949호; 제2004/0013637호; 제2003/0228274호; 제2003/0220447호; 제2003/0158333호; 제2003/0143596 호; 제2003/0114647호; 제2003/0105275호; 제2003/0105224호; 제2003/0023023호; 제2002/0156047호; 제 2002/0099133호; 제2002/0086939호; 제2002/0082345호 제2002/0072573호; 제2002/0052430호; 제2002/0040076호; 제2002/0037949호; 제2002/0002250호; 제2001/0056171호; 제2001/0044526; 제2001/0021763 호; 미국특허 제6,646,110호; 제5,824,778호; 제5,476,653호; 제5,219,564호; 제5,629,384호; 제5,736,625호; 제4,902,502호; 제5,281,698호; 제5,122,614호; 제5,473,034호; 제5,516,673호; 제5,382,657호; 제6,552,167호; 제6,610,281호; 제6,515,100호; 제6,461,603호; 제6,436,386호; 제6,214,966호; 제5,990,237호; 제5,900,461호 제5,739,208호; 제5,672,662호; 제5,446,090호; 제5,808,096호; 제5,612,460호; 제5,324,844호; 제5,252,714호; 제6,420,339호 제6,201,072호; 제6,451,346호; 제6,306,821호; 제5,559,213호; 제5,747,646호; 제5,834,594호; 제5,849,860호; 제5,980,948호 제6,004,573호; 제6,129,912호; 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, W095/13090, 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 기재된 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 PEG 분자 중 어떤 것은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 단일 쇠, 분지쇄, 멀티암 쇠, 단일 작용성, 2-작용성, 다-작용성 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 임의의 형태로 사용될 수 있다.

[0887] 추가적인 폴리머 및 이에 제한되는 것은 아니지만, 하이드록실아민(아미노옥시) PEG 유도체를 포함하는 PEG 유 도체는 본 명세서에 전문이 모두 참조로서 포함되는 다음의 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 공개 제 2006/0194256호, 미국 특허 공개 제2006/0217532호, 미국 특허 공개 제 2006/0217289호, 미국 가특허 제 60/755,338호; 미국 가특허 제60/755,711호; 미국 가특허 제 60/755,018호; 국제특허출원 제PCT/US06/49397호; WO 2006/069246; 미국 가특허 제60/743,041호; 미국 가특허 제60/743,040호; 국제특허출원 제PCT/US06/47822호; 미국 가특허 제60/882,819호; 미국 가특허 제60/882,500호; 및 미국 가특허 제60/870,594 호.

[0888] **이중성 Fc 융합 단백질**

[0889] 상기 기재된 릴렉신 화합물은 면역글로불린의 Fc 부분에 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 융합될 수 있다. 면역 글로불린은 이황화 결합에 의해 함께 보유된 폴리펩타이드 쇠를 함유하는 분자인데, 전형적으로 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 가진다. 각 쇠에서, 하나의 도메인(V)은 분자의 항체 특이성에 따라서 가변성 아미노산을 가진다. 다른 도메인(C)은 동일 분류의 분자에 공통된 상당히 일정한 서열을 가진다.

[0890] 본 명세서에서 사용되는 것과 같은 면역글로불린의 Fc 부분은 면역학 분야의 용어에 흔히 주어지는 의미를 가진 다. 구체적으로, 이 용어는 항체로부터 2개의 항원 결합 영역(Fab 단편)을 제거함으로써 얻어지는 항체 단편을 지칭한다. Fab 단편을 제거하는 한 방법은 파파인 프로테아제로 면역글로불린을 분해하는 것이다. 따라서, Fc 부분은 비공유 상호작용과 이황화 결합을 통해 결합되는 중쇄 둘 다로부터의 불변 영역의 대략 동일한 크기의 단편으로부터 형성된다. Fc 부분은 힌지 영역을 포함할 수 있으며 항체의 C-말단에 CH₂ 및 CH₃ 도메인을 통해 연장된다. 인간 및 마우스 면역글로불린에 대한 대표적인 힌지 영역은 문헌[Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C. A, K. ed., W. H. Freeman and Co., 1992]에서 찾을 수 있으며, 이것의 교시는 본 명 세서에 참조로서 포함된다. Fc 부분은 하나 이상의 글라이코실화 부위를 추가로 포함할 수 있다. 힌지 영역, CH₂ 및 CH₃ 도메인 및 하나의 N-글라이코실화 부위를 함유하는 수많은 대표적인 Fc 단백질의 아미노산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0891] 상이한 효과기 및 약동학적 특성을 갖는 인간 면역글로불린 Fc 영역의 5가지 유형이 있다: IgG, IgA, IgM, IgD

및 IgE. IgG는 혈청 내 가장 풍부한 면역글로불린이다. IgG는 또한 임의의 면역글로불린의 혈청 내 가장 긴 반감기를 가진다(23일). 다른 면역글로불린과 달리, IgG는 Fc 수용체에 결합 후 효율적으로 재순환된다. 상이한 효과기 기능을 갖는 4가지 IgG 하위부류 G1, G2, G3 및 G4가 있다. G1, G2 및 G3은 C1q와 결합하고 보체를 고정시킬 수 있는 반면 G4는 그렇게 할 수 없다. G3은 G1보다 더 효율적으로 G1q와 결합할 수 있지만, G1은 보체-연결된 세포 용해를 매개하는 것에 더 효과적이다. G2는 매우 비효율적으로 보체를 고정시킨다. IgG에서 C1q 결합 부위는 CH2 도메인의 카복시 말단 영역에 위치된다.

[0892] 모든 IgG 하위부류는 Fc 수용체(CD16, CD32, CD64)와 결합할 수 있는데, G1 및 G3이 G2 및 G4보다 더 효과적이다. IgG의 Fc 수용체 결합 영역은 CH2 도메인의 힌지와 카복시 말단 영역 둘 다에 위치한 잔기에 의해 형성된다.

[0893] IgA는 J-쇄에 의해 함께 보유된 모노머와 다이머 형태 둘 다에 존재할 수 있다. IgA는 혈청 내에서 2번째로 풍부한 Ig이지만, 단지 6일의 반감기를 가진다. IgG는 3개의 효과기 기능을 가진다. 이는 대식세포 및 호산구 상에서 IgA 특이적 수용체에 결합하며, 각각 식세포작용 및 탈과립을 구동한다. 또한 알려지지 않은 또 다른 경로를 통해 보체를 고정시킬 수 있다.

[0894] IgM은 펜타머 또는 헥사머 중 하나로서 표현되는데, 이들 둘 다 J-쇄에 의해 함께 보유된다. IgM은 5일의 혈청 반감기를 가진다. 이는 CH3 도메인 내 위치한 결합 부위를 통해 C1q에 약하게 결합한다. IgD는 혈청 내에서 3일의 반감기를 가진다. 어떤 효과기 기능이 이 Ig에 기여할 수 있는지는 명확하지 않다. IgE는 모노머 Ig이며 2.5일의 혈청 반감기를 가진다. IgE는 탈과립을 구동하는 2개의 Fc 수용체에 결합하며 전염증 작용제의 방출을 초래한다.

[0895] 원하는 생체내 효과에 의존하여, 본 발명의 이중성 융합 단백질은 상기 기재한 아이소타입 중 어떤 것을 함유하거나 또는 돌연변이된 Fc 영역을 함유할 수 있되, 보체 및/또는 Fc 수용체 결합 작용은 변경되었다. 따라서, 본 발명의 이중성 융합 단백질은 면역글로불린의 전체 Fc 부분, 면역글로불린의 Fc 부분의 단편 또는 인터페론 베타 화합물에 융합된 이들의 유사체를 함유할 수 있다.

[0896] 본 발명의 융합 단백질은 단일 쇄 단백질 또는 멀티쇄 폴리펩타이드로서 이루어질 수 있다. 2 이상의 Fc 융합 단백질이 생성되어 그것들은 Fc 영역 사이에 자연적으로 형성되는 이황화 결합을 통해 상호작용할 수 있다. 이들 멀티머는 인터페론 베타 화합물에 대해 동종일 수 있거나 또는 융합 단백질의 Fc 부분의 N-말단에서 융합된 상이한 인터페론 베타 화합물을 함유할 수 있다.

[0897] 융합 단백질의 최종 구조에도 불구하고, Fc 또는 Fc-유사 영역은 N-말단에서 융합된 인터페론 베타 화합물의 생체내 혈장 반감기를 연장시키는 작용을 할 수 있다. 또한 융합 단백질 화합물의 인터페론 베타 성분은 인터페론 베타의 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하여야 한다. 치료적 또는 순환 반감기의 증가는 본 명세서에 기재된 또는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 증명될 수 있되, 융합 단백질의 반감기는 인터페론 베타 화합물 단독의 반감기와 비교된다. 생물학적 활성은 당업계에 공지된 시험관내 및 생체내 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0898] 단백질분해에 의해 생성된 IgG의 Fc 영역이 무결합 IgG 분자로서 동일한 생체내 반감기를 가지며, Fab 단편은 빠르게 분해되기 때문에, 반감기를 연장시키기 위한 적절한 서열은 CH2 및/또는 CH3 도메인에 존재 하는 것으로 믿어진다. 추가로, 고친화성 Fc 수용체 또는 C1q에 결합되지 않는 IgG 변이체의 이화작용률은 본래 야생형 항체의 클리어런스율과 구별될 수 없다는 것은 문헌에서 제시되었는데, 이는 이화작용 부위가 Fc 수용체 또는 C1q 결합에 수반된 부위와 구별된다는 것을 표시한다. 문헌[Wawrzynczak et al., (1992) Molecular Immunology 29:221]. 류린 IgG1 Fc 영역을 사용하는 부위-지정 돌연변이유발 연구는 이화작용률을 제어하는 IgG1 Fc 영역의 부위가 CH2-CH3 도메인 경계에 위치된다는 것을 시사한다. Fc 영역은 융합 단백질의 반감기를 최적화하는 이화작용 부위에서 변형될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질에 대해 사용된 Fc 영역은 IgG1 또는 IgG4 영역으로부터 유래될 수 있으며, 힌지 영역을 포함하는 CH2와 CH3 영역을 둘 다 함유할 수 있다.

[0899] 이중성 알부민 융합 단백질

[0900] 본 명세서에 기재된 틸렉신은 직접적으로 또는 펩타이드 링커, 수용성 폴리머 또는 알부민 또는 이것의 유사체, 단편 또는 유도체에 대한 프로드러그 링커를 통해 융합될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 융합 단백질의 부분인 알부민 단백질은 인간을 포함하는 임의의 종으로부터 클로닝된 알부민으로부터 유래될 수 있다. 인간 혈청 알부민(HSA)은 66,500의 화학식 분자량을 갖는 585개 아미노산의 단일 비-글라이코실화된 폴리펩타이드 쇄로 이루어진다. 인간 HSA의 아미노산 서열은 공지되어 있다(본 명세서에 참조로서 포함됨, 문헌[Meloun, et al. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, et al. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, et al. (1981) Nucleic

Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747]을 참조한다]. 다양한 다형성 변이체뿐만 아니라 알부민의 유사체 및 단편이 기재되었다(문헌[Weitkamp, et al., (1973) Ann. Hum. Genet. 37:219]을 참조한다). 예를 들어, 유럽특허 322,094에서, HSA의 다양한 더 짧은 형태. HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) 및 HSA(1-419) 및 단편 1 내지 369 및 1-419을 포함하는, HSA의 이들 단편 중 일부가 개시된다. 유럽특허 399,666는 HSA(1-177) 및 HSA(1-200) 및 단편 HSA(1-177) 내지 HSA(1-200)을 포함하는 알부민 단편을 개시한다.

[0901] 본 발명의 이중성 융합 단백질은 단편, 유사체 및 유도체를 포함하는 임의의 알부민 단백질에 커플링되는 틸렉신 화합물을 포함하되, 이러한 융합 단백질은 생물학적으로 활성이고, 틸렉신 화합물 단독보다 더 긴 혈장 반감기를 가진다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 융합 단백질의 알부민 부분은 천연 인간 알부민의 혈장 반감기와 동일한 혈장 반감기를 필수적으로 가질 필요는 없다. 단편, 유사체 및 유도체는 공지되어 있거나 또는 더 긴 반감기를 가지거나 또는 천연 인간 알부민 및 관심의 틸렉신 화합물의 반감기 중간의 반감기를 가지도록 만들어질 수 있다.

[0902] 본 발명의 이중성 융합 단백질은 틸렉신 화합물 내 보존적 아미노산 치환 및/또는 융합 단백질의 Fc 또는 알부민 부분을 갖는 단백질을 포함한다. "보존적 치환"은 동일한 순전하 대략 동일한 크기 및 형상을 갖는 다른 아미노산으로 아미노산의 대체이다. 지방족 또는 치환된 지방족 아미노산 측쇄를 갖는 아미노산은 그것의 측쇄 내 전체 탄소 및 헤테로원자 수가 약 4개 이하만큼 다를 때 대략 동일한 크기를 가진다. 그것들은 측쇄 내 분지의 수가 1개 이하만큼 다를 때 대략 동일한 형상을 가진다. 측쇄 내 페닐 또는 치환된 페닐 기를 갖는 아미노산은 대략 동일한 크기 및 형상을 갖는 것으로 생각된다. 본 명세서에 달리 구체적으로 제공되는 경우를 제외하고, 보존적 치환은 바람직하게는 자연적으로 발생하는 아미노산으로 만들어진다.

[0903] 야생형 알부민 및 면역글로불린 단백질은 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 이들 단백질은 검출 가능한 표지에서 관심의 mRNA를 발현시키는 조직 또는 세포로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻어질 수 있다. 라이브러리는 관심의 특정 단백질에 대한 공개된 DNA 또는 단백질 서열을 사용하여 설계된 프로브로 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 불변 영역은 문헌[Adams, et al. (1980) Biochemistry 19:2711-2719; Goughet, et al. (1980) Biochemistry 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6027-6031; Rice et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) Nature 298:286-288; 및 Morrison, et al. (1984) Ann. Rev. Immunol. 2:239-256]에 기재되어 있다. 알부민 단백질 및 DNA 서열을 개시하는 일부 참고문헌은 문헌[Meloun, et al. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, et al. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, et al. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; 및 Minghetti, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747]을 포함한다.

[0904] 본 발명의 이중성 융합 단백질의 특징

[0905] 본 발명의 융합 단백질을 특징짓는 다양한 방법이 존재한다. 이들 방법 중 일부는, 이에 제한되는 것은 아니지만: 단백질 염색 방법과 커플링된 SDS-PAGE 또는 항-IgG 또는 항-HSA 항체를 사용하는 면역블로팅을 포함한다. 다른 방법은, 예를 들어 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화-질량분석법(MALDI-MS), 액체 크로마토그래피/질량분석법, 등전점전기영동, 분석 음이온 교환, 크로마토포커싱 및 원색법을 포함한다.

[0906] 혈청 알부민에 대한 친화도 향상

[0907] 다양한 분자가 또한 혈청 내 틸렉신 폴리펩타이드의 반감기를 조절하기 위해 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 동물 내 내인성 혈청 알부민에 대한 친화도를 향상시키기 위하여 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드에 연결되거나 또는 융합된다.

[0908] 예를 들어, 일부 경우에, 렉신 폴리펩타이드 및 알부민 결합 서열의 재조합 융합이 만들어진다. 대표적인 알부민 결합 서열은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 스트렙토코커스 단백질 G로부터의 알부민 결합 도메인(예를 들어 문헌[Makrides et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:534-542(1996) 및 Sjolander et al., J. Immunol. Methods 201:115-123 (1997)] 참조), 또는 예를 들어 문헌[Dennis, et al., J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)]에 기재된 것과 같은 알부민-결합 펩타이드를 포함한다

[0909] 다른 실시형태에서, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 지방산으로 아실화된다. 일부 경우에, 지방산은 혈청 알부민에 결합을 촉진한다. 예를 들어 문헌[Kurtzhals, et al., Biochem. J. 312:725-731 (1995)]을 참조한다.

[0910] 다른 실시형태에서, 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드는 혈청 알부민에 직접 융합된다(이에 제한되는 것은 아니지만, 인간 혈청 알부민). 당업자는 매우 다양한 다른 분자가 또한 혈청 알부민 또는 다른 혈청 성분에 결합을 조

절하기 위하여 본 발명의 펩타이드에 연결될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0911] **펩타이드 폴리펩타이드의 글라이코실화**

[0912] 본 발명은 당류 잔기를 함유하는 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드를 포함한다. 당류 잔기는 천연(이에 제한되는 것은 아니지만, N-아세틸글루코사민) 또는 비천연(이에 제한되는 것은 아니지만, 3-플루오로갈락토스) 중 하나 일 수 있다. 당류는 N- 또는 O-연결된 글라이코시드 결합(이에 제한되는 것은 아니지만, N-아세틸갈락토스-L-세린) 또는 비천연 결합(이에 제한되는 것은 아니지만, 옥심 또는 대응하는 C- 또는 S-연결된 글라이코사이드)에 의해 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 연결될 수 있다.

[0913] 당류(이에 제한되는 것은 아니지만, 글라이코실) 모이어티는 생체내 또는 시험관내 펩타이드 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 카보닐-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드 폴리펩타이드는 아미노옥시 기를 갖는 유도체화된 당류에 의해 변형되어 옥심 결합을 통해 연결된 대응하는 글라이코실화된 폴리펩타이드를 만든다. 일단 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 부착되면, 당류는 글라이코실 트랜스퍼라제 및 다른 효소로 처리에 의해 추가로 만들어져서 펩타이드 폴리펩타이드에 결합된 올리고당이 만들어질 수 있다. 문헌[H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)]을 참조한다.

[0914] 본 발명의 일부 실시형태에서, 카보닐-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드 폴리펩타이드는 아미노옥시 유도체로서 제조된 정해지니 구조를 갖는 글라이킨에 의해 직접 변형된다. 당업자는 아자이드, 알카인, 하이드라진 및 세미카바자이드를 포함하는 다른 작용기가 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 당류를 연결시키기 위해 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0915] 본 발명의 일부 실시형태에서, 아자이드 또는 알킬-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 펩타이드 폴리펩타이드는 그 다음에, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알킬 또는 아자이드 유도체를 각각 포함하는 것과, 이에 제한되는 것은 아니지만, Huisgen [3+2] 사이클로첨가 반응에 의해 변형될 수 있다. 이 방법은 단백질이 극도로 큰 선택성으로 변형되도록 한다.

[0916] **펩타이드 다이머 및 멀티머**

[0917] 본 발명은 또한 펩타이드와 펩타이드 유사체 조합, 예컨대 호모다이머, 헤테로다이머, 호모멀티머 또는 헤테로멀티머(즉, 트라이머, 테트라머 등)를 제공하며, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 펩타이드는 다른 펩타이드 또는 이것의 펩타이드 변이체 또는 펩타이드 또는 이것의 펩타이드 변이체가 아닌 임의의 다른 폴리펩타이드에 대해 폴리펩타이드 백본에 직접적으로 또는 링커를 통해 결합된다. 모노머와 비교하여 증가된 분자량에 기인하여, 펩타이드 다이머 또는 멀티머 컨주게이트는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상이한 약물학적, 약동학적, 또는 약력학적, 조절된 치료적 반감기 또는 모노머 펩타이드에 대해 조절된 혈장 반감기를 포함하는 새로운 또는 바람직한 특성을 나타낼 수 있다. 모노머 펩타이드 유사체의 예에 대해, 예를 들어 Balschmidt, P., 등의 1992년 11월 17일 발행된 미국특허 제5,164,366호; Brange, J., 등의 1997년 4월 8일 발행된 미국특허 제5,618,913호; Chance, R. E. 등의 1996년 5월 7일 발행된 미국특허 제5,514,646호; 및 Ertl, J., 등의, EPO 공개 번호 885,961, 1998년 12월 23일을 참조한다. 본 발명의 일부 실시형태는 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 잔기를 함유하는 모노머 펩타이드 유사체를 제공하며, 일부 실시형태에서 이들은 모노머 펩타이드 유사체(위치 B28은 Asp, Lys, Ile, Leu, Val 또는 Ala이고, 위치 B29에서 아미노산은 Lys 또는 Pro임); Lys(B28)Pro(B29)-인간 펩타이드를 갖는 모노머 펩타이드 유사체; 모노머 펩타이드 유사체 Asp(B28)-인간 펩타이드; 및 모노머 펩타이드 유사체 Lys(B3)Ile(B28)-인간 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 펩타이드 다이머는 펩타이드 수용체의 신호전달을 조절할 것이다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 펩타이드 다이머 또는 멀티머는 펩타이드 수용체 길항물질, 작용물질 또는 조절자로서 작용할 것이다.

[0918] 일부 실시형태에서, 다이머 또는 멀티머를 함유하는 펩타이드에 존재 하는 펩타이드 분자 중 하나 이상은 수용성 폴리머에 연결된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함한다.

[0919] 일부 실시형태에서, 펩타이드 폴리펩타이드는, 이에 제한되는 것은 아니지만, Asn-Lys 아마이드 결합 또는 Cys-Cys 이황화 결합을 통해 직접 연결된다. 일부 실시형태에서, 펩타이드 폴리펩타이드 및/또는 연결된 비-펩타이드 분자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 제1 펩타이드 폴리펩타이드의 하나의 비-자연적으로 암호화된 아미노산 내 알카인을 포함하는 다이머화를 용이하게 하도록 상이한 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함할 것이며, 제2 분자의 제2 비-자연적으로 암호화된 아미노산 내 아자이드는 Huisgen [3+2] 사이클로첨가를 통해 컨주게이트될 것이다. 대안적으로, 펩타이드 및/또는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 연결된 비-펩타이드 분자는 하이드록실아민-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 제2 폴리펩타이드에 컨주게이트될 것

이고, 폴리펩타이드는 대응하는 옥심의 형성을 통해 반응된다.

[0920] 대안적으로, 2개의 틸렉신 폴리펩타이드 및/또는 연결된 비-틸렉신 분자는 링커를 통해 연결된다. 임의의 헤테로- 또는 호모-2작용성 링커는 2개의 분자 및/또는 동일 또는 상이한 1차 서열을 가질 수 있는 연결된 비-틸렉신 분자를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에, 틸렉신 및/또는 연결된 비-틸렉신 분자를 함께 묶기 위하여 사용되는 링커는 2작용성 PEG 시약일 수 있다. 링커는 넓은 범위의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. 더 큰 분자량 또는 더 작은 분자량 링커가 사용되어 틸렉신과 연결된 독립체 사이 또는 틸렉신과 그것의 수용체 또는 연결된 독립체와 만약에 있다면, 그것의 결합 상대 사이의 원하는 공간적 관계 또는 입체구조를 제공할 수 있다. 더 긴 또는 더 짧은 분자 길이를 갖는 링커가 또한 사용되어 틸렉신과 연결된 독립체 사이 또는 연결된 독립체와 만약 존재한다면 그것의 결합 상대 사이의 원하는 공간 또는 가요성을 제공할 수 있다.

[0921] 일부 실시형태에서, 본 발명은 a) 폴리머 백본의 적어도 제1 말단 상에서 아자이드, 알카인, 하이드라진, 하이드라자이드, 하이드록실아민 또는 카보닐-함유 모이어티; 및 b) 폴리머 백본의 제2 말단 상에서 적어도 제2 작용기를 포함하는 아령형 구조를 갖는 수용성 2작용성 링커를 제공한다. 제2 작용기는 제1 작용기와 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 작용기는 제1 작용기와 반응성이 아니다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 분지된 분자 구조의 적어도 하나의 암을 포함하는 수용성 화합물을 제공한다. 예를 들어, 분지된 분자 구조는 덴드리머일 수 있다.

[0922] 일부 실시형태에서, 본 발명은 하기 구조를 갖는 수용성 활성화된 폴리머와 반응에 의해 형성된 하나 이상의 틸렉신 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머를 제공한다:

[0923] $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$

[0924] 상기 식에서 n은 약 5 내지 3,000이고, m은 2 내지 10이며, X는 아자이드, 알카인, 하이드라진, 하이드라자이드, 아미노옥시 기, 하이드록실아민, 아세틸, 또는 카보닐-함유 모이어티일 수 있으며, R은 캡핑기 작용기 또는 X와 동일 또는 상이할 수 있는 이탈기이다. R은, 예를 들어 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, N-하이드록시숙신이미딜 에스터, 1-벤조트리아아졸릴 에스터, N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트, 1-벤조트리아아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설폰, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라자이드, 보호된 하이드라자이드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 아이소시아네이트, 아이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설폰, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세타마이드, 에폭사이드, 글라이옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트 및 트레실레이트, 알켄 및 케톤으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기일 수 있다.

[0925] 틸렉신 폴리펩타이드 활성화 및 틸렉신 수용체에 대한 틸렉신 폴리펩타이드의 친화도의 측정

[0926] 틸렉신 폴리펩타이드 활성화는 표준 또는 공지된 시험관내 또는 생체내 분석을 사용하여 결정될 수 있다. 틸렉신 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 생물학적 활성화에 대해 분석될 수 있다. 이러한 분석은 문헌[Meager, J. Immunol. Meth., 261:21-36 (2002)]에 기재되는 바와 같이, 이에 제한되는 것은 아니지만, 인터페론-반응성 유전자, 수용체 결합 분석, 항-바이러스 활성화 분석, 세포변성효과 억제 분석(Familletti et. al., Meth. Enzymol. 78:387-394), 항-중식 분석(Aebersold and Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582), 면역조절 분석(미국특허 제4,914,033호; 제4,753,795호) 및 MHC 분자의 유도를 모니터링하는 분석(예를 들어, Hokland et al, Meth. Enzymol. 119:688-693)을 포함한다.

[0927] 3T3-1 지방세포 내 글루코스 흡수는 다음의 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 3T3-L1 세포는 미국 미생물 보존 센터(메릴랜드주 록빌에 소재한 ATCC)로부터 얻어진다. 세포는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium) 내 10% 철-풍부 소태아 혈청을 함유하는 성장 배지(GM) 중에서 배양된다. 표준 지방세포 분화를 위해, 세포가 컨플루언시(confluency)에 도달하고 2일 후(제0일로서 지칭), 세포는 10% 소태아 혈청, 10 μ g/ml의 틸렉신, 1 μ M 텍사메타손 및 0.5 μ M 아이소뷰틸메틸잔틴을 함유하는 분화 배지(differentiation medium; DM)에 48시간 동안 노출된다. 그 다음에 세포는 10% 소태아 혈청 및 10 μ g/ml의 틸렉신을 함유하는 분화 후 배지 중에서 유지된다. 시험관내 효능은 당업자에게 공지된 글루코스 흡수 분석에 의해 측정될 수 있다. 시험관내 효능은 세포-기반 분석에서 틸렉신 화합물의 글루코스 흡수 측정으로서 정의될 수 있으며, 틸렉신 화합물의 생물학적 효능의 측정이다. 단일 용량-반응 실험에서 50% 활성을 초래하는 화합물의 효과적인 농도인 EC50으로서 표현될 수 있다.

[0928] 글루코스 수송 분석--틸렉신 의존적--0.1mM 2-데옥시-D-[14C]글루코스의 축적에 의해 분석되는 핵소스 흡수는 다음과 같이 측정된다: 12-웰 플레이트 내 3T3-L1 지방세포를 KRP 완충제(136mM NaCl, 4.7mM KCl, 10mM NaPO4,

0.9mM CaCl₂, 0.9mM MgSO₄, pH 7.4)로 2회 세척하고, 37℃로 가온시키고, 0.2% BSA를 함유하며, 0.2% BSA를 함유하는 레보비츠(Leibovitz) L-15 배지 내 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션시키고, 0.2% BSA 완충제를 함유하는 KRP로 다시 2회 세척하며, 실내 공기 중의 37℃에서 30분 동안 보르트만닌(wortmannin) 없이(Me₂SO 만) 또는 보르트만닌의 존재에서 KRP, 0.2% BSA 완충제 중에서 인큐베이션시킨다. 그 다음에 릴렉신은 15분 동안 100nM의 최종 농도로 첨가되고, 2-데옥시-D-[14C]글루코스의 흡수는 마지막 4분 동안 측정된다. 10 μM 사이토칼라신 B의 존재에서 측정된 비특이적 흡수는 모든 수치로부터 차감된다. 단백질 농도는 피어스(Pierce) 바이신코닌산 분석으로 결정된다. 분석은 각 실험에 대해 3회 또는 4회 일상적으로 측정된다. 릴렉신의 존재에서 FGF-21에 의한 3T3-L1 지방세포의 급성 및 만성 사전처리 효과가 조사될 수 있다.

[0929] 글루코스 수송 분석--릴렉신 독립적--3T3-L1 섬유아세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 2주 동안 지방질 세포(지방세포)로 분화시킨다. 분화시킨 후, 그것들을 무혈청 배지 중에서 영양공급을 중단시켰고, 24시간 동안 본 발명의 다양한 릴렉신 폴리펩타이드로 처리하였다. 처리 시, 세포를 0.1% BSA를 함유하는 KRBH 완충제로 2회 세척하였다. KRBH 완충제 내 표지된 글루코스의 존재 중에서 글루코스 흡수를 수행한다. 이는 본 발명에 의해 생성된 다양한 릴렉신 폴리펩타이드 및 유사체의 정량적 평가를 허용하며, 폐길화로서 폐길화된 것은 천연 분자효율의 감소를 야기하는 것으로 알려졌고, 상이한 인슐린의 효능과 비교한다. 추가적으로, 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드는 생체밖 조직 모델 내 글루코스 흡수를 유발하는 것으로 나타날 수 있다.

[0930] 생체밖 글루코스 수송 모델에서, 글루코스 수송 분석은 다음과 같이 기재된다: 크랩스-헨셀라이트(Krebs-Henseleit) 완충제 저장 용액-저장액 1: NaCl(1.16M); KCl(0.046M); KH₂PO₄(0.0116M); NaHCO₃(0.0253M). 저장액 2: CaCl₂(0.025M); MgSO₄(2H₂O)(0.0116M). BSA: 투석없이 직접 ICN 콘 분획(Cohn Fraction) V, 무지방산 BSA를 사용. 배지 제조: 50ml의 크랩스 저장액 1을 395ml의 dH₂O에 첨가하고, 95% O₂/5% CO₂와 함께 1시간 동안 기체를 공급한다. 50ml의 저장액 2를 첨가하고, dH₂O에 의해 500ml로 만들었다. 500 mg의 ICN을 무지방산 BSA에 첨가한다. 침전 및 배양 배지: 32mM 만니톨, 8mM 글루코스, 세척 배지: 40mM 만니톨, 2mM 파이루베이트. 수송 배지: 39mM 만니톨, 1mM 2-DG; 32mM 만니톨, 8mM 3-O-MG. 릴렉신 용액: 2000 μU/ml 또는 13.3nM의 최종 농도에서(돼지 릴렉신[Lilly] 100,000,000 μU/ml). 방사성활성 표지 배지 제조: 사용된 특이적 활성: 2DG=1.5 mCi/ml; 3-O-MG=437 μCi/ml; 또는 만니톨=8 μCi/ml. 래트를 100g 체중 당 0.1cc 냄부탈로 마취시킨다. 근육 조직을 절단하고, 0.9% 식염수로 세정한 다음, 29℃에서 1시간 동안 사전 인큐베이션 배지(2ml) 중에 둔다. 근육 조직을 인큐베이션 배지에 옮기고(2ml; 릴렉신 또는 시험 화합물을 포함하는 것을 제외하고 사전 인큐베이션과 동일) 30분 동안 인큐베이션시킨다(실험 조건에 의존). 그 다음에 근육 조직을 29℃에서 10분 동안 세척 배지(2 ml)에 옮긴 다음, 10분(3-O-MG) 또는 20분(2DG) 동안 표지 배지(1.5ml)에 옮긴다. 근육 조직을 다듬고, 칭량하며, 드라이아이스 상에서 폴리프로필렌 튜브에 둔다. 1ml의 1N KOH를 10분 내지 15분 동안 70℃ 수욕 중에 넣고, 몇 분마다 튜브를 교반시킨다. 튜브를 얼음 상에서 냉각시키고 1ml의 1N HCl을 첨가한 다음, 잘 혼합시킨다. 그 다음에 200 μl의 상청액을 신틸레이션 바이알 내에 2회 넣고, 공지된 방사성 표준과 비교하여 신틸레이션 카운터 상에서 카운팅한다.

[0931] 수축을 위해, 근육을 사전인큐베이션/인큐베이션 배지 중에서 1시간 동안 제1 인큐베이션시킨다. 1시간 후, 각 쌍의 하나의 근육(래트 당 한 쌍)은 자극 장치에 핀으로 고정시키고, 다른 근육을 인큐베이션 배지의 새로운 플라스크에 옮긴다. 수축된 근육을 70Hz의 200 msec 트레인에 의해 자극시키고, 트레인 내 각각의 임펄스가 0.1 msec가 된다. 트레인은 중간에 1분의 휴식과 함께 2×10분 동안 10-15V에서 1/초로 전달된다. 자극 기간의 마지막에, 근육은 자극 장치로부터 제거되고, 10분 동안 세척 배지에 둔 다음 상기 약속한 바와 같이 표지 배지에 둔다.

[0932] 본 발명의 릴렉신, 릴렉신 폴리펩타이드 및/또는 릴렉신 유사체의 평균 양은 다를 수 있고, 특히 자격이 있는 의사의 추천 및 처방을 기준으로 하여야 한다. 본 발명의 릴렉신, 릴렉신 폴리펩타이드 및/또는 릴렉신 유사체의 정확한 양은 치료되는 질환의 정확한 유형 및/또는 중증도, 치료되는 환자의 상태뿐만 아니라 조성물 내 다른 성분으로서 이러한 인자가 실시되는 바람직한 대상의 문제이다. 본 발명은 또한 다른 활성제의 치료적 유효량의 투여를 제공한다. 주어진 양은 릴렉신, 이용가능한 릴렉신 치료제 및/또는 다른 릴렉신 유사체로 치료를 기반으로 담당자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0933] 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적인 방법으로 제조될 수 있다.

[0934] 실시예

[0935] 다음의 실시예는 예시를 위해 제공되지만, 청구되는 본 발명을 제한하지 않는다.

[0936] 실시예 1

[0937] 본 실시예는 틸렉신에 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 포함 부위의 선택을 위한 다수의 가능성 있는 기준 설정 중 하나를 기재한다.

[0938] 도 1 내지 도 4는 틸렉신의 구조 및 서열을 나타내며, 이하의 표는 A 쇠, B 쇠, 틸렉신 및 프로틸렉신을 갖는 서열을 포함한다. 틸렉신 폴리펩타이드는 자연적으로 암호화된 아미노산을 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환함으로써 만들어졌다. 각각의 폴리펩타이드는 파라-아세틸페닐알라닌(pAcF 또는 pAF)으로 치환된 아미노산 중 하나를 가진다. 만들어진 폴리펩타이드는 리더 서열이 없으며 A/B 쇠 틸렉신 폴리펩타이드였다(서열번호 1-3). 만들어진 각각의 폴리펩타이드는 서열번호 4의 다음의 위치 1, 5, 18, 13, 2중 하나에서 또는 공지된 틸렉신 서열 중 어떤 것의 A쇄의 해당 위치에서 또는 공지된 틸렉신 서열 중 어떤 것의 B 쇠의 동일 위치에서 서열번호 5 또는 6의 5, 7, 18, 28에서 비-자연적으로 암호화된 아미노산 치환을 가졌다. 도 2는 PyMOL 소프트웨어(캘리포니아주 팔로알토에 소재 DeLano Scientific) 및 본 발명의 틸렉신 폴리펩타이드 내 파라-아세틸페닐알라닌으로 치환된 것에 대응하는 일부 아미노산인 인간 틸렉신의 구조를 나타낸다.

[0939] 비-자연적으로 암호화된 아미노산 포함의 바람직한 부위의 선택을 위한 기준의 다른 설정은 Protein Data Bank 또는 다른 데이터뱅크로부터의 결정 구조를 사용하고 비교하는 것을 포함하며, 틸렉신의 구조를 모델링하기 위해 사용되고, 잔기는 1) 그것의 수용체에 결합을 방해하지 않으며, 2) 단백질 내부에 존재하지 않는다는 것을 확인한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 틸렉신의 다음 위치 중 하나 이상에 포함된다: 서열번호 4의 1, 5, 18, 13, 2 또는 공지된 틸렉신 서열 중 어떤 것의 A쇄의 해당 위치에서 또는 공지된 틸렉신 서열 중 어떤 것의 B 쇠의 동일 위치에서 서열번호 5 또는 6의 5, 7, 18, 28.

[0940] 다음의 기준을 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 도입을 위한 틸렉신 및 틸렉신 유사체의 각 위치를 평가하기 위해 사용하였다: 잔기는 (a) 구조적 분석을 기반으로 수용체의 결합을 방해하여서는 안되며, b) 알라닌 또는 상동체 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 영향받아서 안 되고, (c) 표면이 노출되고 주변 잔기와 최소 반데르발스 또는 수소 결합 상호작용을 나타내어야 하며, (d) 틸렉신 변이체 내에서 결실 또는 가변성이어야 하고, (e) 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환 시 보존적 변화를 초래하여야 하며 (f) 고도로 가요성인 영역 또는 구조적으로 강성인 영역에서 발견될 수 있다. 추가로, 추가 계산이 Cx 프로그램(Pintar et al. (2002) Bioinformatics, 18, pp 980)을 이용하여 틸렉신 분자 상에서 수행되어 각 단백질 원자에 대한 돌출 정도를 평가할 수 있다.

[0941] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신의 A쇄 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1의 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25(즉, 단백질의 카복실 말단에서)(서열번호 4 또는 서열번호 1 내지 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신의 B 쇠 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30(즉, 단백질의 카복실 말단에서)(서열번호 5 또는 6 또는 서열번호 1 내지 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 1, 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산), 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 1, 5, 31, 2, 13, 29(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 5, 31, 2, 13, 29(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 1, 5, 31, 2, 13(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산). 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산은 틸렉신 내 다음의 위치 중 하나 이상에 포함된다: 5, 31, 2, 13(서열번호 1 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산).

[0942] 실시예 2

[0943] 이 실시예는 이콜라이 내 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드의 클로닝 및 발현

을 상술한다.

[0944] 틸렉신을 클로닝하기 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 틸렉신에 대한 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 서열 및 숙주 세포 내로 틸렉신의 클로닝은 미국특허 제4,758,516호; 미국특허 제5,166,191호; 미국특허 제5,179,195호, 제5,945,402호; 및 제5,759,807호에 기재되며; 이것들 모두는 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0945] cDNA 암호화 틸렉신은 서열번호 12로서 나타내며, 성숙 폴리펩타이드 아미노산 서열은 서열번호 1로서 나타낸다.

표 1

인용된 틸렉신 서열

서열번호	서열명칭	서열
1	틸렉신 아미노산 서열	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0946]

2	릴렉신-노산 아미노산 서열 B1 Ala	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	프릴렉신-노산 아미노산 서열	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
4	릴렉신 A쇄, 노산 아미노산 서열	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	릴렉신 B쇄, 노산 아미노산 서열	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	릴렉신 B쇄, B1 Ala를 가진 노산 아미노산 서열	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	C 펩타이드 아미노산 서열	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	릴렉신 리더 아미노산 서열	MKKNIAFLKR
9	인슐린 리더 아미노산 서열	MIEGGR
10	릴렉신 A쇄, 노산 아미노산 서열	caactctacagtcattggctaataaatgttccatgttggtgtacccaaagatctctgctagattttgc
11	릴렉신 B쇄, 노산 아미노산 서열	gactcatggatggaggaagttaftaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagattgccatttgcggc atgagcacctggagc

[0947]

	서열	
12	릴렉신, A 및 B 해, 서열	caactctacagtgcattggctaataaatgtgccatgttggtgtacaaaagatctcttgcctagatttgc gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggcgcgaattagttcgcgcgcagattgccatttgcggc atgagcacctggagc
13	릴렉신 해, 서열	atgaaaagaatatcgcatcttctttaaacgg
14	인솔린 해, 서열	atgattgaaggtggcgt
15	릴렉신 발현 구성체 아미노산 서열의 예	M I E G G R D S W M E E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S R R E A E D L Q V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L E G S L Q K R Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R S L A R F C

[0948]

[0949]

직교 tRNA(OtRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신시타제(O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 함유하는 릴렉신 또는 릴렉신 유사체를 발현시키기 위해 사용된다. O-RS는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 의해 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화한다. 차례로, 번역 시스템은 암호화된 선택자 코돈에 반응하여 릴렉신 또는 릴렉신 유사체 내로 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 삽입한다. 적합한 O-RS 및 O-tRNA 서열은 WO 2006/068802(발명의 명칭: Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof(E9; 서열번호 16)) 및 WO 2007/021297(발명의 명칭: Compositions of tRNA and Uses Thereof (FI3; 서열번호 17))에 기재되며, 이들은 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된다.

표 2

[0950]

인용된 서열		
서열번호 18	메타노코커스 야나시 mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
서열번호 19	HLAD03; 최적화된 앰버 억제자 tRNA	tRNA
서열번호 20	HL325A; 최적화된 AGGA 프레임시프트 억제자 tRNA	tRNA
서열번호 21	p-아지도-L-페닐알라닌 p-Az-PheRS(6)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 22	p-벤조일-L-페닐알라닌 p-BpaRS(1)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 23	프로파길-페닐알라닌프로파길-PheRS의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 24	프로파길-페닐알라닌프로파길-PheRS의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 25	프로파길-페닐알라닌프로파길-PheRS의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 26	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(1)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 27	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(3)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 28	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(4)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 29	p-아지도-페닐알라닌 p-Az-PheRS(2)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS

서열번호 30	<i>p</i> -아세틸-페닐알라닌(LW1)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 31	<i>p</i> -아세틸-페닐알라닌(LW5)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 32	<i>p</i> -아세틸-페닐알라닌(LW6)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 33	<i>p</i> -아지도-페닐알라닌(AzPheRS-5)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS
서열번호 34	<i>p</i> -아지도-페닐알라닌(AzPheRS-6)의 포합을 위한 아미노아실 tRNA 신시타제	RS

[0951] 변형된 릴렉신 또는 릴렉신 유사체 유전자 및 직교 아미노아실 tRNA 신시타제/tRNA 쌍(원하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산에 특이적)을 함유하는 플라스미드에 의한 이콜라이의 형질변환은 릴렉신 폴리펩타이드 내로 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 부위-특이적 포합을 허용한다.

[0952] 야생형 성숙 릴렉신은 표준 프로토콜을 사용하여 cDNA 합성 반응으로부터 PCR에 의해 증폭되고 pET30(NcoI-BamHI) 내로 클로닝된다. 다음의 서열 확인 전 또는 대안적으로, N-말단 HHHHHHSGG 서열을 포함하는 릴렉신은 메타노코커스 야나시(Mj tRNATyr/CUA)로부터 이콜라이 리포단백질 프로모터 서열(Miller, J.H., Gene, 1986)로부터 유래된 합성 프로모터의 구성적 제어 하에서 앰버 억제자 티로실 tRNATyr/CUA뿐만 아니라 이콜라이 GlnRS 프로모터 조절 하에 직교 티로실-tRNA-신시타제(MjTyrRS)를 함유하는 억제 벡터 내로 서브클로닝된다. 릴렉신의 발현은 T7 프로모터의 제어 하에 있다. 앰버 돌연변이는 표준 신속 변화 돌연변이 프로토콜(캘리포니아주 라호야에 소재한 Stratagene)을 사용하여 도입된다. 구성체는 증명된 서열이다.

[0953] 장시간 작용하는 릴렉신 화합물의 시험을 STZ 당뇨 래트 모델(PCO 08-400-209)을 사용하여 행할 수 있다.

[0954] 파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)에 의한 억제

[0955] 플라스미드(예를 들어, pt_RLX_B A1_AV 13am_p 1395(AXID2381))를 사용하여 에스케리키아 콜라이 균주 W3110B57로 형질변환시켜 이콜라이의 RLX-BA1-AV13pAF W3110 B2 균주를 생성하였고, T7 폴리머라제의 발현은 아라비노스-유도성 프로모터의 제어 하에 있다. 밤새 박테리아 배양물을 2X YT 배양배지를 함유하는 진탕 플라스크 내에 1:100으로 희석시키고, ~0.8의 OD₆₀₀으로 37°C에서 성장시켰다. 아라비노스(0.2% 최종), 및 파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)의 첨가에 의해 4 mM의 최종 농도로 단백질 발현을 유발하였다. 배양물을 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 펠렛화하였고, B-PER 라이시스 버퍼(Pierce) 100μl/OD/ml + 10μl/ml DNase 내에서 인큐베이션시켰고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세포 물질을 원심분리에 의해 제거하였고, 상청액을 제거하였다. 펠렛을 SDS-PAGE 단백질 로딩 완충제의 동일량 중에서 재현탁시켰다. 모든 샘플을 MES 및 DTT와 함께 4-12% PAGE 겔 상에 로딩하였다. 릴렉신의 정제 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 분석 또는 전기분무-이온화 이온 트랩 질량분석법 등에 의해 확인한다.

[0956] His-태그된 돌연변이체 릴렉신 단백질은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 정제될 수 있다. ProBond Nickel-Chelating Resin(캘리포니아주 갈스베드에 소재한 Invitrogen)를 제조업자에 의해 제공된 표준 His-태그 단백질 정제를 통해 사용할 수 있다. 단백질의 기능 측정을 당업계에 공지된 방법, 본 출원 및 포함된 참고문헌 내에 제공된 방법을 통해 행할 수 있고, 대안적으로 살아있는 세포 상의 ELISA를 진행하여 본 발명의 릴렉신 폴리펩타이드를 평가할 수 있다.

표 3

릴렉신 변이체의 분석

배치/설명	SDS-PAGE	LAL (EU/mg)	A280에서 농도	RP-HPLC 순도	SE-HPLC 순도
WT 릴렉신 ³	NR 주요 밴드 이동	NT	2.4	91.2%	NT

[0957]

	거의 6kDa MW 표준				
20K 폐길화된 Q1pAF ^{1,3,4}	NR 주요 밴드는 49 내지 38 kDa MW 표준 을 이동한다	7.7	3.4	100%	NT
20K 폐길화된 A5pAF ^{1,3,4}		3.6	2.4	100%	NT
20K 폐길화된 R18pAF ^{1,3,4}		16.1	2.4	100%	NT
20K 폐길화된 E5pAF ^{2,3}		NT	0.6	99.8%	NT
20K 폐길화된 V7pAF ^{2,3,4}		10.5	2.3	99.4%	NT
20K 폐길화된 A18pAF ^{2,3}		NT	2.0	99.0%	NT
20K 폐길화된 W28pAF ^{2,3,4}		9.1	2.2	99.4%	NT
20K 폐길화된 V13pAF ^{1,3,4}		5.1	3.7	99.5%	NT
20K 폐길화된 E5pAF ²		NT	0.6	99.6%	NT
20K 폐길화된 L2pAF ¹		0.0	1.6	99.5%	NT
WT Relaxin ³	NR 주요 밴드는 거의 6 kDa MW 표준을 이동한다	0.1	2.5	85.6%	NT
20K PEGylated Q1pAF ^{1,3}	NR 주요 밴드는	<0.4	2.3	99.3%	99.3%

[0958]

	49 내지 38kDa MW 표준을 이동한다				
5K 페길화된 V13pAF ^{1,3}	NR 주요 밴드는 거의 14kDa MW 표준을 이동한다	5.4	1.5	99.4%	99.8%
10K 페길화된 V13pAF ^{1,3}	NR 주요 밴드는 28 내지 17 kDa MW 표준을 이동한다	9.8	1.8	99.4%	99.5%
20K 페길화된 V13pAF ^{1,3}	NR 주요 밴드는 49 내지 38 kDa MW 표준을 이동한다	4.7	1.9	99.0%	99.5%
30K 페길화된 V13pAF ^{1,3}	NR 주요 밴드는 62 내지 49 kDa MW 표준을 이동한다	8.0	2.1	99.5%	99.8%

[0959]

샘플이 감소되지 않음(NR); NT = 시험하지 않음

¹ A쇄 상에 위치한 pAcF 치환

² B쇄 상에 위치한 pAcF 치환

³ B쇄 상에서 Asp를 Ala으로 치환(BA1)

⁴ 초기 PK에 대해 사용됨

[0960]

표 4

활성의 릴렉신 변이체 손실

변이체	시험관내 폴딩 손실	PEG 크기	생체내 PK 최종 HL(시간)	생체내 약물	진탕 플라스크	발효기 역가 (세포 페이스트)	분석적 특징
RLX-A-AV13	17	5K, 10K, 20K, 30K	2.6(5K), 8.7(10K), 13.8(20K), 26.8(30K)		있음	1 gm/L	SDS-PAGE, 농축, LAL, RP-HPLC, SE-HPLC
RLX-A-AQ1	12	20K	10.7	20K는 효능을 나타낸다	있음	720 mg/L	SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC, LAL, SE-HPLC
RLX-A-AA5	12	20K	12.2		있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC, LAL
RLX-A-BV7	15	20K	13.1		있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC, LAL
RLX-A-AL2	17	20K			있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC
RLX-A-BE5	17	20K			있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC
RLX-A-AR18	21	20K	12.5		있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC, LAL
RLX-BE5	22	20K			있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC
RLX-A-BA18	48	20K			있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC
RLX-A-BW28	48	20K	13.9		있음		SDS-PAGE, 농축, RP-HPLC, LAL

[0961]

[0962]

실시예 3

[0963]

본 발명은 이콜라이에 의한 프로-릴렉신 폴리펩타이드의 발현을 상술한다.

[0964]

단일쇄 단백질로서 이콜라이 발현된 프로-릴렉신은 88개의 아미노산으로 구성된다. 트립신 및 카복시펩티다제로 분해 시, 연결 펩타이드 및 리더 서열이 제거된다. 얻어진 펩타이드는 24개 잔기의 A-쇄 및 29개 잔기의 B-쇄로 이루어진 인슐린 슈퍼패밀리의 작은 6kDa 2-쇄 펩타이드 구성원이다. 구조적 폴딩은 2개의 측쇄(Cys11-Cys36 및 Cys24-Cys48) 및 하나의 주쇄(Cys10-Cys15) 이황화 결합에 의해 함께 보유된 2개의 펩타이드쇄를 특징으로 한다. 인간 릴렉신-2의 결정 구조에 기반한 3차 구조는 소수성 코어를 둘러싸는 3개의 나선 단편 및 짧은 연장 영역을 포함하는 뾰족한 폴딩을 나타내었다.

[0965]

하나 이상의 비-자연적으로 암호화된 아미노산(들)을 갖는 릴렉신은 독특한 화학적 성질을 제공하며, 생합성적으로 포함되고 화학적으로 반응성인 카보닐기를 함유하는 특이적 폐쇄화된 재조합 변이체가 천연 아미노산의 파라-아세틸페닐알라닌(pAcF)으로 대체에 의해, 폴리(에틸렌) 글라이콜(PEG)에 대한 부착의 독특한 공유적 부위를 제공하도록 한다.

[0966]

실시예 4

[0967]

이 실시예는 이콜라이에 의한 프로-릴렉신 폴리펩타이드의 발현을 상술한다.

[0968]

이 실시예는 오(5) 리터 발효기를 사용하는 릴렉신 폴리펩타이드 생성의 확대를 기재한다. 이들 방법 및 확대는 10ℓ, 30ℓ, 150ℓ 및 1000ℓ 배양에 대해 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 적어도 2g의 릴렉신 단백질은 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 4g의 릴렉신 단백질이 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 6g의 릴렉신 단백질이 세포 배

양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 8 g의 틸락신 단백질이 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 10g의 틸락신 단백질이 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 15g의 틸락신 단백질이 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 적어도 20g의 틸락신 단백질이 세포 배양물의 각 리터에 대해 생성된다.

[0969] 2.1 씨드 진탕 플라스크

[0970] 에스케리키아 콜라이 균주 W3110B57[F-IN(rrnD-rrnE) 람다-araB::g1 tetA fhuA::dhfr ompT::cat] 은닉 플라스미드 pt_RLX_BA1_AV13am_p1395(AXID2381)를 사용하여 RLX-BA1-AV13pAF를 생성하였다. 단일 연구 세포 뱅크(RCB, research cell bank) 바이알을 -80℃로부터 제거하였고, 실온에서 해동시킨 다음, 50 μ l를 사용하여 250ml 배플 엘렌마이어(baffled Erlenmeyer) 플라스크 내 50 μ g/ml 카나마이신 설페이트로 보충한 50ml의 씨드 배지(화학적으로 정의된 배지)를 접종시켰다. 1차 씨드 배양물을 37℃ 및 250rpm(1-인치 뿔개)에서 대략 18시간 동안 성장시켰다. 1차 씨드 배양물을 50 μ g/ml 카나마이신 설페이트로 보충한 100ml의 씨드 배지를 함유하는 500ml 배플 엘렌마이어 플라스크 내 0.05의 600nm(OD600)에서 측정된 광학 밀도로 2차 씨드 배양물 내로 서브-배양시켰다. 2차 씨드 배양물을 대략 8시간 동안 또는 OD600가 2 내지 4에 도달되었을 때 37℃ 및 250 rpm(1-인치 뿔개)에서 성장시켰다.

[0971] 2.2 발효기

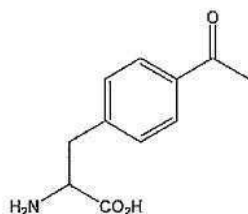
[0972] Sartorius Biostat B 5-L 용기를 50 μ g/l의 카나마이신 설페이트로 보충한 2.1 l의 생성배지(화학적으로 정의된 배지)로 채웠다. 2차 씨드 배양물을 사용하여 0.035의 초기 OD₆₀₀으로 발효기를 접종시켰다. 배양물을 37℃로 성장시켰고, 1차 교반(480-1200 rpm) 캐스케이드 및 2차 O₂ 캐스케이드에 의해 30%(공기 포화)를 유지하도록 용해된 산소를 설정하였다. 6 psi 배압을 갖는 5 LPM의 공기 유속을 발효를 통해 유지하였다. 배양물의 pH를 15% 수산화암모늄의 첨가에 의해 7.2 \pm 0.05로 설정하였고, 거품 제어를 위해 필요하다면 Dow Chemical P2000 소포제를 첨가하였다. 배양물이 35 \pm 5의 OD₆₀₀에 도달하였을 때(배취 배지 내 초기 글라이세롤이 거의 고갈되었을 때), 200ml의 볼루스 공급물이 초기에 주어졌고, 동시에 pH 설정값을 7.2 내지 6.6으로 조정하였다. 초기 볼루스 공급 후, 연속적 공급을 0.25ml/l/분의 속도로 개시하였고, 채취까지 지속시켰다. 공급의 시작 직후, 수중에서 만들어진 2.5ml/l (0.2 g/l 최종 배양 용적)의 100 g/l L-Ala-pAcF 다이펩타이드 용액을 발효기에 첨가하였다. 다이펩타이드 첨가 15분 후, L-아라비노스를 첨가함으로써(PTR-FGF-002에서 주어진 방안) 2 g/l (최종 배양물 용적)의 농도로 배양을 유도하였다. 아라비노스 첨가 6시간 후 배양물을 성장시켰고, 채취하였다.

[0973] 도 5는 발린으로 치환된 A쇄의 13번째 아미노산 위치에서 Ala 및 파라-아세틸 페닐알라닌으로서 쇠 B1 아미노산에 의한 이들 방법에 의해 생성된 프로틸락신의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0974] 실시예 5

[0975] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산의 도입 및 아미노옥시-함유 PEG와 이후의 반응을 상술한다.

[0976] 이 실시예는 대략 5,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응된 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸락신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1의 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22에서 각각의 잔기(즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단 또는 서열번호 3, 5, 7, 9, 11에서 대응하는 아미노산) 및 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32에서 각각의 아미노산 잔기는 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환된다:



[0977]

[0978] 릴렉신 내로 p-아세틸-페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 상기 실시예 2에서 기재한 서열번호 1 및 2(릴렉신의 A 및 B 쇄), 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시) 및 15, 29, 30 또는 31(TyrRS LW1, 5 또는 6)이다.

[0979] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응된다:

[0980] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

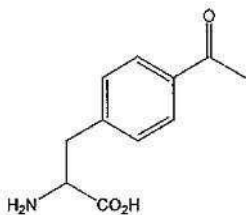
[0981] R은 메틸이며, n은 3이고 N은 대략 5,000MW이다. 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중에서 또는 10mM 아세트산 나트륨 중에서(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에 용해시킨 p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 릴렉신을 10 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 10 내지 16시간 동안 실온에서 교반시켰다(Jclicks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-릴렉신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제로 희석시킨다.

[0982] 실시예 6

[0983] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산의 도입 및 이후에 아미노옥시-함유 PEG와 반응을 상술한다.

[0984] 이 실시예는 대략 20,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응된 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다.

[0985] 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3에서 대응하는 아미노산)의 각각의 잔기는 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환된다:



[0986]

[0987] 릴렉신에 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용된 서열은 서열번호 4 및 5 또는 6(릴렉신의 A 및 B 쇄) 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[0988] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응한다:

[0989] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

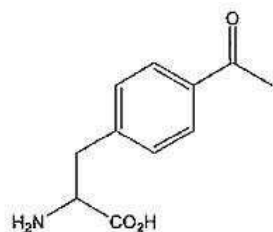
[0990] 상기 식에서 R은 메틸이고, n은 3이며 N은 대략 20,000MW이다. 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에 용해시킨 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 릴렉신을 10 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 실온에서 10 내지 16시간 동안 교반시켰다.

[0991] 실시예 7

[0992] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산의 도입 및 이후에 아미노옥시-함유 PEG와 반응을 상술한다.

[0993] 이 실시예는 대략 20,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응되는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1(즉, N-말단에서) 앞, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53(즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 아미노산 위치)의 각각의 잔기는 다음 구조를 갖는

비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환된다:



[0994]

[0995]

릴렉신 내에 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 13 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[0996]

일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응되며:

[0997]

R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

[0998]

상기 식에서, R은 메틸이며, n은 3이고 N은 대략 20,000MW이다. 25mM MES (미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에서 용해시킨 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 릴렉신을 10배 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음 실온에서 10시간 내지 16시간 동안 교반시킨다(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-릴렉신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[0999]

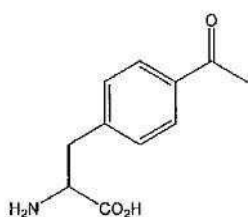
실시예 8

[1000]

이 실시예는 카보닐-함유 아미노산 및 아미노옥시-함유 PEG와 이후의 반응의 도입을 상술한다.

[1001]

이 실시예는 대략 20,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응되는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1 앞의(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3에서 대응하는 아미노산 위치)의 각각의 잔기를 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환한다:



[1002]

[1003]

릴렉신 내로 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 1 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[1004]

일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응되며:

[1005]

R-PEG(N)-O-(CH₂)_n-O-NH₂

[1006]

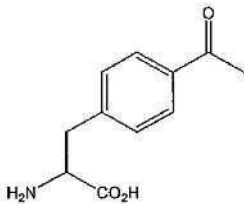
상기 식에서 R은 메틸이며, n은 3이고 N은 대략 20,000 MW이다. 25mM MES (미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에서 용해된 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 릴렉신은 10배 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응된 다음 실온에서

10시간 내지 16시간 동안 교반시킨다(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-틸렉신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[1007] 실시예 9

[1008] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산 및 아미노옥시-함유 PEG와 이후의 반응의 도입을 상술한다.

[1009] 이 실시예는 대략 30,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응되는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1 앞의(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3에서 대응하는 아미노산 위치)의 각각의 잔기를 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환한다:



[1010]

[1011] 틸렉신 내로 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 1(또는 서열번호 2 또는 3) 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[1012] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응되며:

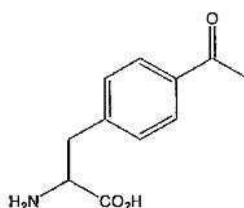
[1013] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1014] R은 메틸이고, n은 3이며 N은 대략 30,000 MW이다. 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에 용해시킨 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 틸렉신을 10 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 실온에서 10 내지 16시간 동안 교반시킨다(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-틸렉신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[1015] 실시예 10

[1016] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산 및 아미노옥시-함유 PEG와 이후의 반응의 도입을 상술한다.

[1017] 이 실시예는 대략 40,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응되는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1 앞의(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3에서 대응하는 아미노산 위치)의 각각의 잔기를 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환한다:



[1018]

[1019] 틸렉신 내로 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 13(또는 서열번호 1, 2 또는 14) 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌

의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[1020] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸락신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응되며:

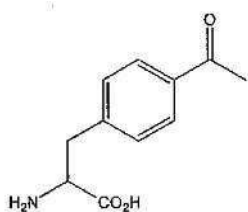
[1021] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1022] R은 메틸이고, n은 3이며 N은 대략 40,000 MW이다. 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에 용해시킨 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 틸락신을 10 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 실온에서 10 내지 16시간 동안 교반시킨다(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-틸락신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[1023] 실시예 11

[1024] 이 실시예는 카보닐-함유 아미노산 및 아미노옥시-함유 PEG와 이후의 반응의 도입을 상술한다.

[1025] 이 실시예는 대략 10,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 이후에 반응되는 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸락신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다. 위치 1 앞의(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3에서 대응하는 아미노산 위치)의 각각의 잔기를 다음의 구조를 갖는 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 개별적으로 치환한다:



[1026]

[1027] 틸락신 내로 p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 13(또는 서열번호 1, 2 또는 14 내 대응하는 위치) 및 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 서열이며, p-아미노페닐알라닌의 부위-특이적 포함을 위해 포함된다.

[1028] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸락신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응되며:

[1029] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1030] R은 메틸이고, n은 3이며 N은 대략 10,000 MW이다. 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0 중의, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 10mg/ml에 용해시킨 p-아미노페닐알라닌을 함유하는 정제된 틸락신을 10 내지 100-배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 실온에서 10 내지 16시간 동안 교반시킨다(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). 그 다음에 PEG-틸락신을 즉시 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[1031] 실시예 12

[1032] 아마이드 결합을 통해 PEG에 연결된 하이드록실아민기로 이루어진 PEG와 키투게이션.

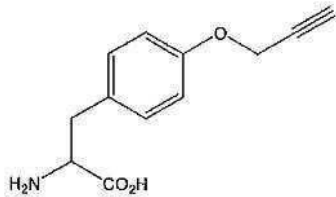
[1033] 다음의 구조를 갖는 PEG 시약은 실시예 3 내지 9에서 기재한 과정을 사용하여 케톤-함유 비-자연적으로 암호화된 아미노산과 커플링된다: $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-O-NH_2$

[1034] 상기 식에서 R = 메틸이고, n=4이며 N은 대략 5,000 MW 내지 40,000 MW이다. 반응, 정제 및 분석 조건은 기재된 바와 같고, 당업계에 공지되어 있다.

[1035] 실시예 13

- [1036] 이 실시예는 틸렉신 폴리펩타이드 및 틸렉신 유사체 폴리펩타이드 내로 2개의 별개의 비-자연적으로 암호화된 아미노산의 도입을 상술한다.
- [1037] 이 실시예는 다음의 잔기 중 2개의 위치에서 케톤 작용기를 포함하는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드의 생성방법을 증명한다: 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 4, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질 카복시 말단에서 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 위치). 선택자 코돈이 핵산 내 2개의 별개 부위에 도입되는 것을 제외하고, 틸렉신 폴리펩타이드를 상기 기재한 바와 같이 제조한다.
- [1038] 실시예 14
- [1039] 이 실시예는 하이드라자이드-함유 PEG에 틸렉신 폴리펩타이드 또는 틸렉신 유사체 폴리펩타이드의 컨쥬게이션 및 이후의 인시츄 환원을 상술한다.
- [1040] 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 상기 기재한 과정에 따라서 제조한다. 일단 변형되면, 하기 구조를 갖는 하이드라자이드-함유 PEG는 틸렉신 폴리펩타이드에 컨쥬게이션되며:
- [1041] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$
- [1042] 상기 식에서 R = 메틸이고, n=2이며 N = 5,000; 10,000, 20,000; 30,000; 또는 40,000 MW이고, X는 카보닐(C=O) 기이다. p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 틸렉신을 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 0.1-10mg/ml에 용해시키고, 1 내지 100-배 과량의 하이드라자이드-함유 PEG와 반응시키며, 대응하는 하이드라존을 저장액 1M NaCNBH₃(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical)의 첨가에 의해 인시츄로 환원시키고, 10 내지 50mM의 최종 농도로 H₂O 중에 용해시킨다. 암실 내 4℃ 내지 실온에서 18시간 내지 24시간 동안 반응을 수행한다. 50mM의 최종 Tris 농도로 pH 7.6에서 1M Tris(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical)의 첨가에 의해 반응을 중단시키고, 즉시 정제를 위해 적절한 완충제로 희석하였다.
- [1043] 실시예 15
- [1044] 이 실시예는 하이드라자이드-함유 PEG에 틸렉신 폴리펩타이드 또는 틸렉신 유사체 폴리펩타이드의 컨쥬게이션 및 이후의 인시츄 환원을 상술한다.
- [1045] 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 틸렉신 폴리펩타이드는 상기 기재한 과정에 따라서 제조한다. 일단 변형되면, 하기 구조를 갖는 하이드라자이드-함유 PEG는 틸렉신 폴리펩타이드에 컨쥬게이션되며:
- [1046] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$
- [1047] 상기 식에서 R = 메틸이고, n=2이며 N = 20,000 MW이고, X는 카보닐(C=O) 기이다. p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 틸렉신을 25mM MES(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 6.0, 25mM Hepes(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 7.0, 또는 10mM 아세트산 나트륨(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical) pH 4.5 중의 0.1 내지 10mg/ml에 용해시키고, 1 내지 100-배 과량의 하이드라자이드-함유 PEG와 반응시키며, 대응하는 하이드라존을 저장액 1M NaCNBH₃(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical)의 첨가에 의해 인시츄로 환원시키고, 10 내지 50mM의 최종 농도로 H₂O 중에 용해시킨다. 암실 내 4℃ 내지 실온에서 18시간 내지 24시간 동안 반응을 수행한다. 50mM의 최종 Tris 농도로 pH 7.6에서 1M Tris(미주리주 세인트루이스에 소재한 Sigma Chemical)의 첨가에 의해 반응을 중단시키고, 즉시 정제를 위해 적절한 완충제로 희석하였다.
- [1048] 실시예 16
- [1049] 이 실시예는 틸렉신 폴리펩타이드 또는 틸렉신 유사체 폴리펩타이드 내로 알킬-함유 아미노산의 도입 및 mPEG-아자이드로 유도체화를 상술한다.
- [1050] 다음의 잔기, 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54(즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3의

대응하는 위치)는 다음의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 각각 치환된다:



[1051]

[1052] 릴렉신 내로 p-프로파길-티로신의 부위-특이적 포함을 위해 이용한 서열은 서열번호 1(또는 서열번호 2 또는 3의 대응하는 위치), 서열번호 16 또는 17(mutRNA, 메타노코커스 야나시), 및 상기 기재한 22, 23 또는 24 서열이다. 프로파길 티로신을 함유하는 릴렉신 폴리펩타이드는 이콜라이에서 발현되며, 상기 기재한 조건을 사용하여 정제된다.

[1053] 프로파길-티로신을 함유하는 정제된 릴렉신을 PB 완충제 내 0.1-10mg/ml(100mM 인산나트륨, 0.15M NaCl, pH = 8)에 용해시키고, 10 내지 1000-배 과량의 아자이드-함유 PEG를 반응 혼합물에 첨가한다. 그 다음에 촉매적 양의 CuSO4 및 Cu 와이어를 반응 혼합물에 첨가한다. 혼합물을 인큐베이션시킨 후(이에 제한되는 것은 아니지만, 실온 또는 37°C에서 약 4시간, 또는 4°C에서 밤새), H₂O를 첨가하고, 혼합물을 투석막을 통해 여과한다. 샘플을, 이에 제한되는 것은 아니지만, 실시예 3에 기재된 유사한 과정에 의해 첨가를 위해 분석할 수 있다. 이 실시예에서, PEG는 다음 구조를 가질 것이다:

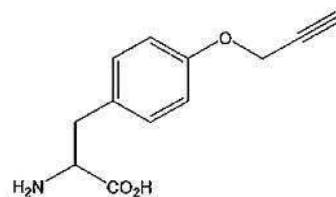
[1054] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-N_3$

[1055] 상기 식에서 R은 메틸이고, n은 4이며 N = 5,000; 10,000; 20,000; 30,000; 또는 40,000 MW이다.

[1056] 실시예 17

[1057] 이 실시예는 릴렉신 폴리펩타이드 내 거대한, 소수성 아미노산의 프로파길 티로신으로 치환을 상술한다.

[1058] Phe, Trp 또는 Tyr 잔기는 릴렉신의 다음 영역 중 하나 내에 존재 하며: 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 위치)은 상기 기재한 바와 같이 다음의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다:



[1059]

[1060] 일단 변형되면, PEG는 알카인-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체에 부착된다. PEG는 다음 구조를 가질 것이며

[1061] $Me-PEG(N)-O-(CH_2)_2-N_3$

[1062] 커플링 과정은 상기 실시예의 과정에 따른다. 이는 자연적으로 발생하는 거대 소수성 아미노산 중 하나와 대략 등전자성이며, 폴리펩타이드 내 별개 부위에서 PEG 유도체에 의해 변형되는 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체를 만들 것이다.

[1063] 실시예 18

[1064] 이 실시예는 릴렉신 폴리펩타이드 호모다имер, 헤테로다имер, 호모멀티머 또는 하나 이상의 PEG 링커에 의해 분리된 헤테로멀티머의 생성을 상술한다. 릴렉신 폴리펩타이드 멀티머는 프로인술린 사이에 또는 본 발명의 성숙 A쇄와 B쇄 릴렉신 폴리펩타이드 사이에 형성될 수 있다.

[1065] 상기 예에서 생성된 알카인-함유 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 2작용성 PEG 유도체와 반응된다:

[1066] $N3-(CH_2)_n-C(O)-NH-(CH_2)_2-O-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N3$

[1067] 상기 식에서 n 은 4이며 PEG는 대략 5,000; 10,000; 20,000; 30,000; 또는 40,000 MW의 평균 MW를 가져서 대응하는 릴렉신 폴리펩타이드 호모다имер를 만들고, 2개의 릴렉신 분자는 PEG에 의해 물리적으로 분리된다. 유사한 방식으로 릴렉신 폴리펩타이드는 하나 이상의 다른 폴리펩타이드와 헤테로다имер, 호모멀티머 또는 헤테로멀티머를 형성한다. 커플링, 정제 및 분석은 상기 실시예에서와 같이 수행될 것이다.

[1068] 실시예 19

[1069] 이 실시예는 릴렉신 폴리펩타이드 호모다имер, 헤테로다имер 호모멀티머, 또는 하나 이상의 PEG 링커에 의해 분리된 헤테로멀티머의 생성을 상술한다.

[1070] 릴렉신 폴리펩타이드 멀티머는 A쇄와 다른 A쇄 또는 B쇄와 다른 B쇄 간에 형성될 수 있다.

[1071] 상기 실시예에서 생성된 알카인-함유 릴렉신 폴리펩타이드 변이체를 하기 형태의 2작용성 PEG 유도체와 반응시키며:

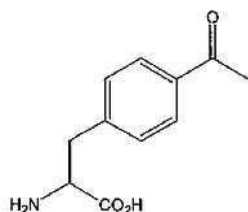
[1072] $N3-(CH_2)_n-C(O)-NH-(CH_2)_2-O-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_n-N3$

[1073] 상기 식에서 n 은 4이며 PEG는 대략 5,000; 10,000; 20,000; 30,000; 또는 40,000 MW의 평균 MW를 가져서 대응하는 릴렉신 폴리펩타이드 호모다имер를 만들고, 2개의 릴렉신 분자는 PEG에 의해 물리적으로 분리된다. 유사한 방식으로, 릴렉신 폴리펩타이드는 하나 이상의 다른 폴리펩타이드에 커플링되어, 헤테로다имер, 호모멀티머 또는 헤테로멀티머를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 상기 실시예에서와 같이 수행될 것이다.

[1074] 실시예 20

[1075] 이 실시예는 릴렉신 폴리펩타이드에 당류 모이어티의 커플링을 상술한다.

[1076] 다음 중 하나의 잔기는: 위치 1 앞(즉, N-말단에서), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (즉, 서열번호 1의 단백질의 카복실 말단에서 또는 서열번호 2 및 3의 대응하는 위치)은 상기 기재한 바와 같이 이하의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다:



[1077]

[1078] 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체를 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 β -연결된 아미노옥시 유사체와 반응시킨다. 릴렉신 폴리펩타이드 변이체(10mg/ml) 및 아미노옥시 당류(21 mM)를 수성 100mM 아세트산 나트륨 완충제(pH 5.5) 중에서 혼합시키고, 37°C에서 7 내지 26시간 동안 인큐베이션시켰다. 주위 온도에서 48시간 동안 150mM HEPES 완충제(pH 7.4) 중의 UDP-갈락토스(16mM) 및 p-1,4-갈락타이토실트랜스퍼라제(0.4 단위/ml)와 함께 당류-컨쥬게이션된 릴렉신 폴리펩타이드(5mg/ml)를 우선 효소적으로 인큐베이션함으로써 제2 당류를 커플링한다(Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

[1079] 실시예 22

[1080] 이 실시예는 폐결화된 릴렉신 폴리펩타이드 길항물질의 생성을 상술한다.

[1081] 이에 제한되는 것은 아니지만 릴렉신 수용체 결합에 수반된 것을 포함하는 잔기는 상기 기재한 바와 같이 다음의 비-자연적으로 암호화된 아미노산으로 치환된다. 일단 변형되면, 카보닐-함유 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드 변이체는 하기 형태의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응될 것이다:

[1082] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[1083] 상기 식에서 R은 메틸이며, n 은 4이고 N은 5,000; 10,000; 20,000; 30,000; 또는 40,000 MW이어서 폴리펩타이드 내 단일 부위에서 PEG 유도체에 의해 변형된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 릴렉신 폴리펩타이드

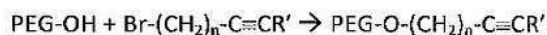
이드 길항물질을 만든다. 커플링, 정제 및 분석은 상기 기재한 바와 같이 수행된다.

[1084] 실시예 21

[1085] 펄렉신 분자가 직접적으로 연결된 펄렉신 폴리펩타이드 호모다이머, 헤테로다이머, 호모멀티머의 생성

[1086] 알카인-함유 아미노산을 포함하는 펄렉신 폴리펩타이드 변이체는 아지도-함유 아미노산을 포함하는 다른 펄렉신 폴리펩타이드 변이체에 직접적으로 커플링될 수 있다. 유사한 방식으로, 펄렉신 폴리펩타이드 폴리펩타이드는 하나 이상의 다른 폴리펩타이드에 커플링되어 헤테로다이머, 호모멀티머 또는 헤테로멀티머를 형성할 수 있다. 형성될 수 있는 멀티머에 관한 더 상세한 기재는 상기 실시예 16 및 17에서 제공되며, 커플링, 정제 및 분석은 상기 기재한 바와 같이 수행된다.

[1087] 실시예 22

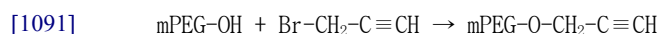


[1088] A

B

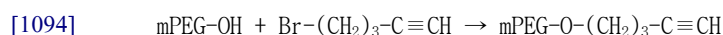
[1089] 폴리알킬렌 글라이콜(P-OH)은 알킬할로젠화물(A)과 반응되어 에터(B)를 형성한다. 이들 화합물에서, n은 1 내지 9의 정수이며, R'는 직쇄 또는 분지쇄, 포화되거나 또는 불포화된 C1 내지 C20 알킬 또는 헤테로알킬 기일 수 있다. R'는 C3 내지 C7 포화된 또는 불포화된 사이클릭 알킬 또는 사이클릭 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴 또는 헤테로아릴 기 또는 치환된 또는 비치환된 알카릴(알킬은 C1 내지 C20 포화된 또는 불포화된 알킬임) 또는 헤테로알카릴 기일 수 있다. 전형적으로, PEG-OH는 800 내지 40,000 달톤(Da)의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 또는 모노메톡시 폴리에틸렌 글라이콜(mPEG)이다.

[1090] 실시예 23



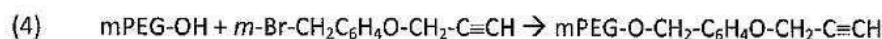
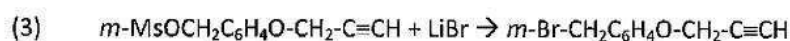
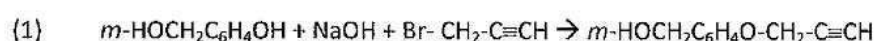
[1092] 20,000Da(mPEG-OH 20kDa; 2.0g, 0.1mmol, Sunbio)의 분자량을 갖는 mPEG-OH를 THF(35ml) 중의 NaH(12mg, 0.5 mmol)로 처리하였다. 프로파길 브로마이드 용액을 자일렌 중의 80% 중량 용액으로서 용해시키고(0.56ml, 5mmol, 50 당량, Aldrich), 그 다음에 촉매적 양의 KI를 용액에 첨가하였으며, 얻어진 혼합물을 2시간 동안 환류로 가열하였다. 그 다음에 물(1ml)을 첨가하였고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사에 CH₂Cl₂(25ml)를 첨가하였고, 유기층을 분리시키며, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 용적을 대략 2ml로 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 다이에틸 에터(150ml)에 적하하였다. 얻어진 침전물을 수집하였고, 몇 부분의 차가운 다이에틸에터로 세척하였으며, 건조시켜 프로파길-O-PEG를 얻었다.

[1093] 실시예 24



[1095] 20,000Da의 분자량을 갖는 mPEG-OH(mPEG-OH 20kDa; 2.0g, 0.1mmol, Sunbio)를 THF(35ml) 중의 NaH(12mg, 0.5mmol)로 처리하였다. 50 당량의 5-브로모-1-펜틴(0.53ml, 5mmol, Aldrich) 및 촉매적 양의 KI를 그 다음에 혼합물에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 16시간 동안 환류로 가열하였다. 그 다음에 물(1ml)을 첨가하였고, 진공 하에 용매를 제거하였다. 잔사에 CH₂Cl₂(25ml)를 첨가하고, 유기층을 분리시켰으며, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 용적을 대략 2ml로 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 다이에틸 에터(150ml)에 적하하였다. 얻어진 침전물을 수집하였고, 몇몇 부분의 차가운 다이에틸 에터로 세척하였으며, 건조시켜 대응하는 알카인을 얻었다. 5-클로로-1-펜틴을 유사한 반응에서 사용할 수 있다.

[1096] 실시예 25



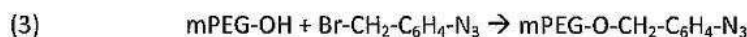
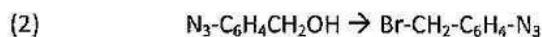
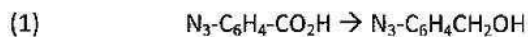
[1097]

- [1098] THF(50ml) 및 물(2.5ml) 중의 3-하이드록시벤질알코올(2.4g, 20mmol) 용액에 분말화된 수산화나트륨(1.5g, 37.5mmol)을 우선 첨가한 다음 브롬화 프로파길 용액을 첨가하였고, 자일렌(3.36ml, 30mmol) 중의 80% 중량 용액으로서 용해시켰다. 반응 혼합물을 환류로 6시간 동안 가열시켰다. 혼합물이 10% 시트르산(2.5ml)을 첨가하였고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사를 에틸 아세테이트(3×15ml)로 추출하였고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액으로 세척하였으며(10ml), MgSO₄로 건조시키고, 농축시켜 3-프로파길옥시벤질 알코올을 제공하였다.
- [1099] 메탄설포닐 클로라이드(2.5g, 15.7mmol) 및 트라이에틸아민(2.8ml, 20mmol)을 0℃에서 CH₂Cl₂ 중의 화합물 3(2.0g, 11.0mmol) 용액에 첨가하였고, 반응물을 16시간 동안 냉장고에 두었다. 보통의 워크업으로 인한 황색 오일로서 메실레이트를 얻었다. 이 오일(2.4g, 9.2mmol)을 THF(20ml) 중에 용해시키고, LiBr(2.0g, 23.0mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 환류로 가열한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 혼합물에 물(2.5ml)을 첨가하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사를 에틸 아세테이트(3×15ml)로 추출하고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액(10ml)으로 세척하였으며, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 농축시켜 원하는 브롬화물을 제공하였다.
- [1100] mPEG-OH 20kDa(1.0g, 0.05 mmol, Sunbio)을 THF(20ml) 중에서 용해시켰고, 용액을 빙욕 내에서 냉각시켰다. NaH(6mg, 0.25mmol)를 몇 분의 기간에 걸쳐 격렬한 교반과 함께 첨가한 다음 상기로부터 얻은 브롬화물(2.55g, 11.4mmol) 및 촉매적 양의 KI를 첨가하였다. 냉각된 욕을 제거하고, 얻어진 혼합물을 12시간 동안 환류로 가열하였다. 물(1.0ml)을 혼합물에 첨가하고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사에 CH₂Cl₂(25ml)를 첨가하고, 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키며, 용적을 대략 2ml로 감소시킨다. 에터 용액(150ml)에 적하하여 백색 침전물을 야기하였고, 수집하여 PEG 유도체를 수득하였다.
- [1101] 실시예 26
- [1102] $m\text{PEG-NH}_2 + \text{X-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-C}\equiv\text{CR} \rightarrow m\text{PEG-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-C}\equiv\text{CR}'$
- [1103] 말단 알카인-함유 폴리(에틸렌 글라이콜) 폴리머는 또한 상기 나타낸 바와 같이 알카인 작용기를 함유하는 반응 분자에 말단 작용기를 함유하는 폴리(에틸렌 글라이콜)을 커플링시킴으로써 얻어질 수 있고, n은 1 내지 10이다. R'은 H 또는 C1 내지 C4의 작은 알킬 기일 수 있다.
- [1104] 실시예 27
- (1) $\text{HO}_2\text{C-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{NHS} + \text{DCC} \rightarrow \text{NHSO-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (2) $m\text{PEG-NH}_2 + \text{NHSO-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{PEG-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- [1105]
- [1106] 4-펜티논산(2.943g, 3.0mmol)을 CH₂Cl₂(25ml) 중에 용해시켰다. N-하이드록시숙신이미드(3.80g, 3.3mmol) 및 DCC(4.66g, 3.0mmol)을 첨가하였고, 용액을 실온에서 밤새 교반시켰다. 얻어진 조질의 NHS 에스터 7을 추가 정제 없이 다음 반응에서 사용하였다.
- [1107] 5,000Da(mPEG-NH₂, 1g, Sunbio)의 분자량을 갖는 mPEG-NH₂를 THF(50ml) 중에서 용해시켰고, 혼합물을 4℃로 냉각시켰다. NHS 에스터 7(400mg, 0.4mmol)을 격렬한 교반과 함께 부분적으로 첨가하였다. 혼합물을 3시간 동안 교반시키는 한편, 실온으로 가온시켰다. 그 다음에 물(2ml)을 첨가하였고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사에 CH₂Cl₂(50ml)를 첨가하고, 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키며, 용적을 대략 2ml로 감소시켰다. 이 CH₂Cl₂ 용액을 에터(150ml)에 적하하였다. 얻어진 침전물을 수집하였고, 진공에서 건조시켰다.
- [1108] 실시예 28
- [1109] 이 실시예는 폴리(에틸렌 글라이콜)의 메탄 설포닐 에스터의 제조를 나타내는데, 이는 또한 메탄설포네이트 또는 폴리(에틸렌 글라이콜)의 메실레이트로서 언급될 수 있다. 대응하는 토실레이트 및 할로겐화물을 유사한 과정에 의해 제조할 수 있다.
- [1110] $m\text{PEG-OH} + \text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl} + \text{N(Et)}_3 \rightarrow m\text{PEG-O-SO}_2\text{CH}_3 \rightarrow m\text{PEG-N}_3$
- [1111] 150ml의 톨루엔 중의 mPEG-OH(MW = 3,400, 25g, 10mmol)을 질소 하에 2시간 동안 공비증류시켰고, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 40ml의 건조 CH₂Cl₂ 및 2.1ml의 건조 트라이에틸아민(15mmol)을 용액에 첨가하였다. 용액을 빙욕 내에서 냉각시키고, 1.2ml의 증류시킨 메탄설포닐 클로라이드(15mmol)를 적하하였다. 용액을 질소 하에 밤새 실온에서 교반시켰고, 2ml의 무수 에탄올을 첨가함으로써 반응을 퀸칭시켰다. 혼합물을 진공 하에 증류시켜 우선 톨루엔 이외의 용매를 제거하였고, 여과시켰으며, 진공 하에서 다시 농축시킨 다음, 100ml의 다이에틸 에터 내

에 침전시켰다. 여과액을 몇몇 부분의 차가운 다이에틸 에터로 세척하였고, 진공에서 건조시켜 메실레이트를 얻었다.

[1112] 메실레이트(20g, 8mmol)를 75mℓ의 THF 중에 용해시키고, 용액을 4℃에서 냉각시켰다. 냉각시킨 용액에 아자이드 나트륨(1.56g, 24mmol)을 첨가하였다. 반응물을 질소 하에 환류로 2시간 동안 가열시켰다. 그 다음에 용매를 증발시키고, 잔사를 CH₂Cl₂(50mℓ)로 희석시켰다. 유기 분획을 NaCl 용액으로 세척하였고, 무수 MgSO₄로 건조시켰다. 용적을 20mℓ로 감소시키고, 150mℓ의 차가운 건조 에터의 첨가에 의해 생성물을 침전시켰다.

[1113] 실시예 29



[1114]

[1115] 4-아지도벤질 알코올을 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제5,998,595호에 기재된 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 메탄설폰일 클로라이드(2.5g, 15.7mmol) 및 트라이에틸아민(2.8mℓ, 20mmol)을 0℃에서 CH₂Cl₂ 중의 4-아지도벤질 알코올(1.75g, 11.0mmol)의 용액에 첨가하였고, 반응물을 16시간 동안 냉장고 내에 두었다. 보통의 워크업으로 인한 황색 오일로서 메실레이트를 얻었다. 이 오일(9.2mmol)을 THF(20mℓ) 중에 용해시키고, LiBr(2.0g, 23.0mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 환류로 가열한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 혼합물에 물(2.5mℓ)을 첨가하였고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사를 에틸 아세테이트(3×15mℓ)로 추출하였고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액(10mℓ)으로 세척하였으며, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 농축시켜 원하는 브롬화물을 제공하였다.

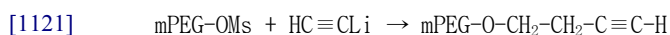
[1116] mPEG-OH 20kDa(2.0g, 0.1 mmol, Sunbio)을 THF(35mℓ) 중의 NaH(12mg, 0.5mmol)로 처리하였고, 브롬화물(3.32g, 15mmol)을 촉매적 양의 KI와 함께 혼합물에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 12시간 동안 환류로 가열하였다. 물(1.0mℓ)을 혼합물에 첨가하였고, 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사에 CH₂Cl₂(25mℓ)를 첨가하였고, 유기층을 분리시키고, 무수 Na₂SO₄로 건조시켰으며, 용적을 대략 2mℓ로 감소시켰다. 에터 용액(150mℓ)에 적하로 침전물을 야기하였으며, 이를 수집하여 mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃를 수득하였다.

[1117] 실시예 30



[1119] NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H(MW 3,400Da, 2.0g)를 NaHCO₃(10mℓ)의 포화 수용액 중에 용해시켰고, 용액을 0℃로 냉각시켰다. 3-아지도-1-N-하이드록시숙신이미도 프로피오네이트(5 당량)를 격렬한 교반과 함께 첨가하였다. 3시간 후, 20mℓ의 H₂O를 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 추가 45분 동안 교반시켰다. 0.5N H₂SO₄에 의해 pH를 3으로 조절하였고, NaCl를 대략 15 wt% 농도로 첨가하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(100mℓ×3)로 추출하였고, Na₂SO₄로 건조시켰으며, 농축시켰다. 차가운 다이에틸 에터로 침전시킨 후, 생성물을 여과에 의해 수집하였고, 진공 하에 건조시켜 오메가-카복시-아자이드 PEG 유도체를 수득하였다.

[1120] 실시예 31



[1122] 당업계에 공지된 바와 같이 제조되고 THF 중에서 -78℃로 냉각시킨 리튬 아세틸라이드(4 당량)의 용액에, 격렬한 교반과 함께 THF 중에 용해시킨 mPEG-OM 용액을 적하한다. 3시간 후, 반응물을 실온으로 가온시키고 1mℓ의 뷰탄올의 첨가로 퀀칭시켰다. 그 다음에 20mℓ의 H₂O를 첨가하였고, 혼합물을 추가 45분 동안 실온에서 교반시켰다. 0.5N H₂SO₄에 의해 pH를 3으로 조절하였고, NaCl을 대략 15중량%의 농도로 첨가하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(100mℓ×3)로 추출하였고, Na₂SO₄로 건조시켰으며, 농축시켰다. 차가운 다이에틸에터로 침전시킨 후, 생성물을 여과에 의해 수집하였고, 진공 하에 건조시켜 1-(뷰트-3-인일옥시)-메톡시폴리에틸렌 글라이콜(mPEG)을 수득하였다.

[1123] 실시예 32

[1124] 아자이드- 및 아세틸렌-함유 아미노산을 문헌[L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin et

al., Science 301:964-7 (2003)), J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem Biochem 3(11): 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024: 및, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm, 1:1-11]에 기재된 방법을 사용하여 부위-선택적으로 단백질 내에 포함시킬 수 있다. 일단 아미노산이 포함되었으면, 사이클로첨가 반응을 2mM PEG 유도체, 1mM CuSO₄, 및 ~1mg Cu-와이어의 존재에서 37℃로 4시간 동안 포스페이트 완충제(PB), pH 8 중의 0.01mM에 의해 수행한다.

[1125] 실시예 33

[1126] 이 실시예는 p-아세틸-D,L-페닐알라닌(pAF) 및 m-PEG-하이드록실아민 유도체의 합성을 기재한다.

[1127] 라세미 pAF를 문헌[Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746]에서 앞서 기재된 과정을 사용하여 합성한다.

[1128] m-PEG-하이드록실아민 유도체를 합성하기 위하여, 다음의 과정을 완료한다. 1시간 동안 실온(RT)에서 교반한 다이클로로메탄(DCM, 70mL) 중의 (N-t-Boc-아미노옥시)아세트산(0.382g, 2.0mmol) 및 1,3-다이아이소프로필카보다이이미드(0.16mL, 1.0mmol)의 용액에 메톡시-폴리에틸렌 글라이콜아민(m-PEG-NH₂, 7.5g, 0.25 mmol, Mt. 30 K, ioVectra제) 및 다이아이소프로필에틸아민(0.1mL, 0.5mmol)을 첨가한다. 반응물을 실온에서 48시간 동안 교반시킨 다음, 약 100mL로 농축시킨다. 혼합물을 차가운 에터(800mL)에 적하한다. t-Boc-보호된 생성물을 침전시키고, 여과에 의해 수집하며, 에터 3×100mL로 세척한다. DCM(100mL) 중에서 재용해시킴으로써 추가로 정제하고, 에터(800mL) 중에서 2회 침전시킨다. 생성물을 진공에서 건조시켜, 7.2g(96%)을 수득하고, NMR 및 Nihydrin 시험으로 확인한다.

[1129] 상기 얻어진 보호된 생성물(7.0g)의 deBoc을 0℃에서 1시간 동안 그 다음에 실온에서 1.5시간 동안 50% TFA/DCM(40mL) 중에서 수행한다. 진공에서 대부분의 TFA를 제거한 후, 잔사에 다이옥산(1mL) 중의 4N HCl을 첨가함으로써 하이드록실아민 유도체의 TFA 염은 HCl로 변환된다. 침전물을 DCM(50mL) 중에 용해시키고, 에터(800 mL) 중에서 재침전시킨다. 최종 생성물(6.8g, 97%)을 여과에 의해 수집하고, 에터로 3×100mL 세척하며, 진공 중에서 건조시키고, 질소 하에 저장한다. 다른 PEG(5K, 20K) 하이드록실아민 유도체를 동일 과정을 사용하여 합성한다.

[1130] 실시예 34

[1131] 폐길화된 틸락신의 생체내 연구

[1132] PEG-틸락신, 미변형 틸락신 및 완충제 용액을 마우스 또는 래트에 투여한다. 결과는 미변형 틸락신과 비교하여 본 발명의 폐길화된 틸락신의 우수한 활성 및 연장된 반감기를 나타낼 것이다. 유사하게, 변형된 틸락신, 미변형 틸락신 및 완충제 용액을 마우스 또는 래트에 투여한다.

[1133] 약동학적 분석

[1134] 본 발명의 틸락신 폴리펩타이드를 마우스에 정맥내 또는 피하 경로에 의해 투여한다. 투여전 및 투여 후 시점에 동물을 출혈시킨다. 각 샘플로부터 혈장을 수지하였고, 방사 면역 분석에 의해 분석한다. 배설 반감기를 계산하고 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸락신 폴리펩타이드와 야생형 틸락신 또는 본 발명의 다양한 틸락신 유사체 폴리펩타이드를 비교할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 틸락신 폴리펩타이드는 게잡이원숭이에 투여될 수 있다. 투여전 및 투여 후 시점에 동물을 출혈시킨다. 각 샘플로부터 혈장을 수지하였고, 방사 면역 분석에 의해 분석한다.

[1135] 폴리펩타이드를 다회 용량, 연속적 주입 또는 1회 용량 등을 통해 마우스에 투여할 수 있다.

[1136] 실시예 35

[1137] Novagen 발현 시스템(유도성 T7 프로모터; 본 명세서에 참조로서 포함된 pET System Manual, version 9에서 상세하게 기재됨), 발현 벡터 pET30a 및 발현 균주 BL21(DE3)를 사용하여 틸락신을 발현시킨다.

[1138] 2mL의 LB/카나마이신(10μg/mL) 배양물을 원하는 유사체와 함께 형질변환시킨 BL21(DE3) 플레이트로부터의 스웵(sweep)으로 접종한다. 이는 발현 수준에서 콜로니 대 콜로니 가변성에 의해 야기된 효과를 감소시킨다. 이 배양물을 격렬한 진탕과 함께 37℃에서 밤새 성장시킨 후, 10mL LB/카나마이신 배양물을 밤새 배양물로부터 1mL로 접종시킨다(OD600 ~ 0.4-0.5). 밤새 배양물의 남은 mL를 글라이세롤 저장액으로서 냉동시킬 수 있다.

- [1139] OD600이 0.8 내지 0.9에 도달할 때까지 30 내지 45분 동안 성장 배양물의 10ml를 37℃ 및 250 rpm에 넣는다. 그 다음에 이것을 1mM IPTG와 함께(미-유도 배양 대조군으로서 제외될 수 있는 1ml와 함께) 유도시키고, 보통 유도 후 3 내지 4시간에 채취하고, SDS-PAGE로 분석한다.
- [1140] 또한 축적, 단백질 안정성 등의 비율을 결정하기 위한 발현 시간과정(예를 들어, 유발 후 시점 1, 2, 4, 6 및 0/N)이 가능할 수 있다.
- [1141] 겔 분석; 원하는 시점에 유도 후 1ml를 배양물로부터 채취하고, 세포를 스핀다운시키고, 100 μ l의 2X SDS-PAGE 중에서 재현탁시키며, 초음파처리하여 점성도를 감소시키고, 10 μ l에 SDS-PAGE를 실행시킨다. 원한다면, 이를 비-유도 대조군 또는 대조군들과 비교할 수 있고/있거나 공지된 양성 대조군 또는 표준 및 발현 수를 추정할 수 있다(예를 들어, 양호한 발현이 100 μ g/ml에 있을 수 있다). 웨스턴 블롯 분석을 또한 사용할 수 있다. 또한 4ml의 배양물을 제외할 수 있고, 봉입체(불용성 유사체를 발현시킨다면)를 제조하고, 과발현된 단백질의 동일성을 확인하기 위하여 이것에서 질량 분석을 얻는다.
- [1142] 더 큰 규모의 단백질 발현을 위하여, 250ml 초과인 LB/카나마이신(10 μ g/ml)을 냉동 글라이세롤 저장액의 250 μ l로 집중시키고, 밤새 성장시킨다. 다음날, 10 X 1 l LB/카나마이신 배양물을 밤새 배양물(OD600 ~ 0.1)로부터의 25ml로 집중시킨다.
- [1143] 1 l 배양물을 OD600가 0.8 내지 0.9에 도달할 때까지 37℃ 및 250 rpm에서 2시간 동안 성장시킨다. 그 다음에 1mM IPTG로 유도하고, 4시간 유도 후 또는 다음날 아침까지 채취한다(채취는 15분 동안 4,000 rpm에서 원심분리를 사용할 수 있다). 엔도톡신을 감소시키고, 정제를 용이하게 하는 것이 필요하다면 펠렛을 50mM Tris-HCl, pH 8.0(펠렛 당 50ml + 보틀을 세정하기 위한 50ml)로 세정한다. 펠렛을 함께 풀링하고, 다시 회전시킨다.
- [1144] 실시예 36
- [1145] 피키아 발현 연구 - DNA 분취, 전기천공법, 발현 프로토콜
- [1146] 이 실시예는 피키아에서 본 발명의 릴랙신 폴리펩타이드 제조를 위한 프로토콜을 제공한다. 서열번호 34, 35, 36 및 37이 사용되며, 플라스미드는 피키아 내로 클로닝을 위해 사용될 수 있고, 이것 또는 다른 변형된 플라스미드는 피키아 내 릴랙신 폴리펩타이드의 단백질 발현을 얻기 위해 사용될 수 있으며, 변형은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 플라스미드로 만들어진다.
- [1147] 프로토콜의 제1일에, 분해되는 μ g DNA 당 2U 효소를 전형적으로 사용하여 밤새 분해시키고, 10ml YPhyD 배양물을 50ml 플라스크 내에 밤새 집중시키며, 글라이세롤 저장액으로부터 260rpm, 30℃에서 진탕시킨다.
- [1148] DNA 제조
- [1149] DNA를 첫 번째 1/10th 용적 멸균 3M NaOAc 다음, 0.7 용적 멸균 IPA의 첨가에 의해 침전시킨 다음, 샘플을 격렬하게 혼합하고, 침전을 밤새 -20℃ 또는 -70℃에서 냉동될 때까지 계속한다. 그 다음에, DNA를 원심분리에 의해 펠렛화하고(벤치탑 원심분리 14,000 rpm/10분), 상청액을 제거하며, 펠렛을 500 μ l의 멸균 70% ETOH를 사용하여 세척한다. 회전시키고(벤치-탑 원심분리기 14,000 rpm/10 분), 상청액 및 대기 건조 펠렛을 15 내지 20분 동안 디캔팅한다. DNA 펠렛을 멸균수에 의해 1 μ g/ μ l로 재현탁시키고, 10 μ g DNA로 피키아를 형질변환시킨다.
- [1150] 전기천공법
- [1151] OD₆₀₀으로 밤새 배양을 사용하여, OD₆₀₀=0.2로 YPhyD 중에서 희석시킨다. OD₆₀₀이 0.8 내지 1.0에 도달할 때까지 260rpm, 30℃에서 진탕 배양시킨다. 원심분리(4000rpm/5 분)에 의해 세포를 수집한다. 배지를 디캔트시키고, 20 ml 얼음 냉각 멸균수 중에서 세포를 세척하며, 다시 디캔팅하고, 반복한다. 물로 세척한 후, 20ml의 빙냉 멸균 1 M 솔비톨 중에서 펠렛을 세척하고, 디캔팅하며, 600 μ l의 1M 차가운 솔비톨 중에서 세척한 세포 펠렛을 재현탁시킨 다음, 이를 얼음 상에 저장할 수 있다.
- [1152] 세척한 세포로부터, 50 μ l를 멸균 1.5ml 에펜도르프 튜브 내 10 μ g 선형화된 DNA와 혼합하고, 부드럽게 혼합하며 25분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한다. 긴 피펫 팁을 사용하여 세포/DNA 혼합물을 사전냉각시킨 0.2cm 큐벳에 옮긴다. 다음의 설정: 2000 V, 200 Ohm, 25 μ Fd(단일 펄스를 사용)으로 BioRad GenePulsar II 단위를 사용하여 세포를 전기천공시키고, 큐벳에 0.5ml YPhyD 배지를 즉시 첨가하며, 피펫팅에 의해 혼합한다. 전체 내용물을 멸균 둥근 바닥 튜브에 옮기고, 30℃에서 30분 동안 부드럽게 진탕시킨다(200 rpm). 플레이팅하고, 세포를 균일하게 펼치며, 플레이트를 인큐베이션하고, 30℃에서 3일 동안 뒤집어 놓는다.

- [1153] 3일 인큐베이션 후, 루프로 콜로니를 집고, 50ml 플라스크 내 10ml BYPhyD 배지를 접종하며, 3일 동안 30℃에서 인큐베이션한다. 20 μ l 플레이트 상의 콜로니를 계측하고, 평균 수를 기록한 다음 세포를 채취하고, 균주명 및 클론 수, 틸락신(즉, 발현된 단백질) 및 낱자를 라벨링한 2세트의 냉동 바이알(cryovial)을 우선 준비한다. 배양물을 15ml 원뿔형 튜브에 옮기고, 각 배양물의 OD600을 취하며, YPhyD 배지 내에서 배양물을 1:50 또는 1:20을 희석시킨다. 글라이세롤 저장액에 대한 배양물의 알리쿼트를 저장한다. 그 다음에, 5분 동안 실온에서 4000rpm에서 효모를 펠렛화하고, 새로 라벨을 붙인 15ml 원뿔형 튜브에 옮기며, 분석 데이터가 필요할 때까지 -20 또는 -80℃에서 저장한다.
- [1154] 단백질 발현 분석
- [1155] 4-12% NuPAGE TB 겔(Novex) 상의 실험 샘플. SDS-PAGE 시약은 Invitrogen제를 사용하였고, 웨스턴 블롯 또는 염색-겔 분석에 의해 분석한다.
- [1156] 배지 조제물
- [1157] **완충된 효모 조직편 텍스트로스(BYPhyD)**
- [1158] 효모 추출물 10 g/ ℓ
- [1159] 피톤 펩톤 20 g/ ℓ
- [1160] 1 M 인산칼륨 완충제(pH 6) 100ml/ ℓ
- [1161] 10XYNB 100ml/ ℓ
- [1162] 20% 텍스트로스 100ml/ ℓ
- [1163] **효모 피톤 텍스트로스(YPhyD)**
- [1164] 효모 추출물 10 g/ ℓ
- [1165] 피톤 펩톤 20 g/ ℓ
- [1166] 20% 텍스트로스 100ml ℓ
- [1167] **10X YNB(아미노산 없이 황산암모늄과 함께 13.4% 효모 질소 염기)**
- [1168] 효모 질소 염기 134 g/ ℓ
- [1169] 실시예 37
- [1170] 틸락신 A21G 생성
- [1171] 이 실시예에서, 4.0 ℓ 배양물을 발효시켜 13.4g 습식 세포 페이스트를 생성하였고, Triton-X100과 함께 및 Triton-X100 없이 봉입체 제조를 수행하였다. 2.07g 습식 봉입체를 이 방법으로 생성하였고, 가용화 및 재폴딩을 따랐다. 봉입체를 습식 봉입체(IB)의 그램 당 200ml H₂O에 의해 3mM의 최종 농도로 재현탁시키고, 시스테인은 재현탁에 첨가한다. 그 다음에 IB를 가용화하여 실온에서 1시간 동안 pH를 11.5로 증가시킨다. 이어서 가용화된 물질의 pH를 10.6 \pm 0.1로 떨어뜨림으로써 재폴딩이 일어나도록 하였고, ~72시간 동안 2 내지 8℃에서 저장하였으며, 이들 결과를 도 10에 나타낸다. 3.0, 0.45 μ M의 최종 pH로 HCl의 첨가에 의해 재폴딩 반응을 중단시키고, 여과시켰으며, 추가 과정까지 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.
- [1172] Tris 염기에 의해 쿼칭된 재폴딩의 pH를 8.0으로 증가시키고, Q HP 칼럼 상에 직접 로딩함으로써 재폴딩 단백질을 정제한다. 나타낸 예에서 로딩의 전도도는 >3.5mS/cm이었다. 실험 조건은 (A) 20mM Tris, 8.0; (B) 20mM Tris, 8.0; 200mM NaCl이었고, 30CV에 걸쳐 0-100%B였다. 정확하게 재폴딩된 프로인슐린을 폴딩하였고, 79mg 프로인슐린을 회수하였다.
- [1173] 초미세여과/정용여과(UF/DF)를 행하였고, 25mM 아연으로 침전을 수행하였으며, 침전된 단백질을 20mM NaOAc, 4.0, 30% ACN으로 2mg/ml의 농도로 재현탁시켰고, 5mM EDTA 및 20K PEG를 10:1 PEG의 최종 물비로 단백질에 첨가하여 28℃에서 48 내지 72시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [1174] PEG 반응물을 0.5X PEG 완충제 A, 0.22 μ M 중에서 1:10으로 희석시키고, 여과시켰으며, SP 650S 칼럼을 거쳐서 실행하였다. 실험 후로는 (A) 10mM NaOAc, 4.0, 1mM EDTA; (B) 10mM NaOAc, 4.0, 1mM EDTA, 0.4M NaCl; 20CV에 걸쳐 0-50%B 및 10mM 시트르산나트륨, 6.5 중에서 조제된 PEG 샘플; 150mM NaCl이었고, 이를 도 12에

나타낸다.

- [1175] 이 방법을 사용하여 비-천연 아미노산을 갖는 다양한 펩티드 및 정제되고 폐기화된 변이체의 최종 단백질 양에 대해 0, 1-22mg 범위를 생성한다. ACN은 PEG 반응에서 PEG/단백질 혼합물을 가용화시키고, CAN의 존재 하에 pH 촉진된 농축에서 아연을 침전시킨다는 것이 발견되었다.
- [1176] 실시예 38
- [1177] 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐기화된 펩티드의 안전성 및/또는 효능의 인간 임상 시험.
- [1178] 목적: 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 피하로 투여된 폐기화된 재조합 인간 펩티드의 안전성 및 약동학을 관찰하는 것.
- [1179] 환자: 20 내지 40세 및 60 내지 90kg의 범위에 있는 18명의 건강한 지원자를 연구에 등록한다. 피험체는 혈액 또는 혈청 화학 및 음성 소변 독성학 스크린, HIV 스크린 및 B형 간염 표면 항원에 대해 임상적으로 유의한 비정상적 연구 값을 가지지 않을 것이다. 그것들은 다음 중 어떤 증거를 가지지 않아야 한다: 고혈압; 원발성 혈액 질환의 이력; 유의한 간, 신장, 심혈관, 위장관, 비뇨생식기, 대사, 신경학적 질환의 이력; 빈혈 또는 발작 장애의 이력; 박테리아 또는 포유류-유래 생성물, PEG 또는 인간 혈청 알부민에 대해 알려진 민감도; 카페인을 함유하는 음료에 대해 습관적이며 심한 소비자; 임의의 다른 임상시험에 참여 또는 연구참가 30일 이내에 수혈하거나 또는 장기기증; 연구 참가 3개월 이내에 펩티드에 노출; 연구 참가 7일 이내에 병에 걸림; 및 연구 참가 14일 이내에 연구전 생체 시험 또는 임상적 연구 평가에서 상당한 비정상성을 가짐. 모든 피험체를 안전성에 대해 평가할 수 있고, 약동학적 분석을 위한 모든 혈액 수집을 스케줄에 따라 수집한다. 모든 연구를 임상시험 윤리위원회 승인 및 환자 동의에 의해 수행한다.
- [1180] 연구 설계: 이는 건강한 남성 지원자에서 I상, 단일-기관, 공개, 무작위, 2-시기 교차시험 연구일 것이다. 18명의 피험체는 2가지 처리 순서 그룹 중 하나로 배정된다(9명 피험체/그룹). 비-자연적으로 암호화된 아미노산 및 상업적으로 이용가능한 선택된 제품을 포함하는 폐기화된 펩티드의 동일 용량을 사용하여 상부 대퇴부에 볼루스 피하 주사에 의해 2개의 별개 용량 기간에 걸쳐 펩티드를 투여한다. 상업적으로 입수가 가능한 제품의 투여 용량 및 빈도는 포장 라벨에 지시된 것과 같다. 피험체의 추가적인 그룹을 포함함으로써 상업적으로 입수가 가능한 제품을 사용하여 원한다면, 추가적인 용량, 용량 빈도 또는 다른 변수가 연구에 첨가될 수 있다. 각 용량 기간은 14일 세척 기간에 의해 분리된다. 피험체는 각각의 2회 용량 기간 동안 용량의 적어도 12시간 전 및 72시간 후 연구 중심으로 제한되지만, 용량 기간 중에는 그렇지 않다. 폐기화된 펩티드에 대해서도 시험되는 추가적인 용량, 빈도 또는 다른 변수가 있다면 피험체의 추가적인 그룹이 첨가될 수 있다. 펩티드의 실험 조제물은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐기화된 펩티드이다.
- [1181] 혈액 샘플링: 펩티드의 투여 전 및 투여 후 직접적인 정맥 구멍에 의해 연속적인 혈액을 회수하며, 혈청 펩티드 농축 결정을 위한 정맥 혈액 샘플(5mL)은 용량 전(3개의 기준 샘플) 약 30, 20 및 10분에 및 용량 후 대략 다음의 시간에 얻는다: 30분 및 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 및 72 시간. 각 혈청 샘플을 2개의 알리쿼트로 나눈다. 모든 혈청 샘플을 -20°C에 저장한다. 혈청 샘플을 드라이아이스 상에 둔다. 빠른 임상검사(혈액학, 혈청 화학 및 요검사)를 제1일에 초기 용량 바로 전, 제4일 아침, 제16일 용량 바로 전 및 제19일 아침에 수행한다.
- [1182] 생분석 방법: 혈청 펩티드 농도 결정을 위해 ELISA 키트를 사용한다.
- [1183] 안전성 결정: 각 용량 바로 전(제1일 및 제16일) 및 각 용량 후 6, 24, 48 및 72시간에 활력징후를 기록한다. 안전성 결정은 부작용의 징후 및 유형 및 기준으로부터 임상시험의 변화를 기반으로 한다. 추가로, 혈압 및 신체 시험 결과를 포함하는 활력징후 측정의 사전연구 변화를 평가한다.
- [1184] 데이터 분석: 용량 후 30, 20 및 10분에 수집한 3개의 샘플로부터의 펩티드 수준 평균으로부터 결정된 평균 기준 펩티드 농도를 각각의 용량 후 값으로부터 차감함으로써 용량 전 기준 펩티드 농도에 대해 용량 후 혈청 농도 값을 용량 후 혈청 농도 값을 보정한다. 용량 전 혈청 펩티드 농도는, 그것들이 분석의 정량화 수준 미만이라면 평균값의 계산에 포함되지 않는다. 기준 펩티드 농도에 대해 보정한 혈청 농도 데이터로부터 약동학적 변수를 결정한다. BIOAVL 소프트웨어의 가장 늦은 버전을 사용하여 Digital Equipment Corporation VAX 8600 컴퓨터 시스템 상에서 모델 독립적 방법에 의해 약동학적 변수를 계산한다. 다음의 약동학적 변수를 결정한다: 피크 혈청 농도(C_{max}); 최대 혈청 농도에 대한 시간(t_{max}); 선형 사다리꼴 법칙의 사용에 의해 계산한 0 내지 최종 혈액 샘플링 시간(AUC₀₋₇₂)의 농도-시간 곡선하 면적(AUC); 및 배설속도 상수로부터 계산한 마지막 배설 반감기(t_{1/2}). log-선형 농도-시간 플롯의 최종 선형 영역 내 연속적 데이터 지점의 선형 회귀에 의해 배설 속도

상수를 추정한다. 약동학적 변수의 평균, 표준편차(SD) 및 변동계수(CV)를 각 처리에 대해 계산한다. 변수 평균의 비(보존된 조제물/비-보존 조제물)를 계산한다.

- [1185] 안전성 결과: 부작용의 발생은 처리군을 가로질러 동일하게 분포된다. 기준 또는 연구전 임상시험 또는 혈압에서 임상적으로 유의한 변화가 없으며, 생리적 시험 결과 및 활력 징후 측정에서 연구 전에 주목할 만한 변화가 없다. 2가지 처리군에 대한 안전성 프로파일은 유사하게 나타나야 한다.
- [1186] 약동학적 결과: 각 시점에 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐길화된 틸렉신을 투여받은 후 모든 18명의 피험체에서 평균 혈청 틸렉신 농도-시간 프로파일(기준 틸렉신 수준에 대해 미보정)을 측정하였다. 모든 피험체는 정상 생리적 범위 내에서 용량 전 기준 틸렉신 농도를 가져야 하며, 약동학적 변수를 용량 전 평균 기준 틸렉신 농도에 대해 보정된 혈청 데이터로부터 결정하고, Cmax 및 tmax를 결정한다. 선택된 임의의 임상 비교기(들)에 대한 평균 tmax는 폐길화된 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신에 대한 tmax보다 상당히 더 짧다. 마지막 반감기 값은 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐길화된 틸렉신에 대한 마지막 반감기와 비교하여 임상전 비교기(들)에 대해 상당히 더 짧다.
- [1187] 본 연구가 건강한 남성 피험체에서 수행되지만, 유사한 흡수 특징 및 안전성 프로파일이 다른 환자 집단; 예컨대 당뇨병이 있는 남성 또는 여성 환자, 암 또는 만성 신장부전이 있는 남성 또는 여성 환자, 소아 신장 부전 환자, 자가조직 예치전 프로그램의 환자 또는 대기수술에 대한 계획이 있는 환자에서 기대된다.
- [1188] 결론적으로, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐길화된 틸렉신의 피하로 투여된 1회 용량은 안전하며 건강한 남성 피험체에 의해 잘 견뎌질 것이다. 부작용의 상대적 발생, 임상적 실험 값, 활력징후 및 생체시험 결과를 기반으로, 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 틸렉신 및 폐길화된 틸렉신의 상업적으로 이용가능한 형태는 동일할 것이다. 비-자연적으로 암호화된 아미노산을 포함하는 폐길화된 틸렉신은 잠재적으로 환자 및 건강 관리 제공자에게 큰 임상적 이용성을 제공한다.
- [1189] 실시예 39
- [1190] 틸렉신 기능 분석 개발
- [1191] 이 실시예는 틸렉신 기능 분석의 상세한 설명을 제공한다.
- [1192] 인간 말초혈액 단핵구, THP-1 세포를 사용하여 양성 대조군 아이소프로테레놀 및 포스콜린과 함께 측정가능한 cAMP 증가를 증명하였고, THP-1 세포를 30분 동안 500 μ M IBMX 중에서 사전인큐베이션시키며, 20분 동안 2 μ M 포스콜린으로 RLX를 공동자극시킨다. 야생형 A(B쇄의 첫 번째 아미노산 위치에서 알라닌을 가짐) 및 변이체 RLX-BA1-AV13pAF(B 쇄의 첫 번째 아미노산 위치에서 알라닌의 백본 아미노산 서열을 갖고, A 쇄의 위치 13(발린)에 대해 치환된 pAF를 갖는 틸렉신 변이체)를 포함하는 아이소프로테레놀, 포스콜린 및 틸렉신 폴리펩타이드는 네(4)개의 상이한 크기 PEG가 부착된다; 5K, 10K, 20K 및 30K. 표 5

표 5

기능적 분석 미가공 EC50 값 [ng/mL]

샘플	11/4/2010	11/5/2010	11/5/2010
RLX-D-WT	1.5	1.5	1.0
RLX-A-WT-001	3.6	3.3	2.6
RLX-A-AQ1-20KPEG-001		38	
RLX-A-AA5-20KPEG-001		41	
RLX-A-AV13-20KPEG-001		56	
RLX-A-AR18-20KPEG-001		68	
RLX-A-BV7-20KPEG-001	54		
RLX-A-BA18-20KPEG-001	172		
RLX-A-BW28-20KPEG-001	172		
RLX-A-BE5-20KPEG-001			45
RLX-D-BE5-20KPEG-001			58
RLX-D-AL2-20KPEG-001			43

[1193]

[1194]

실시예 40

[1195]

이 실시예는 SD 래트에서 1회 피하 주사 후 20kDa 폐길화된 릴렉신 폴리펩타이드의 약동학적 특성을 평가한다.

[1196]

스프래그-돌리(SD) 래트를 대략 7 내지 8주령(연구 시작 시 대략 280g)에 찰스리버랩오라토리즈(Charles River Laboratories, CRL)로부터 받았다. CRL에서 경정맥에 카테터를 꽂은 동물을 받았다. 그 다음에 연구 전 3일 동안 순응시켰다.

[1197]

동물은 제1일에 1회 피하 주사를 받았고, 이후 80시간에 걸쳐 PK 샘플을 수집하였다. 다음의 샘플링 스케줄에 따라서 혈청 농도의 분석을 위해 PEG-릴렉신으로 처리한 동물로부터 혈액 샘플을 취하였다(샘플링 시간은 비슷하다):

[1198]

제1일: 용량 전, 용량 후 1, 2, 4, 8, 12, 25, 34, 50, 58, 73 및 80 시간

[1199]

Ambrx에서 개발한 분석을 기반으로 브릿징 ECLA를 사용하여 화합물 농도를 측정하였다. 대응하는 용량 화합물로부터 만들어진 표준 곡선을 사용하여 농도를 계산하였고, 엑셀 스프레드시트 형식으로 기록하였다(부록 참조). 모델링 프로그램 WinNonlin(Pharsight, version 5.1)을 사용하여 약동학적 변수를 추정하였다. 선형-업/로그-다운 사다리꼴 통합에 의해 개개 동물 데이터에 대한 비구획 분석을 사용하였고, 농도 데이터를 균일하게 칭량하였다. 비구획 분석을 2개의 구획, 1차 제거 모델 및 Gauss-Newton(Levenberg-Hartley) 모델 적합화 식을 사용하여 수행하였다. 표 6은 시간에 대한 그룹 평균 PEG-릴렉신 혈청 농도 값을 나타낸다. 도 8은 투여된 모든 PEG-릴렉신 화합물에 대해 시간에 대한 그룹 평균 혈청 농도를 비교한다. 모든 용량 그룹은 측정가능한 혈청 PEG-릴렉신 수준을 가진다.

[1200]

시간에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-AQ1-RLX로 피하 용량 동물로부터 도 9에서 플롯팅하였다. 시간에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-AA5-RLX로 피하 용량 동물로부터 도 10에서 플롯팅하였다. 시간

에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-AR18-RLX로 피하 용량 동물로부터 도 11에서 플롯팅하였다. 시간에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-BV7-RLX로 피하 용량 동물로부터 도 12에서 플롯팅하였다. 시간에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-BW28-RLX로 피하 용량 동물로부터 도 13에서 플롯팅하였다. 시간에 대한 개개의 혈청 농도를 0.5mg/kg PEG20K-AV13로 피하 용량 동물로부터 도 14에서 플롯팅하였다.

[1201] 피하 용량의 동물로부터의 시간 데이터에 대한 혈청 농도의 비구획 분석을 표 6에 요약한다.

표 6

PBG-릴렉신의 1회 용량 후 SD 래트에 대한 평균 혈청 농도

그룹	시험 항목	용량 (mg/kg)	경로	성별	시간 (시간)	평균 농도 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	PD	BQL	NE	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	1	30.8	19.4	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	2	87.4	25.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	4	184.8	50.2	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	8	237.6	61.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	12	371.2	106.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	25	394.0	50.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	34	278.7	59.1	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	50	63.4	11.9	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	58	45.6	6.8	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	73	20.3	5.6	5
1	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	80	11.6	1.3	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	1	19.9	6.4	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	2	100.1	51.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	4	185.0	104.8	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	8	264.7	128.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	12	434.3	135.0	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	25	438.0	55.2	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수컷	34	353.5	44.2	5

[1202]

2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수 컷	50	86.9	19.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수 컷	58	62.4	10.6	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수 컷	73	32.8	8.1	5
2	20KPEG-AA5	0.5	SC	수 컷	80	22.1	5.4	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	PD	BQL	NE	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	1	33.9	17.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	2	109.7	32.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	4	172.7	48.2	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	8	270.5	55.3	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	12	332.5	57.7	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	25	398.6	37.6	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	34	264.3	33.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	50	76.7	6.9	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	58	61.8	9.0	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	73	25.0	4.8	5
3	20KPEG-AR18	0.5	SC	수 컷	80	14.9	3.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	1	25.7	4.6	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	2	98.9	20.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	4	248.5	75.5	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	8	343.5	81.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	12	457.3	91.0	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	25	518.5	57.7	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	34	270.4	64.5	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	50	104.0	14.8	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	58	63.5	8.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	73	26.0	3.1	5
4	20KPEG-BV7	0.5	SC	수 컷	80	22.6	2.6	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	PD	BQL	NE	5

[1203]

5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	1	36.4	15.4	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	2	107.9	61.5	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	4	228.5	86.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	8	380.9	144.0	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	12	486.6	135.4	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	25	511.0	60.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	34	404.8	51.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	50	184.2	31.3	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	58	122.3	37.2	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	73	48.8	6.1	5
5	20KPEG-BW28	0.5	SC	수 컷	80	37.1	5.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	PD	BQL	NE	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	1	44.9	16.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	2	138.9	60.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	4	345.7	117.1	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	8	533.6	157.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	12	630.1	201.2	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	25	742.5	117.4	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	34	540.7	31.0	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	50	320.9	21.3	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	58	209.4	22.5	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	73	75.0	4.8	5
6	20KPEG-AV13	0.5	SC	수 컷	80	58.7	7.7	5

NE, 평가하지 않음; BQL, 정량화할 수 있는 한계 미만; PD, 사전-용량

[1204]

표 7

	AQ1-RLX	AA5-RLX	AR18-RLX	BV7-RLX	BW28-RLX	AV13-RLX
최종 HL(시간)	10.7	12.2	12.5	13.1	13.9	14.6
C_{max} (ng/mL)	394.0	438.0	345.9	471.6	511.0	742.5
T_{max} (시간)	25.0	25.0	25.0	12.0	25.0	25.0
AUC_{inf} (ng* 시간/mL)	14237.9	16095.9	12985.5	17260.9	22191.2	32230.5
V_z (mL/kg)	540.7	547.4	694.7	546.9	452.6	325.4
CL (mL/시간)	35.1	31.1	38.4	28.9	22.5	15.5
MRT (시간)	26.7	29.4	27.7	27.9	31.1	32.7

농도 대 시간 곡선을 비구획 분석에 의해 평가하였다(Pharsight, 버전 4.1), 그룹 당 N=5 래트, 최종 HL, 최종 반감기; C_{max} , 측정된 최대 혈청 농도; T_{max} , C_{max} 가 발생한 시간; AUC_{inf} , 모든 혈청 샘플에 대한 농도-시간 곡선하면적/무한대로 추정된 시점; CL, 명백한 전체 혈청 클리어런스; V_z , 최종 단계 동안 분포의 명백한 용적.

[1205]

[1206]

혈청 농도 측정을 위해 사용한 ECLIA 방법으로 용량 용액을 측정하였다. 분석 범위 내에 있도록 용량 용액을 희석하였다. 모든 20KPEG-RLX 용량 용액은 이론(PDT)과 다른 구체화된 30% 차이 내에 있다. 이하의 표 8은 이 연구를 위한 용량 용액 분석의 결과를 요약한다.

표 8

완충제 내 용량 전 (DSA1)	공칭 농도 (ng/mL)	희석인자	농도 (ng/mL)	PDT%
RLX-A-AQ1-20K PEG	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K PEG	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K PEG	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K PEG	500000	20000	571645	14

[1207]

[1208]

실시예 41

[1209]

이 실시예는 SD 래트에서 1회 피하 주사 후 야생형(WT) 릴렉신 화합물의 약동학적 특성을 평가한다.

[1210]

스프래그-돌리(SD) 래트를 대략 5주령(연구 시작 시 대략 280g)에 찰스리버레오폐토리즈(CRL)로부터 받았다.

CRL에서 경정맥에 카테터를 꽂은 동물을 받았다. 그 다음에 연구 전 3일 동안 순응시켰다.

[1211] 동물은 제1일에 1회 피하 주사를 받았고, 이후 12시간에 걸쳐 PK 샘플을 수집하였다. 다음의 샘플링 스케줄에 따라서 혈청 농도의 분석을 위해 WT rhRelaxin으로 처리한 동물로부터 혈액 샘플을 취하였다(샘플링 시간은 비슷하다): 제1일: 용량-전, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 9 및 12 시간 용량 후.

[1212] Ambrx에서 개발한 분석을 기반으로 브릿징 ECLA를 사용하여 화합물 농도를 측정하였다. 대응하는 용량 화합물로부터 만들어진 표준 곡선을 사용하여 농도를 계산하였고, 엑셀 스프레드시트 형식으로 기록하였다(부록 참조). 모델링 프로그램 WinNonlin(Pharsight, version 5.1)을 사용하여 약동학적 변수를 추정하였다. 선형-업/로그-다운 사다리꼴 통합에 의해 개개 동물 데이터에 대한 비구획 분석을 사용하였고, 농도 데이터를 균일하게 칭량하였다.

[1213] 도 9는 시간에 대한 그룹 평균 wt rh릴렉신 혈청 농도를 나타낸다. 도 1은 wt rh릴렉신에 대해 시간에 따른 평균 혈청 농도를 비교한다. 모든 동물은 측정가능한 혈청 릴렉신 수준을 가진다.

[1214] 0.5mg/kg wt 릴렉신으로 피하 용량 동물로부터 시간에 대한 개개의 혈청 농도를 도 2에서 플롯팅한다. 피하 용량의 동물로부터 시간 데이터에 따른 혈청 농도의 비구획 분석을 표 2에 요약한다. 표 9는 용량 용액 분석의 요약이다. 용량 용액은 30% PDT 이하의 허용되는 기준을 충족시킨다.

표 9

그룹	시험 항목	용량 (mg/kg)	경로	성별	시간(시간)	평균농도 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	PD	BQL	NE	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	0.33	244.0	18.7	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	0.66	227.9	45.6	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	1	211.7	45.9	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	1.5	166.7	38.7	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	2	119.9	24.5	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	3	52.5	23.0	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	4	24.1	11.4	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	5	7.7	2.6	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	6	BQL	NE	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	9	BQL	NE	5
1	wt rh릴렉신	0.5	SC	수컷	12	BQL	NE	5

[1215] NE, 평가하지 않음; BQL, 정량화할 수 있는 한계 미만; PD, 사전-용량

표 10

SD 래트에서 투약된 wt rhRelaxin에 대한 약동학적 변수 값

	wt rh 릴랙신
최종 HL (시간)	0.8 (0.1)
C_{max} (ng/mL)	258.1 (26.1)
T_{max} (시간)	0.5 (0.2)
AUC_{inf} (ng*hr/mL)	508.9 (81.8)
V_z (mL/kg)	1159 (284)
CL (mL/ 시간)	1006 (185)
MRT (시간)	1.56 (0.16)

농도 대 시간 곡선을 비구획 분석에 의해 평가하였다(Pharsight, 버전 4.1).

그룹 당 N=5 래트, 최종 HL, 최종 반감기; C_{max} , 측정된 최대 혈청 농도;

T_{max} , C_{max} 가 발생한 시간; AUC_{inf} , 모든 혈청 샘플에 대한 농도-시간 곡선
하면적/무한대로 추정된 시점;

CL, 명백한 전체 혈청 클리어런스; V_z , 최종 단계 동안 분포의 명백한 용적.

[1216]

[1217]

표 11. 혈청 농도 측정을 위해 사용한 ECLA 방법으로 용량 용액을 측정하였다. 분석 범위 내에 있도록 용량 용액을 희석하였다. 모든 wt rh릴랙신 용량 용액은 이론(PDT)과 다른 구체화된 30% 차이 내에 있다. 이하의 표 3은 이 연구를 위한 용량 용액 분석의 결과를 요약한다.

표 11

시험 항목의 투약 용액 분석

투약 용액 분석	공칭농도 (ng/mL)	희석인자	농도 (ng/mL)	PDT%
조제물 완충제 중에서 용량 전 0.5mg/mL(DSA1)	250000	10000	208830	-16
혈청 중에서 용량 전 0.5 mg/mL(DSA2)	250000	10000	225898	-10

[1218]

[1219]

실시예 42

[1220]

이 실시예는 SD 래트에서 1회 피하 주사 후 20kDa 폐결화된 릴랙신 화합물의 약동학적 특성을 평가한다.

[1221]

SD 래트를 대략 7-8주령(연구 시작 시 대략 280g)에 찰스리버랩로라토리즈(CRL)로부터 받았다. CRL에서 경정맥

에 카테터를 꽂은 동물을 받았다. 그 다음에 연구 전 3일 동안 순응시켰다. 동물에 제1일에 1회 피하 주사를 투여하였고, PK 샘플을 그 다음 82시간에 거쳐서 수집하였다. 다음의 샘플링 스케줄에 따라 혈청 농도의 분석을 위해 PEG-틸렉신으로 처리한 동물로부터 혈액 샘플을 취하였다(샘플링 시간은 유사하다): 제1일: 용량-전, 1, 3, 5, 10, 25, 34, 48, 58, 72 및 82 시간 용량 후.

[1222] Ambrx에서 개발한 분석을 기반으로 브릿징 ECLA를 사용하여 화합물 농도를 측정하였다. 대응하는 용량 화합물로부터 만들어진 표준 곡선을 사용하여 농도를 계산하였고, 엑셀 스프레드시트 형식으로 기록하였다(부록 참조). 모델링 프로그램 WinNonlin(Pharsight, version 5.1)을 사용하여 약동학적 변수를 추정하였다. 선형-업/로그-다운 사다리꼴 통합에 의해 개개 동물 데이터에 대한 비구획 분석을 사용하였고, 농도 데이터를 균일하게 칭량하였다. 비구획 분석을 2개의 구획, 1차 제거 모델 및 Gauss-Newton(Levenberg-Hartley) 모델 적합화 식을 사용하여 수행하였다.

[1223] 표 12는 시간에 대한 그룹 평균 PEG-틸렉신 혈청 농도 값을 나타낸다.

표 12

그룹	시험 항목	용량 (mg/kg)	경로	성별	시간 (시간)	평균 농도 (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	PD	BQL	NE	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	1	2912.8	203.7	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	3	1310.8	115.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	5	700.7	68.3	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	10	241.6	27.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	25	61.2	5.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	34	27.0	2.6	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	48	13.7	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	58	8.0	2.2	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	72	4.3	1.4	4
1	20KPEG-AQ1	0.25	IV	수컷	82	2.2	0.6	4
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	1	16.3	4.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	3	75.8	20.2	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	5	96.3	26.7	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	10	135.1	30.1	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	25	257.4	48.5	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	34	184.9	26.8	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수컷	48	159.9	31.7	5

[1224]

2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수 컷	58	86.5	24.6	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수 컷	72	20.3	1.4	5
2	20KPEG-AQ1	0.5	SC	수 컷	82	11.8	1.1	5
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	PD	BQL	NE	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	1	12.8	1.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	3	45.3	6.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	5	62.2	8.6	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	10	90.1	10.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	25	127.4	20.2	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	34	83.2	13.8	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	48	32.6	2.6	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	58	16.3	0.3	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	72	4.9	0.9	3
3	20KPEG-AQ1	0.25	SC	수 컷	82	2.7	0.4	3
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	1	5.7	1.5	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	3	26.4	6.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	5	37.2	8.6	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	10	50.1	6.1	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	25	75.9	8.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	34	46.9	6.7	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	48	20.8	8.2	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	58	8.4	2.4	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	72	2.3	0.8	5
4	20KPEG-AQ1	0.125	SC	수 컷	82	1.3	0.4	5

NE, 평가하지 않음; BQL, 정량화할 수 있는 한계 미만; PD, 사전-용량

[1225]

[1226]

실시예 43

[1227]

이 실시예는 암컷 롱-이반스 래트에서 야생형 릴렉신 및 PEG-릴렉신 변이체의 약물학적으로 활성인 용량 및 전신 노출을 평가하였다.

[1228]

이들 1세대 연구의 목적은 PEG-릴렉신 변이체의 생체내 활성을 평가하고 약물학적으로 활성인 용량을 정하는 것이다. 이들 목적을 수행하기 위하여, 릴렉신에 반응성인 물 흡수, 소변 배출량을 포함하는 생리적으로 적절한 종말점을 암컷 롱-이반스 래트에서 평가하였고, 소변 및 혈액 임상 화학을 선택한다. 후보 종말점의 확인을 가능하게 하기 위하여, 야생형 릴렉신을 우선 시험하였고(1상), 용량을 계산하여 0.3X, 1X 및 10X의 시험관내 표적 억제의 혈장 농도를 달성하였다. 볼루스 정맥내(IV) 용량 다음에 6시간 연속적 주입으로 표적 용량을 전달하였다. 0.3X, 1X 및 10X 릴렉신의 용량은 비히클과 비교하여 물 흡수에서 각각 95%, 68% 및 32%의 증가를 유발하였다. 기준에서 2시간 및 6시간에 평균 혈장 나트륨 농도의 변화는 비히클(OX)에 대해 -9.5 및 1.2 mEq/; 0.3X에서 -5.8 및 -9.0 mEq/; 1X에서 1.0 및 -1.5 mEq/ℓ; 10X에서 -4.7 및 -1.4 mEq/ℓ 이었다. 기준으로부터 2 및 6시간에 혈장 삼투압의 변화는 비히클(OX)에 대해 -20.7 및 1.0mosmol/kg 물; 0.3X에서 -11.0 및 -19.1mosmol/kg 물; 1X에 대해 0.3 및 -4.4mosmol/kg 물; 및 10X에 대해 -10.3 및 -3.8mosmol/kg이었다.

[1229]

PEG-릴렉신(2상)을 체중 그램 당 1μℓ의 볼루스 용적으로 투여하였고, 혈액을 용량 후 2 및 6시간에 수집하였으

며, 용량 후 6시간 기간 동안 소변을 수집하였다. 0.1X, 0.3X 및 1X에서 PEG-릴렉신으로 처리는 비히클 그룹과 비교하여 물 흡수에서 각각 93%, 128% 및 105% 증가를 초래하였다. 기준으로부터 2 및 6시간에 평균 혈장 나트륨 농도의 변화는 비히클(OX)에 대해 2.5 및 1.5 mEq/l; 0.1X에서 -1.5 및 -4.8 mEq/l; 0.3X에서 -4.0 및 -2.9 mEq/l; 1X에서 -2.3 및 -4.0 mEq/l 이었다. 기준으로부터 2 및 6시간에 평균 삼투압의 변화는 비히클(OX)에 대해 4.5 및 2.1mosmol/kg 물; 0.1X에서 -5.1 및 -11.0mosmol/kg 물; 0.3X에 대해 -8.2 및 -5.0mosmol/kg 물; 및 1X에 대해 -5.6 및 -9.5mosmol/kg 물이었다. 야생형 또는 PEG-릴렉신으로 처리 후 소변 임상 화학 값에서 명백한 변화는 없었다. 이들 데이터는 생체내 활성을 확립하였고, 이후에 PEG-릴렉신에 의한 생체내 질병 모델 연구를 위해 합리적인 용량 선택을 가능하게 한다.

표 13

동물 그룹 설계

그룹	시험항목	동물 ID	혈장농도 (표적에 따른 증가 배수)	IV 볼루스 용량 농도 (mg/mL)	IV 인퓨전 농도 (mg/mL) ^c	그룹 당 동물 수
1상 야생형 릴렉신 용량 ^a						
1	야생형 릴렉신	1F001- 1F004	1X	0.003	0.08	4
2	야생형 릴렉신	2F001- 2F004	10X	0.03	0.8	4
3 ^b	야생형 릴렉신	3F001- 3F004	비히클	비히클	비히클	4
4 ^b	야생형 릴렉신	4F001- 4F004	0.3X	0.001	0.026	4

^a 그룹 1 및 2(1x 및 10x)를 우선 평가하였으며, 음용수 소비, 헤마토크리트 및 소변 배출량에서 시험 항목-관련 효과가 명백하였기 때문에, 그룹 3 및 4에서 각각 래트의 제2 설정을 위한 용량을 비히클 및 0.3x로 수정하였다. 그룹 1과 2 사이에 적어도 36시간의 세척 기간이 있었다. 적어도 36시간의 세척 기간은 또한 그룹 3과 그룹 4 사이에도 있었다.

^b 그룹 1의 래터에 제2 무작위화를 실시하고, 세척 기간 후 그룹 2에 배정하였다. 그룹 3의 래터에 제2 무작위화를 실시하고 그룹 4에 배정하였다. 동물 수 001-004는 그룹 1 및 그룹 3에서와 같이 그룹 2 및 4에서 동일하게 남았지만; 튜브 라벨링 및 샘플 확인 명확성을 가능하게 하도록 그룹 2 및 그룹 4의 그룹 수 지정을 사용하였다.

^c 야생형 릴렉신을 100 μ l의 볼루스 용적으로 정맥내에 주사한 다음 50 μ l/시간의 인퓨전 속도로 주사하였다.

[1230]

표 14

그룹	시험항목	동물 ID	혈장 농도 (표적에 걸쳐 폴딩 증가)	IV 볼루스 투약 농도 (mg/mL) ^a	그룹 당 동물 수
2상 PEG-틸락신 투약					
5	PEG-틸락신	5F001-5F004	비히클	NA	4
6	PEG-틸락신	6F001-6F004	0.3X	0.03	4
7	PEG-틸락신	7F001-7F004	0.1X	0.01	4
8	PEG-틸락신	8F001-8F004	1.0X	0.1	4

^a 1 µL/g 체중의 용적에서 볼루스 용량을 투여함

[1231]

[1232]

1상 야생형 틸락신

[1233]

공급업자에 의해 수술로 위치시킨 양쪽 경정맥 카테터를 지니는 12 내지 14 주령의 암컷 롱-이반스 래트를 찰스 리버레오래토리즈로부터 얻었다. 4마리 래트의 2세트를 사용하였다. 야생형 틸락신의 2회 용량을 평가하기 위해 각 세트를 사용하였다. 그룹 1과 그룹 2 사이에 36시간 이상의 세척 기간이 있었고, 그룹 1 및 3으로부터의 래트로서 그룹 3 및 그룹 4를 그룹 2 및 그룹 4에서 각각 재사용하였다. 래트는 먹이 및 물에 자유롭게 접근하였으며, IV 볼루스 용량 및 인퓨전 용량의 개시 전 밤에 및 개시 6시간 후 동안 Culex ABS 대사 케이징 시스템 (Culex Automated Blood Sampler, Bioanalytical System Inc)에 가두었다.

[1234]

1상 야생형 틸락신 용량 투여

[1235]

1상에서 각 래트에게 1회 IV 볼루스 및 6시간 IV 인퓨전이 주어졌다. 외과적으로 이식된 경정맥 카테터를 통해 IV 볼루스 주사 후 외과적으로 이식된 경정맥 카테터를 통해 IV 인퓨전이 주어진다. 래트의 제1 설정에서 그룹 1과 2 사이에 적어도 36시간 및 래트의 제2 설정에서 그룹 3 및 그룹 4를 세척시켰다.

[1236]

2상 PEG-틸락신

[1237]

공급업자에 의해 수술로 위치시킨 양쪽 경정맥 카테터를 지니는 12 내지 14 주령의 암컷 롱-이반스 래트를 찰스 리버레오래토리즈로부터 얻었다. 4마리 래트의 4세트를 사용하였고, PEG-틸락신의 1회 용량을 평가하기 위해 각 세트를 사용하였다. PEG-틸락신을 받은 래트는 폐길화된 화합물의 장시간 혈장 노출 때문에 세척 기간 후 재사용하지 않았다. 래트는 먹이 및 물에 자유롭게 접근하였으며, Culex ABS 대사 케이징에 가두었다.

[1238]

2상 PEG-틸락신 용량 투여

[1239]

2상에서, 래트는 수술로 이식된 경정맥 카테터를 통해 1회 IV 주사를 받았다.

[1240]

모든 용량 용액에 대해 이런 해동 및 혼합 설명서에 따라 모든 볼루스 및 IV 용량 용액을 조제하였다:

[1241]

각각의 용량 조제물에 대해 냉동 샘플 보틀을 4°C에서 3 내지 4시간 동안 해동시키고, 해동 과정을 매 시간마다 조사하였다. 일단 해동이 완료되면, 조제물을 거품을 만들지 않도록 부드럽게 휘저으면서 혼합하였다. 조심스럽게 살피면서 정맥내 용량 바로 전 각 조제물을 철저히 혼합하였다. 용량을 위해 사용할 때까지 각 용량 조제물을 4°C에서 유지하였다.

[1242] 제조 전 즉시 용량을 제조하였고, 각 그룹은 다음의 용량 농도를 받았다:

1상 (그룹 1-4)	
그룹 1: (1X)	IV 볼루스 0.003 mg/mL IV 인퓨전 0.08 mg/mL
그룹 2: (10X)	IV 볼루스 0.03 mg/mL IV 인퓨전 0.8 mg/mL
그룹 3: (비히클)	볼루스 및 인퓨전
그룹 4: (0.3X)	IV 볼루스 0.001 mg/mL IV 인퓨전 0.026 mg/mL
2상 (그룹 5-8)	
그룹 5: 비히클	IV 볼루스 NA
그룹 6: (0.3X)	IV 볼루스 0.03 mg/mL
그룹 7: (0.1X)	IV 볼루스 0.01 mg/mL
그룹 8: (1.0X)	IV 볼루스 0.1 mg/mL

[1243]

[1244] 이 연구에 사용한 동물을 체중 측정, 경정맥 카테터 효능 및 작용으로부터 허용가능한 발견점을 기준으로 선택하였다. 연구 시작 전 또는 용량 개시 후 혈액 수집 기간 동안 용량 또는 혈액 수집에 부적합한 카테터를 지니는 것으로 확인된 동물을 연구에서 제외시켰고, 적합한 카테터를 지니는 래트로 대체하였다. 카테터를 지니는 래트의 대체 및 화합물 용량은 용량 스케줄, 채택 가능성 및 공급업자로부터 래트의 수용에 대해 가능한 가장 빠른 시간에 일어났다.

[1245] 1상: 연구 전 체중에 따라 동물을 무작위화하였고, 그룹 1에 배정하였다. 용량 완료 후, 그룹 1의 래트에 세척 기간 후 제2 무작위화를 실시하였고, 그룹 2로 재배정하였다. 용량의 완료 후, 그룹 3의 래트에 세척 기간 후 제2 무작위화를 실시하였고, 그룹 4로 재배정하였다.

[1246] 2상: 연구 전 체중에 따라 동물을 무작위화하였고, 그룹 5 내지 그룹 8에 배정하였다.

[1247] 용량의 개시 후 매일 대략 30분 및 1, 2, 4 및 6 시간. 신체적 및 행동적 변화의 시각적 조사를 수행하였고, 동물을 자세 변화, 털-코팅, 활동, 배설물 등에 대해 시험하였다. 일상적인 체중을 취하였고, 투약 전 기록하였다.

[1248] 혈액 및 소변 샘플, 수집, 조작 및 분석

[1249] 1상 연구 프로토콜

[1250] 기준 소변 수집을 용량 투여 전 밤에 시작하였고 15 내지 18시간 의 기간 동안 지속하였으며, 냉각(웬트 아이스) 바이알 내로 수집하였다. 기준 샘플 얼음(~400 μ l 전혈)을 기준 소변 수집의 마지막에 수집하였다. 실험의 마지막날에, 래트에게 시험 항목의 IV 볼루스 주사를 제공한 다음 야생형 릴렉신을 지니는 연속적 인퓨전을 제공하였다. 50 μ l/시간의 용적에서 좌경동맥 카테터를 통해 6시간 동안 주사기 펌프(Harvard 11 플러스)에 의해 연속적 인퓨전 속도로 전달된다. 2개의 추가적인 혈액 샘플(~400 μ l 각각 전혈)을 릴렉신 인퓨전 후 2 및 6시간에 수집하였다. Culex ABS 프로그램된 샘플링 방법을 사용하여 K3EDTA 항응고제를 함유하는 샘플 튜브 내로 오른쪽 경정맥 카테터를 통해 모든 혈액 샘플을 수집하였고, 샘플 처리까지 냉장 환경에서 샘플을 보관하였다. 릴렉신 인퓨전 기간 동안 지속을 통해 냉각 바이알 내로 소변을 지속적으로 수집하였다. 각 수집물로부터 전체 소변 용적을 기록하였고, 대략 -80° 를 유지하도록 설정한 Seventh Wave Labs 냉동기에 각 소변 샘플의 2-5ml를 저장하였다. 보틀 + 물의 인퓨전 전 및 인퓨전 후를 비교함으로써 6-시간 인퓨전 기간 동안 물 흡수를 기록하였다. 연속적 인퓨전의 6시간 후 인퓨전 펌프를 중단하고, 래트는 적어도 36시간의 세척 기간을 겪은 후 제2 용량

평가가 실시되었다.

- [1251] 연속적 IV 인퓨전은 표적화된, 안정한 혈장 약물 농도를 유지하는데 필요하다.
- [1252] 2상 연구 프로토콜
- [1253] 15 내지 18시간의 기간 동안 용량 투여 전 밤에 기준 소변 수집을 시작하였고, 샘플을 냉장 바이알 내로 수집하였다. 기준 혈액 샘플(~400 μ l 전혈)을 기준 소변 수집 기간의 마지막에 수집하였다. 실험일에, 10ml/kg/일(1회 용량)을 초과하지 않는 용적으로 정맥내로 PEG-틸렉신의 1회 용량을 래트에 투여하였다. 2개의 추가적인 혈액 샘플(~400 μ l 전혈)을 틸렉신 투여 후 2 및 6시간에 수집하였다. Culex ABS 프로그램된 샘플링 방법을 사용하여 K3EDTA 항응고제를 함유하는 샘플 튜브 내로 오른쪽 경정맥 카테터를 통해 모든 혈액 샘플을 수집하였고, 처리까지 냉장 환경에 저장시켰다. 샘플링 동안 냉장 바이알 내로 PEG-틸렉신의 투여 후 0 내지 6시간에 소변 샘플을 연속적으로 수집하였다. 각 수집물로부터 전체 소변 용적을 기록하였고, 2-5ml의 각 소변 샘플을 대략 -80℃를 유지하도록 설정한 Seventh Wave Labs 냉동기에 저장시켰다. 용량 후 6시간에 래트를 안락사시켰다. 시작 시 및 약물 인퓨전 기간의 마지막에 보틀+물의 중량과 비교함으로써 6-시간 인퓨전 기간 동안 물 흡수를 기록하였다.
- [1254] 병리학
- [1255] 이 실시예에서 이미 기재한 것과 같이 소변 샘플을 수집하였다. 냉장 소변 샘플의 2 내지 5ml를 드라이아이스 상에서 냉동시키고, 소변 크레아티닌의 분석을 위해 AVL에 대해 및 크레아티닌 클리어런스의 결정을 위해 BUN에 대해 드라이아이스 상에 올릴 때까지 대략 -80℃를 유지하도록 설정된 냉동기에 저장시켰다.
- [1256] 항응고제로서 K₃EDTA를 사용하는 Culex ABS를 사용하여 혈액 샘플을 수집하였다. 전혈 샘플의 15마이크로리터를 미처리 모세관 내에 채웠고, 한쪽 단부를 점토로 밀봉하였으며, 헤마토크리트(hematocrit) 원심분리기(International Equipment Company, IEC MB 원심분리기) 내에서 5분 동안 원심분리시켰다. 제조업자에 의해 제공된 마이크로헤마토크리트 판독 장치를 사용하여 헤마토크리트 결과를 얻었다.
- [1257] 이하에 열거하는 수집 스케줄 및 과정에 따라 야생형 및 PEG-틸렉신의 전신 노출의 잠재적 결정을 위해 혈액을 수집하였다. 3개의 수집 간격이 있었다. 수집 시점은 1상 및 2상 래트에 대해 용량-후 0, 2 및 6시간이었다. 1상: 시점 당 8마리 동물. 2상: 시점 당 16마리 동물. 수집 용적은 거의 400 마이크로리터의 전혈이었다. 그룹 1 내지 8의 모든 동물을 3개의 시점에 출혈시켰다: 기준(용량 전 t=0) 및 각각 야생형 틸렉신 IV 용량을 위한 인퓨전의 개시 후 및 PEG-틸렉신 용량 그룹에 대해 IV 용량 후 2 및 6 시간. IV 인퓨전 용량의 개시 시간 및 각 출혈의 실제 시간을 각 동물에 대한 미가공 데이터에 기록하였다. 스폰서 결정마다, 연구 수행 동안 전신 노출 결정을 위한 Ambrx에 혈액을 보내지 않았다. 대략 -80℃를 유지하도록 설정한 Seventh Wave Labs 냉동기에서 냉동시킨 샘플을 저장하였고, 스폰서에 되돌릴 것이다.
- [1258] I상 야생형 틸렉신 결과
- [1259] 비히클(OX) 처리된 래트에서 6시간 인퓨전 동안 평균 물 흡수는 체중의 100그램 당 1.8ml이었고, 이는 각각 0.3X, 1X 및 10X 야생형 틸렉신 처리된 래트에서 체중의 100 그램 당 3.6, 3.1 및 2.4ml로 증가되었다. 이들은 각각 0.3X, 1X 및 10X 용량 그룹에 대해 비히클 이상으로 95%, 68%, 32% 증가가 있다.
- [1260] 기준, 용량의 개시 후 2 및 6시간에 평균 헤마토크리트는 각각 비히클 처리된 래트에서 35.1%, 35.0% 및 34.3%; 0.3X 그룹에서, 33.1%, 33.7% 및 32.3%; 1X 그룹에서 31.4%, 32.0% 및 33.7%; 10X 그룹에서 29.7%, 31.9% 및 30.4%이었다.
- [1261] 6시간 인퓨전 동안 평균 소변 배출량은 비히클(OX), 0.3X, 1X 및 10X 그룹 각각에 대해 체중의 100 그램 당 1.8, 1.5, 1.2 및 1.2ml이었다.
- [1262] 기준에서, 용량 개시 후 2 및 6시간에 평균 혈장 나트륨 농도는 비히클(OX) 그룹에서 139.3, 129.8, 140.5 mEq/l; 0.3X 그룹에서 141.8, 136.0 및 132.8 mEq/l; 1X 그룹에서 138.8, 139.8 및 137.3 mEq/l; 10X 그룹에서 137.0, 132.3 및 135.6 mEq/l 이었다. 2 및 6시간에 기준으로부터 변화는 비히클(OX)에 대해 -9.5 및 1.2 mEq/l; 0.3X에서 -5.8 및 -9.5 mEq/l; 1X에서 1.0 및 -1.5 mEq/l; 10X에서 -4.7 및 -1.4 mEq/l 이었다.
- [1263] 다음 식을 사용하여 혈장 삼투압을 계산하였다: 삼투압(OSM) = (2*na) + (Glu/18) + (BUN/2.8). 기준, 개시 후 2 및 6시간에 평균 혈장 삼투압은 0.3X 그룹에서 277.3mosmol/kg 물; 1X 그룹에서 291.0, 291.3 및 286.6mosmol/kg 물; 10X 그룹에서 286.4, 276.1 및 282.6mosmol/kg 물이다. 2 및 6시간에 기준으로부터의 변화

는 비히클(OX)에 대해 -10.7 및 1.0mosmol/kg 물; 0.3X에서 =11.0 및 =19.1mosmol/kg 물; 1X에서 0.3 및 -4.4mosmol/kg 물; 10X에 대해 -10.3 및 -3.8mosmol/kg 물이었다. BUN/Cr의 소변 임상 화학 데이터, Na 배설을 이하의 표에 요약한다:

(표 3)

야생형 릴랙신의 소변 임상화학 데이터 요약 (1상 연구)

그룹	BUN /Cr	표준 편차 (SEM)	Na 배설 (mEq/시간)	sem	BUN 배설 (mg/hr)	sem	Cr Cl (mL/분 /100g)	sem
비히클(기준선)	36	12	0.083	0.010	13.5	4.4	0.85	0.04
비히클(6시간 연구)	26	3	0.079	0.018	9.4	2.3	0.60	0.15
0.3X(기준선)	66	9	0.055	0.005	17.3	3.9	0.38	0.06
0.3X(6시간 연구)	43	6	0.071	0.015	12.1	1.3	0.45	0.07
1X(기준선)	18	2	0.046	0.010	7.6	1.5	0.62	0.09
1X(6시간 연구)	19	4	0.030	0.003	4.6	1.5	0.36	0.05
10X(기준선)	21	2	0.063	0.001	8.5	1.1	0.69	0.04
10X(6시간 연구)	17	4	0.055	0.005	4.9	0.7	0.81	0.11

(표 4)

야생형 람택신의 소변 임상 화학 미가공 데이터 (1상 연구)

용량	그룹	ID	K	Na	생성	BUN	CrCl(ml/분 /100g)
비히클	3F001 T0	68232	136	119	84	1080	0.702
비히클	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0.257
비히클	3F002 T0	68234	122	130	59	980	0.692
비히클	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0.979
비히클	3F003 T0	68236	276	130	54	2950	0.694
비히클	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0.552
비히클	3F004 T0	68238	355	126	52	3000	0.522
비히클	3F004 T6	68239	176	152	71	1320	0.614
0.3X	4F001 T0	68791	272	47	22	1950	0.413
0.3X	4F001 T6	68792	174	112	25	1500	0.356
0.3X	4F002 T0	68793	274	68	42	1860	0.522
0.3X	4F002 T6	68794	180	88	42	1500	0.657
0.3X	4F003 T0	68795	230	54	25	1800	0.329
0.3X	4F003 T6	68796	180	82	60	1880	0.449
0.3X	4F004 T0	68797	225	68	23	1440	0.260
0.3X	4F004 T6	68798	365	152	68	3100	0.352
1X	1F001-T0	67488	194	<40	64	1480	0.526
1X	1F001-T6	67489	138	62	57	960	0.394
1X	1F002-T0	67487	203	74	93	1540	0.579
1X	1F002-T6	67496	296	161	88	1300	0.337
1X	1F003-T0	67490	110	85	64	820	0.495
1X	1F003-T6	67495	176	167	104	1440	0.236
1X	1F004-T0	67483	224	74	67	1420	0.882
1X	1F004-T6	67492	94	<40	24	740	0.476

[1267]

용량	그룹	ID	K	Na	생성	BUN	CrCl(ml/분 /100g)
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0.670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0.729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0.598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0.618
10X	2F003-T0	67491	254	<40	103	1650	0.696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1.129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0.809
10X	2F004-T6	67493	212	125	85	1400	0.756

단위: Na(mEq/ℓ); 크레아티닌 (mg/dℓ); BUN(mg/dℓ), 글루코스 (mg/dℓ), K(mmol/ℓ).

CrCl: ml/분/100 g BW

크레아티닌 클리어런스 (CrCl) = (U 생성 * U 용적) / (P 생성 * U 시간)

[1268]

[1269] (표 5)

야생형 릴렉신의 생리적 데이터 요약 (1상 연구)

용량	물 흡수 (0-6 시간)		기준 소변 (-16-0 시간)		소변 (0-6 시간)	
	평균	sem	평균	sem	평균	sem
비히클	1.8	0.4	4.1	0.4	1.8	0.3
0.3X	3.6	0.2	5.7	1.1	1.5	0.4
1X	3.1	0.6	3.8	0.6	1.2	0.6
10X	2.4	0.7	4.3	0.8	1.2	0.1

용량	헤마토크리트 (%)					
	0 시간		2 시간		6 시간	
	평균	sem	평균	sem	평균	sem
비히클	35.1	1.0	35.0	0.9	34.3	0.5
0.3X	29.7	1.1	31.9	1.2	30.4	0.4
1X	31.4	2.7	32.0	2.9	33.7	2.1
10X	29.7	1.1	31.9	1.2	30.4	0.4

[1270]

[1271] 2상 PEG-릴렉신 변이체 결과

[1272] 비히클(OX) 처리한 래트에서 투여 후 6시간 기간 동안 평균 물 흡수는 체중의 100 그램 당 1.5ml이었고, 이는 0.1X, 0.3X 및 1X PEG-릴렉신 변이체 처리된 래트 각각에서 체중의 100그램 당 2.9, 3.4 및 3.1ml로 증가되었다. 이들은 각각 0.1X, 0.3X 및 1X 그룹에 대해 비히클 그룹의 평균 이상으로 93%, 128% 및 105%를 나타낸다.

[1273] 투여 후 6시간 기간 동안 평균 소변 배출량은 비히클에 대해(각각 OX, 0.3X 및 1X 그룹) 체중의 100 그램 당 0.9, 0.2, 0.5 및 0.4ml이었다. 기준에서, 용량 후 2 및 6시간에 평균 혈장 나트륨 농도는 비히클(OX) 그룹에서 각각 136.3, 138.8 및 137.8 mEq/l ; 0.1X 그룹에서 각각 138.5, 137.0 및 133.7 mEq/l ; 0.3X 그룹에서 각각 137.5, 133.5 및 134.6 mEq/l ; 1X 그룹에서 각각 137.3, 135.0 및 133.3 mEq/l 이었다. 2 및 6시간에 기준으로부터 변화는 비히클에 대해 2.5 및 1.5 mEq/l ; 0.1X에서 -1.5 및 -4.8 mEq/l ; 0.3X에서 -4.0 및 -2.9 mEq/l ; 1X에서 -2.3 및 -4.0 mEq/l 이었다.

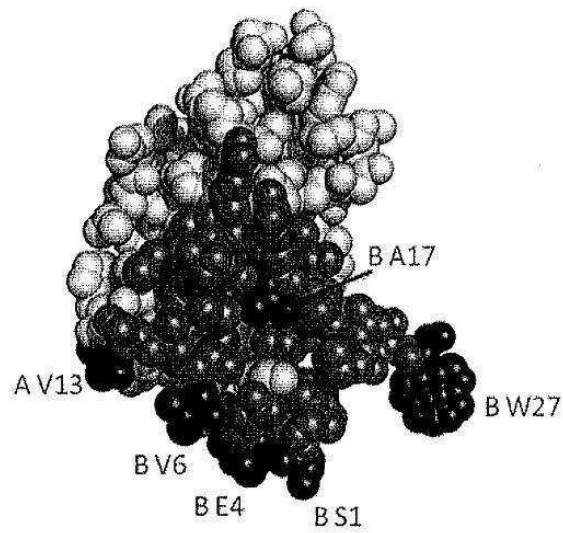
[1274] 기준에서, 용량 후 2 및 6시간에 평균 혈장 삼투압은 비히클(OX) 기에서 각각 285.4, 289.9 및 287.5mosmol/kg 물; 0.1X 기에서 각각 292.7, 287.6 및 281.7mosmol/kg 물; 0.3X 기에서 각각 287.6, 279.4 및 282.6mosmol/kg 물; 1X 기에서 각각 289.3, 283.7 및 279.4mosmol/kg 물이었다. 기준으로부터 2 및 6시간까지 변화는 비히클(OX)에 대해 4.5 및 2.1mosmol/kg 물; 0.1X에서 -5.1 및 -11.0mosmol/kg 물; 0.3X에 대해 -8.2 및 -5.0mosmol/kg 물; 1X에 대해 -5.6 및 -9.9 mosmol kg 물이었다.

[1275] 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시적 목적을 위한 것이며 이것에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에 의해 제안될 것이고, 특허청구범위의 적용 및 범주의 정신 및 범위 내에 포함된다는 것이 이해된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허출원 및/또는 문헌은 각각의 개개 간행물, 특허, 특허출원 및/또는 다른 문헌이 모든 목적을 위하여 참조로서 포함되도록 표시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위하여 그것의 전문이 참조로서 포함된다.

도면

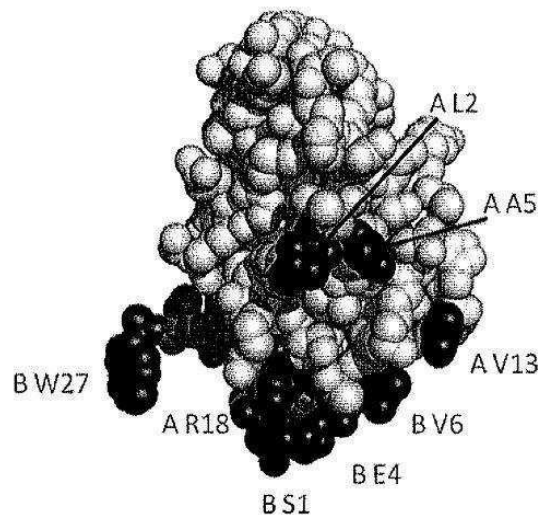
도면1

밝은 회색 = 쇠 A
 진한 회색 = 쇠 B
 검정색 = 선택 부위



도면2

밝은 회색 = 쇠 A
 진한 회색 = 쇠 B
 검정색 = 선택 부위



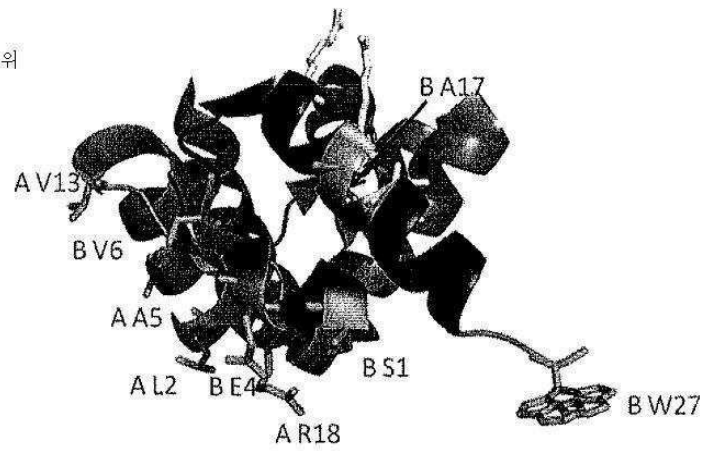
도면3

밝은 하늘색 = 쇠 A

진한 하늘색 = 쇠 B

황색 = 수용체 결합 부위

오렌지 = 선택 부위

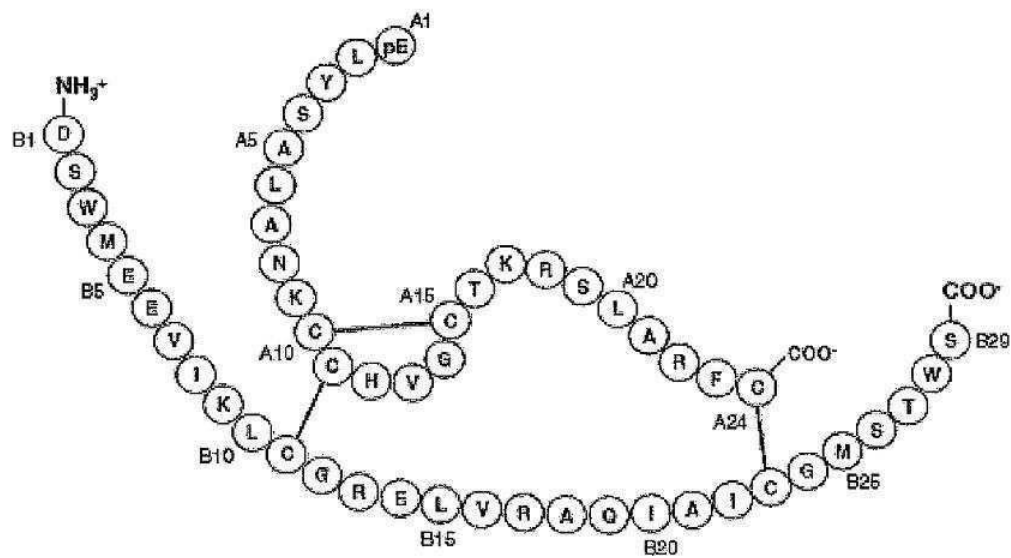


구조 내 없는

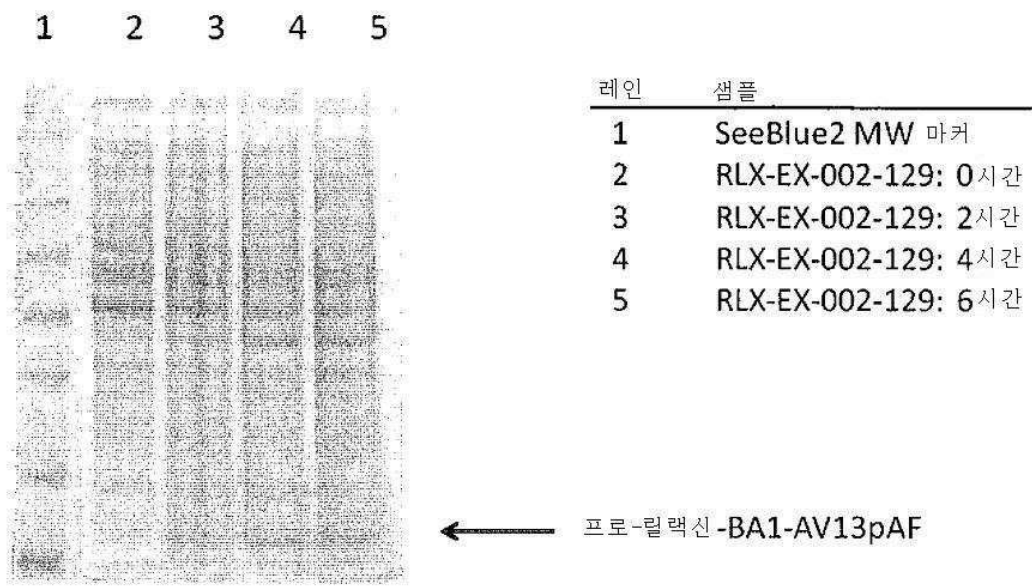
6RLX

인슐린 넘버링 부위 : A Q-3

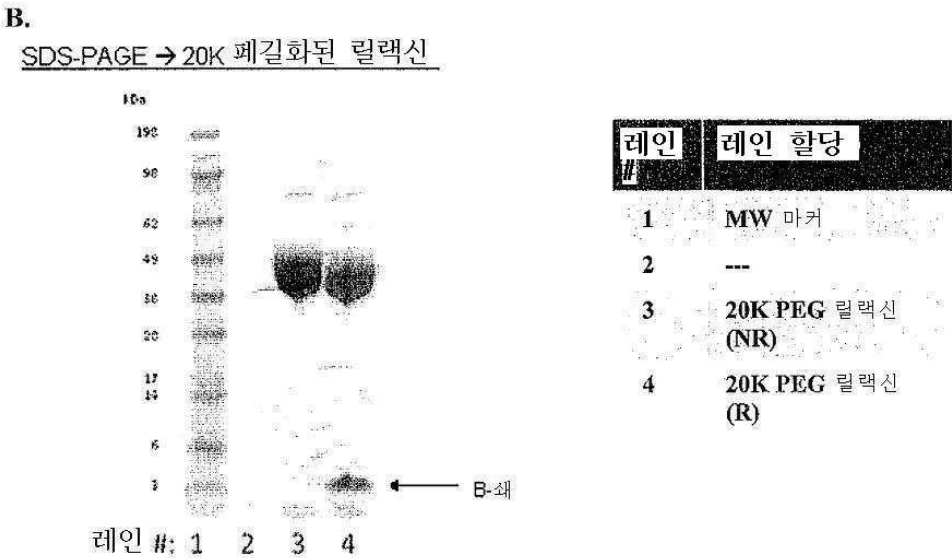
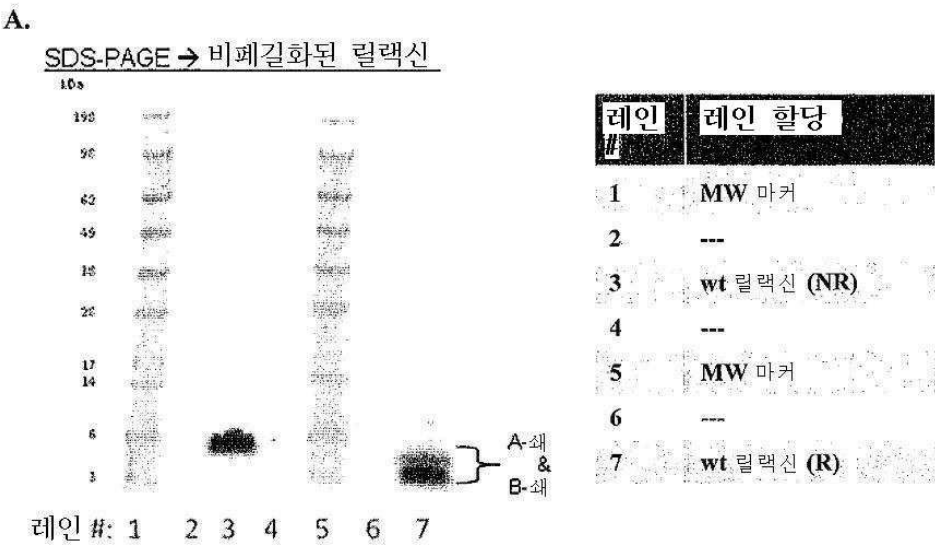
도면4



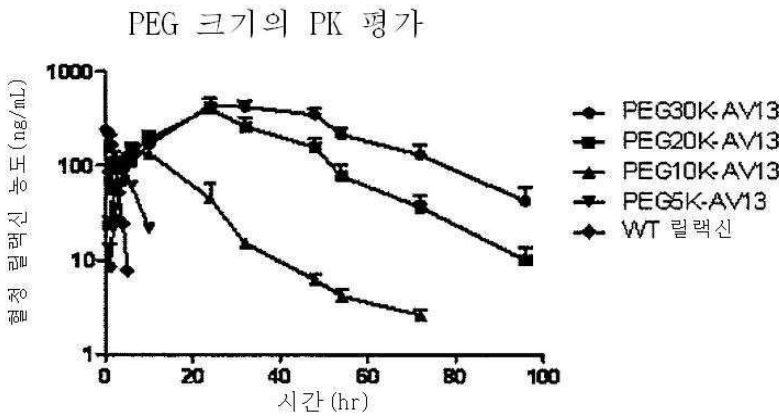
도면5



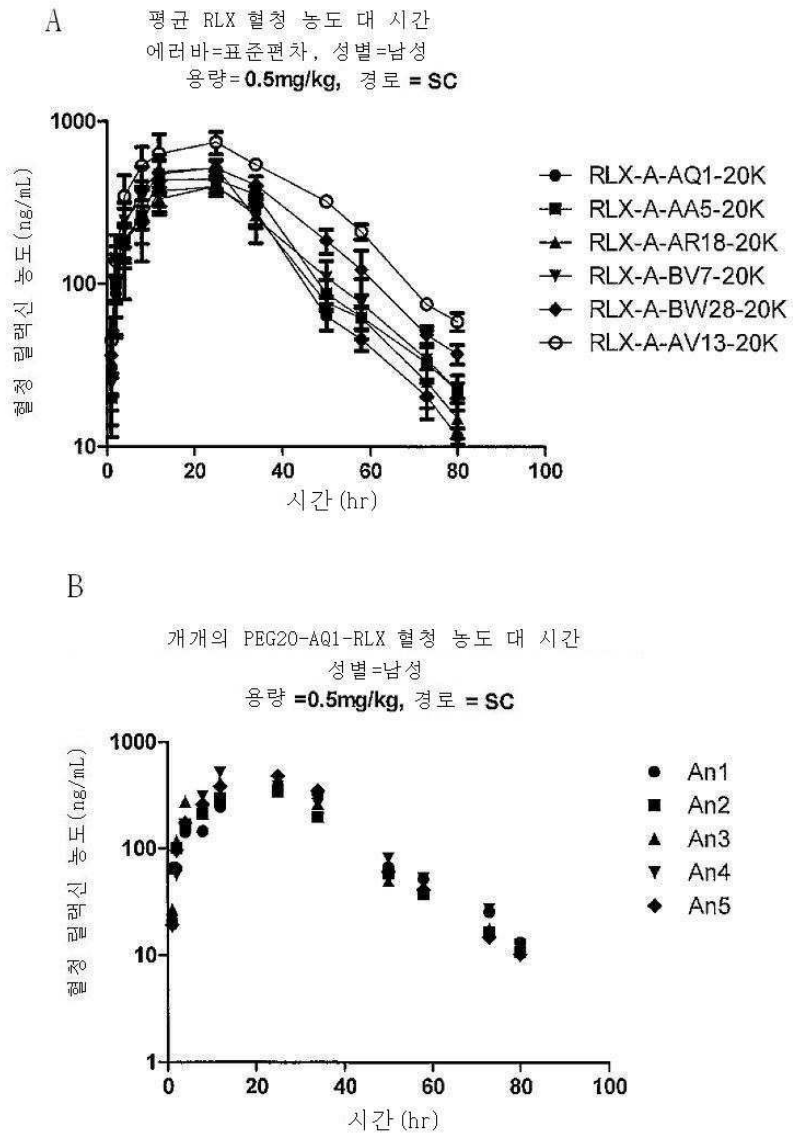
도면6



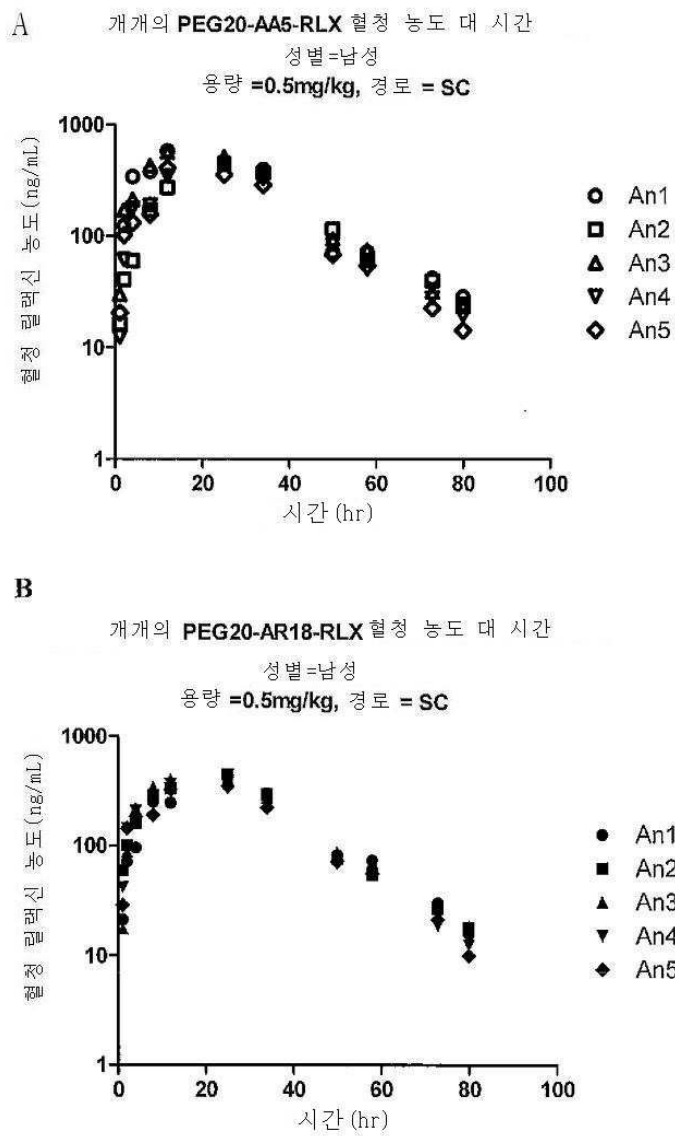
도면7



도면8

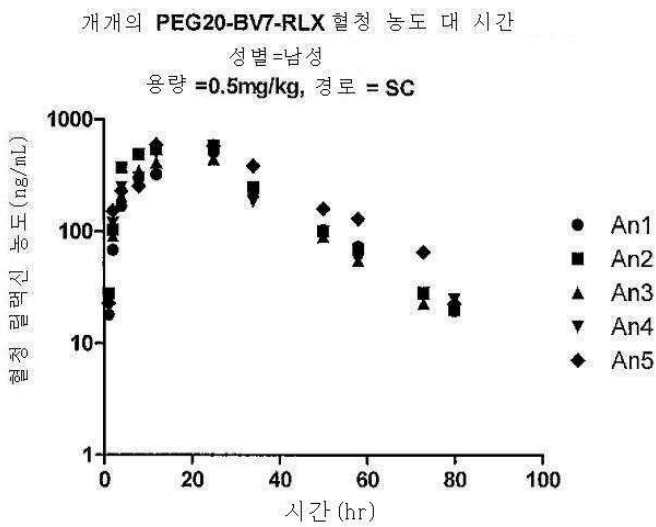


도면9

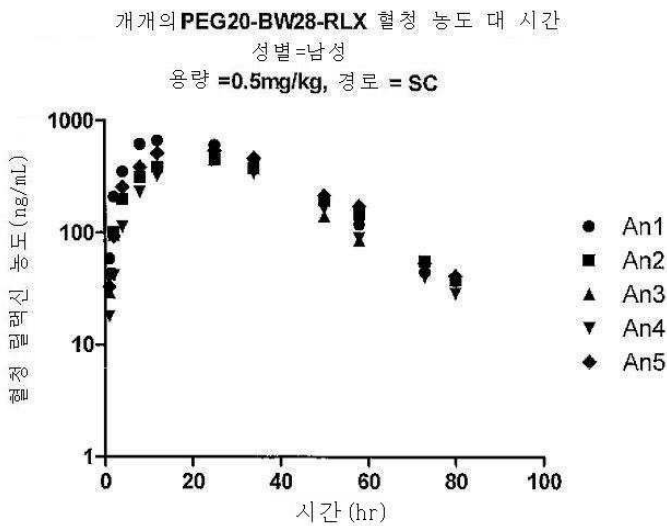


도면10

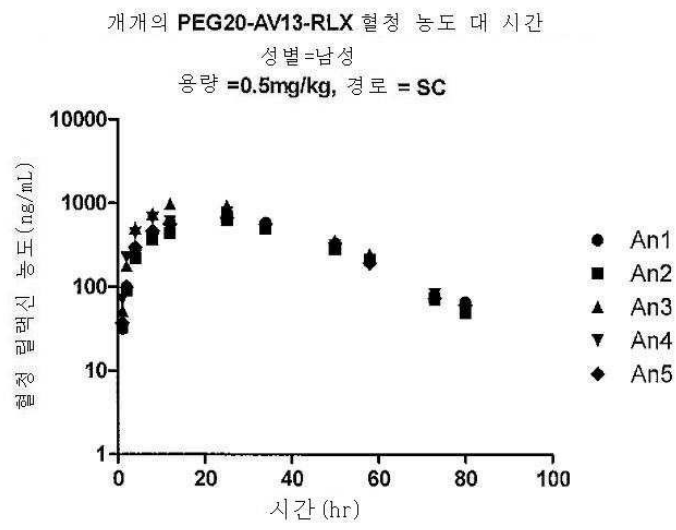
A



B

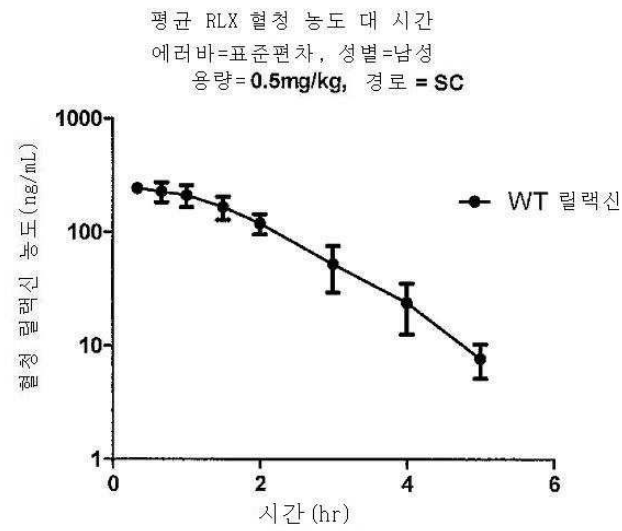


도면11

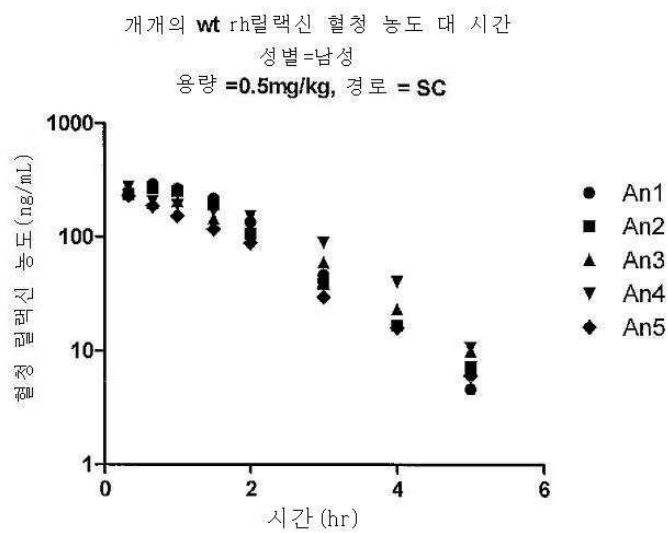


도면12

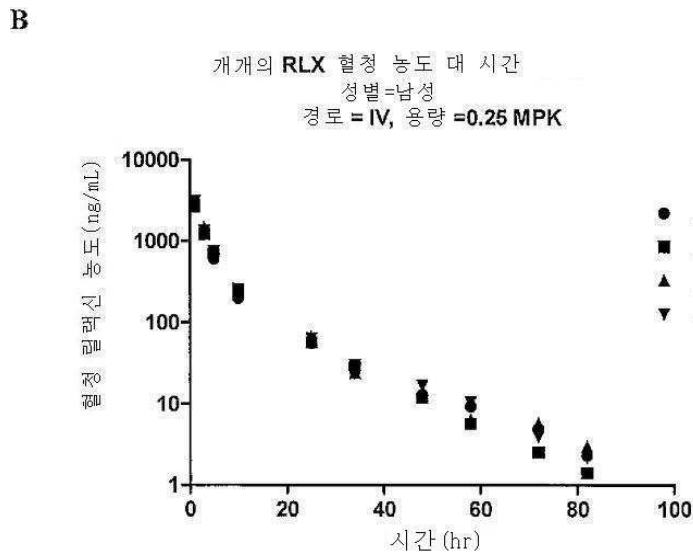
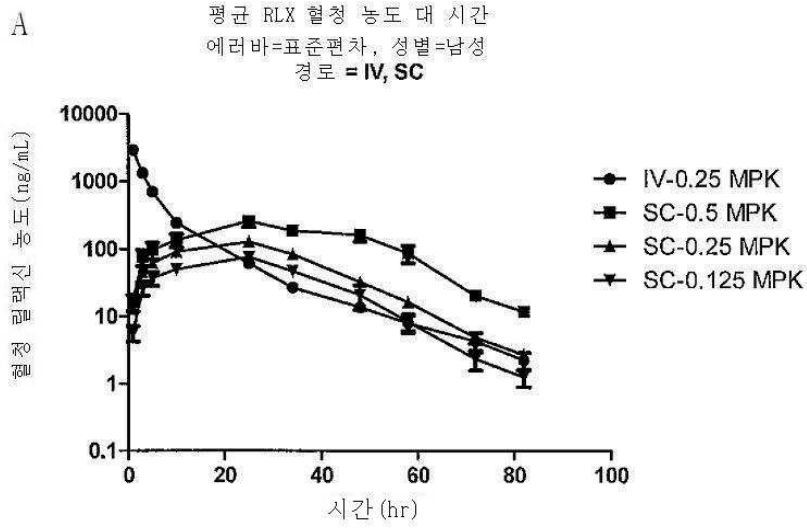
A



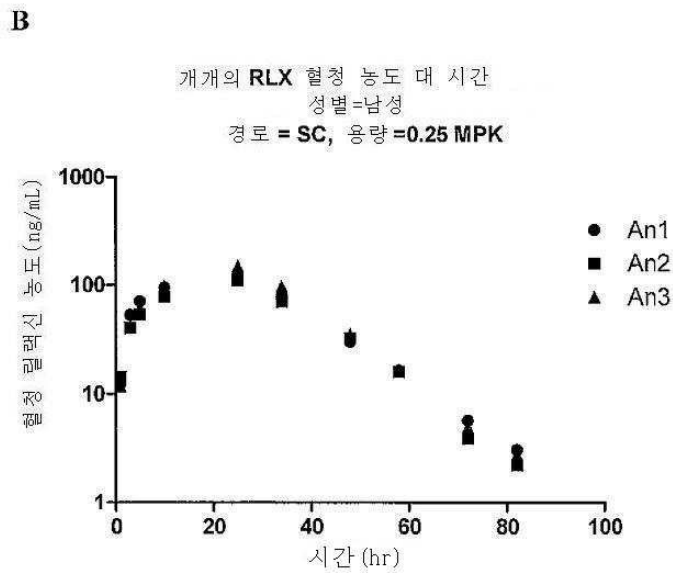
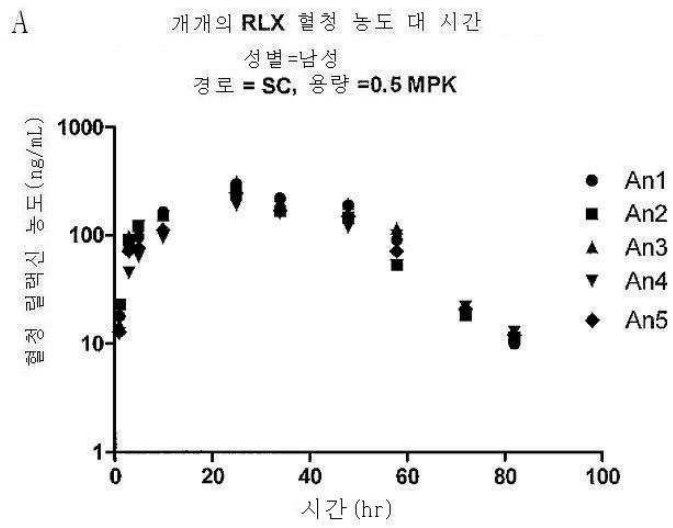
B



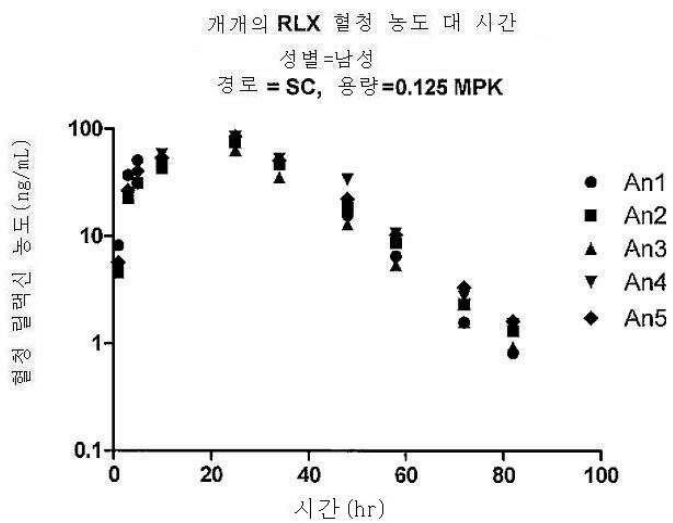
도면13



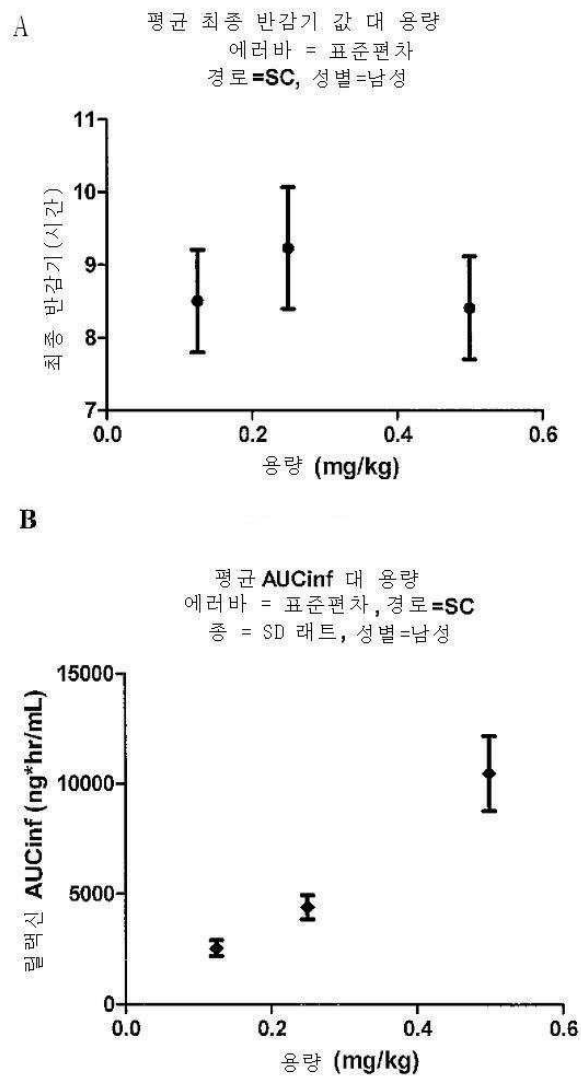
도면14



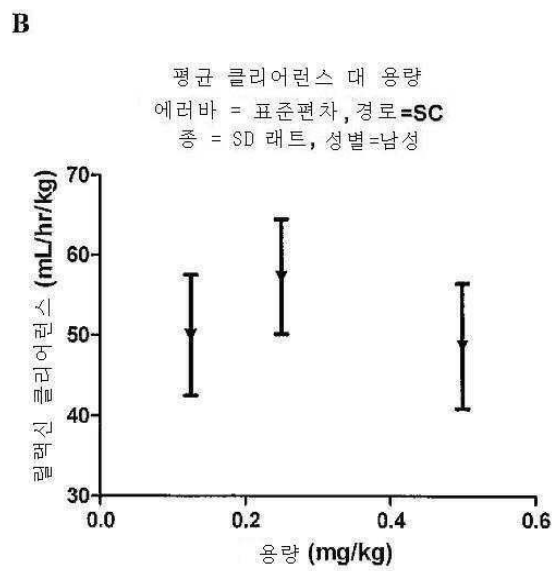
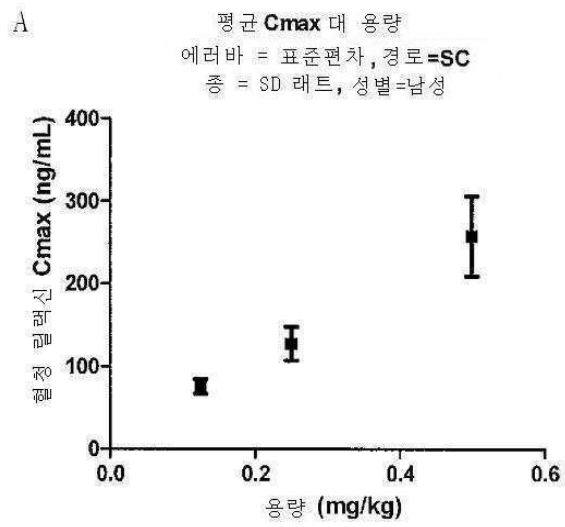
도면15



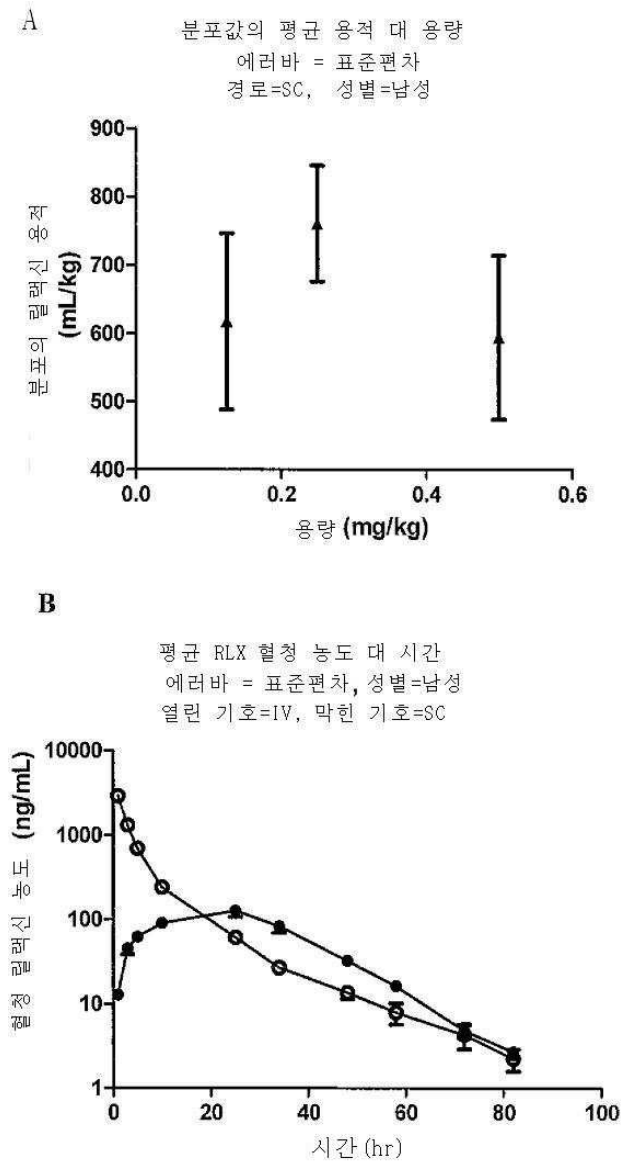
도면16



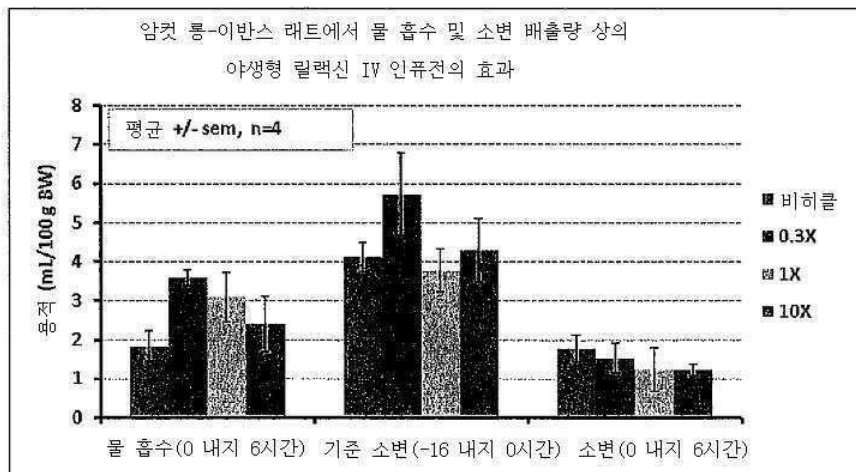
도면17



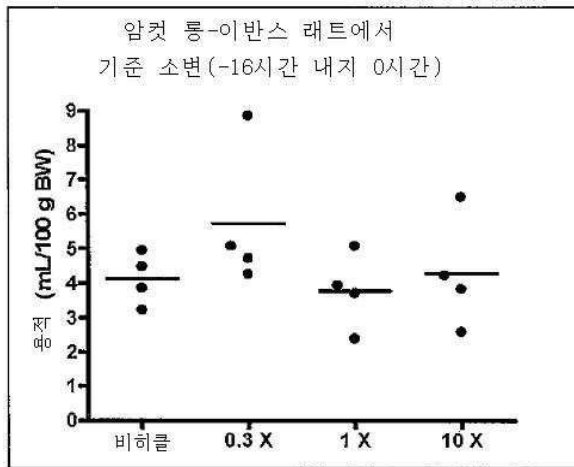
도면18



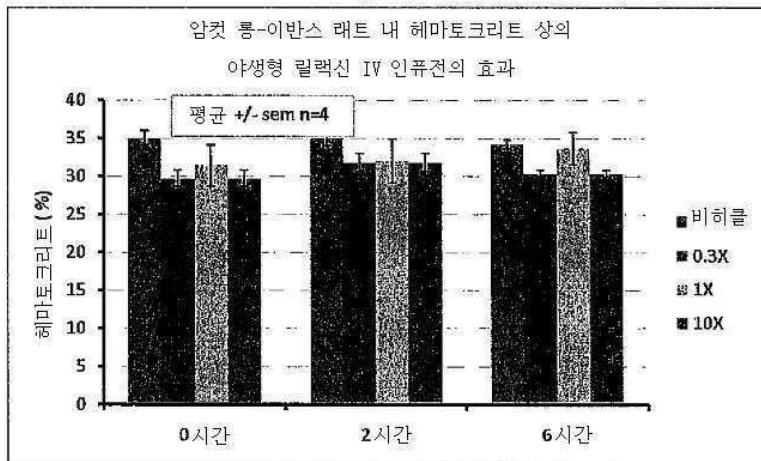
도면19a



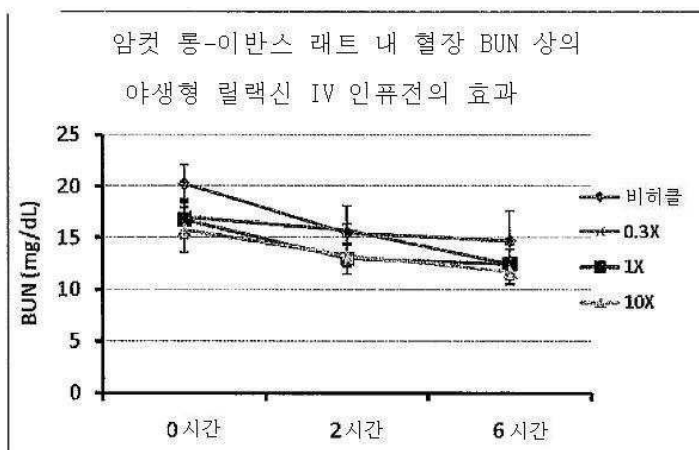
도면19b



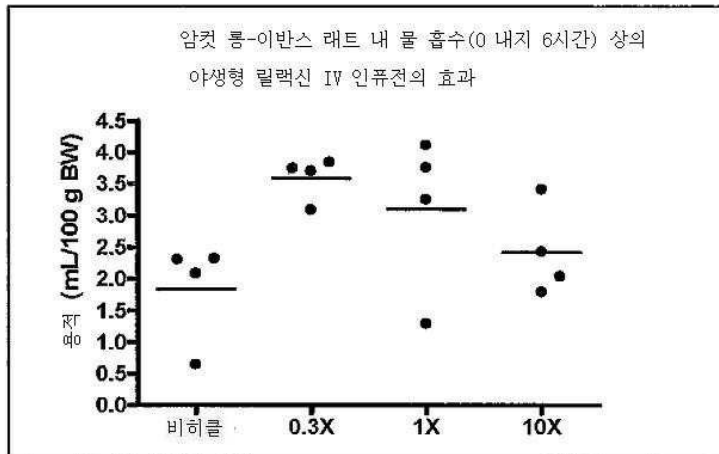
도면19c



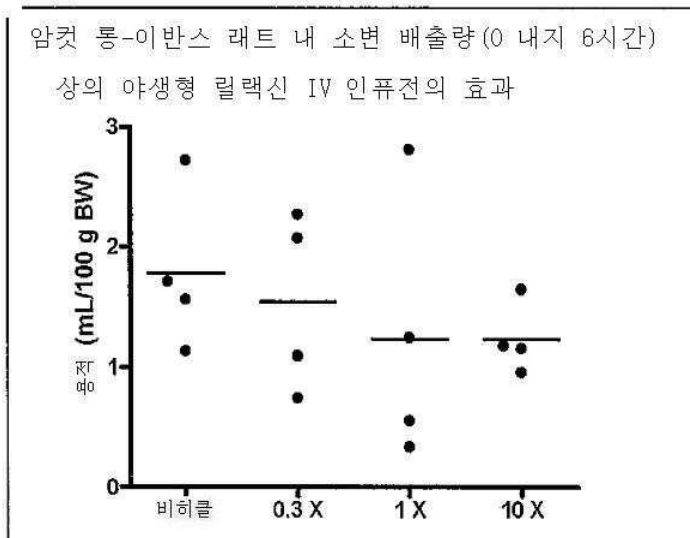
도면19d



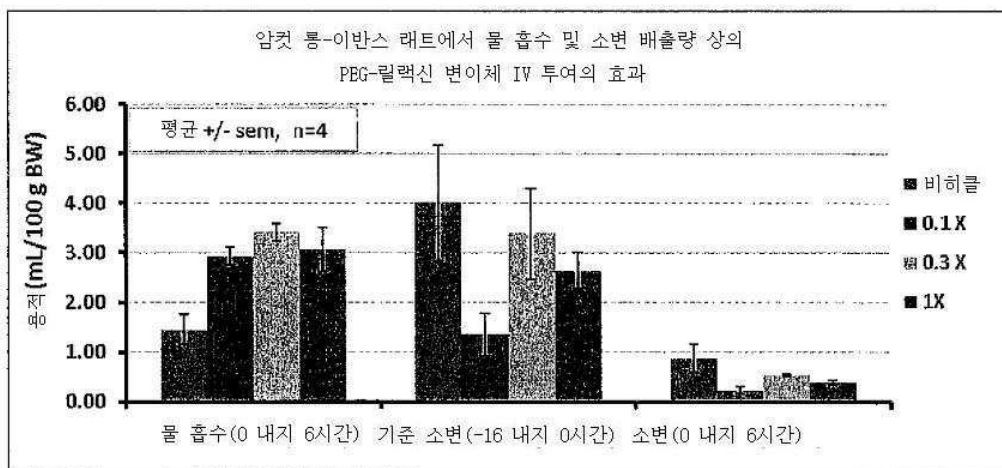
도면19e



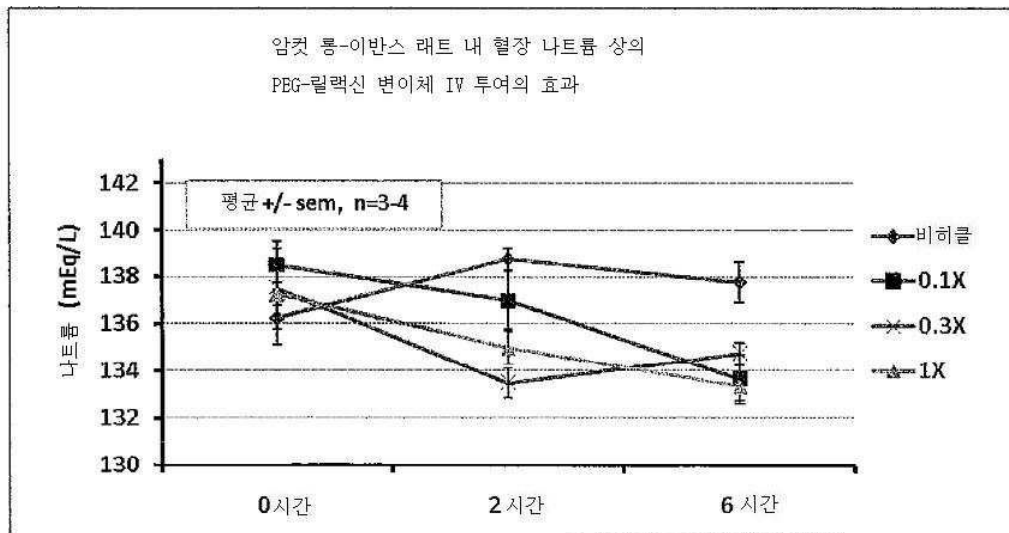
도면19f



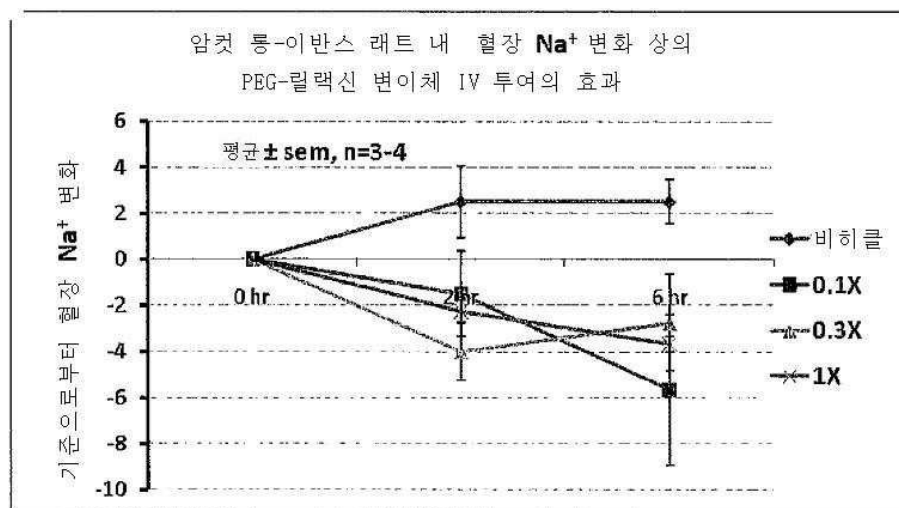
도면20a



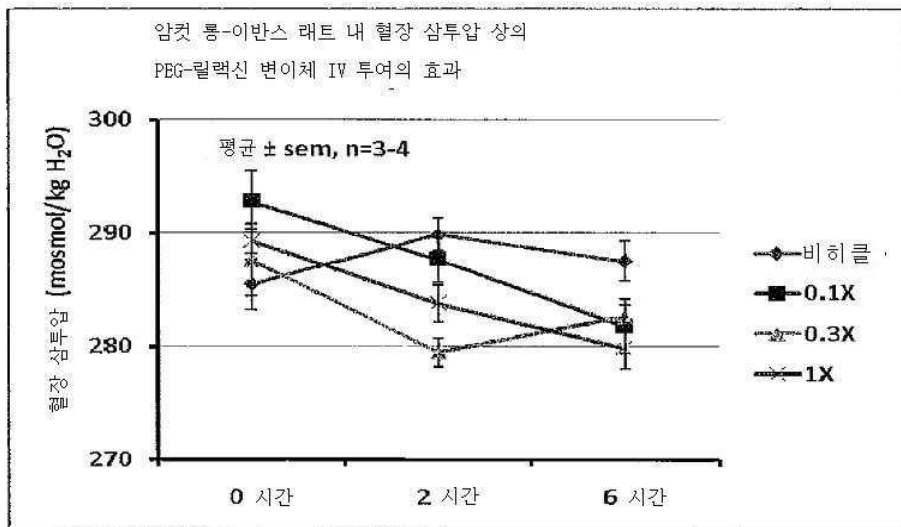
도면20b



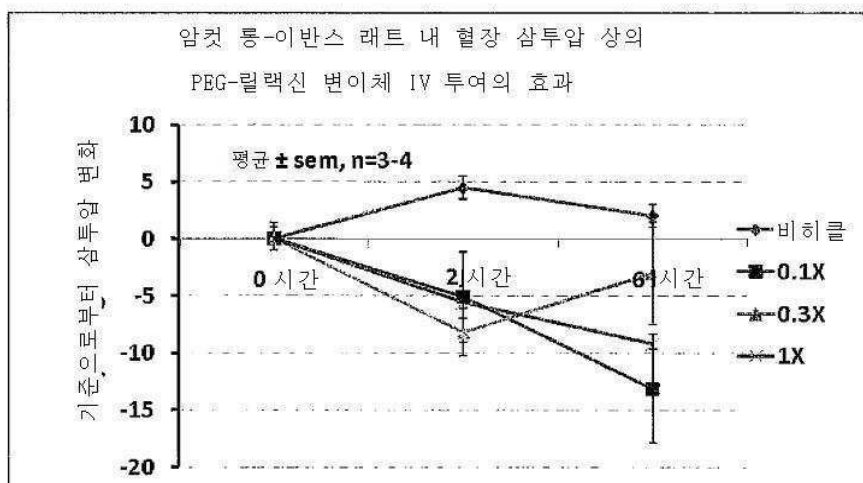
도면20c



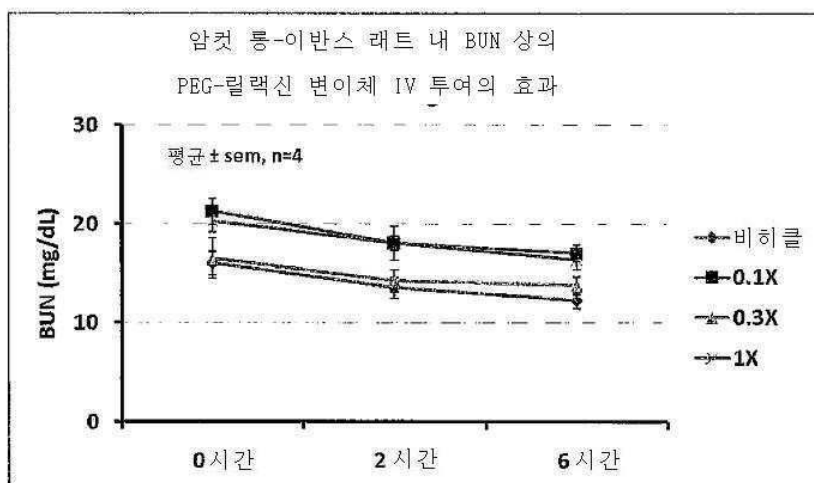
도면20d



도면20e

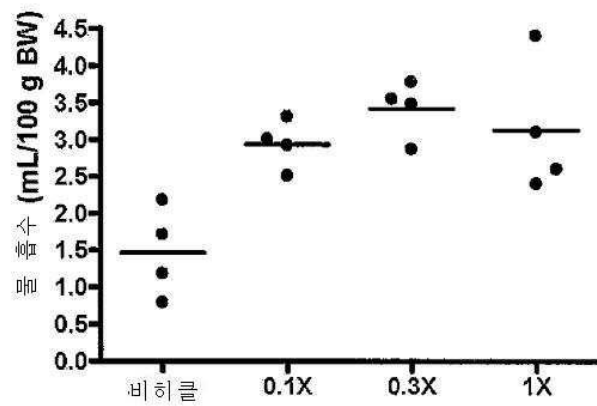


도면20f



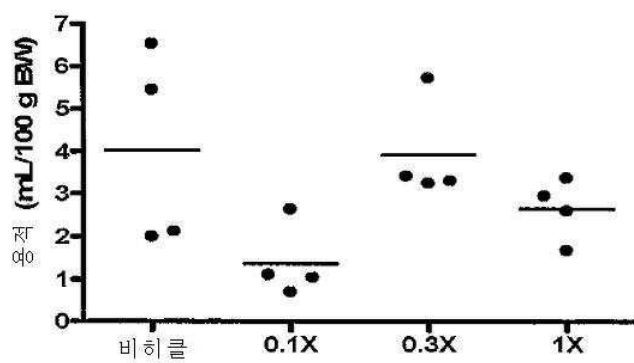
도면20g

암컷 통-이반스 래트 내 물 흡수(0 내지 6시간) 상의
PEG-릴랙신 변이체 IV 투여의 효과



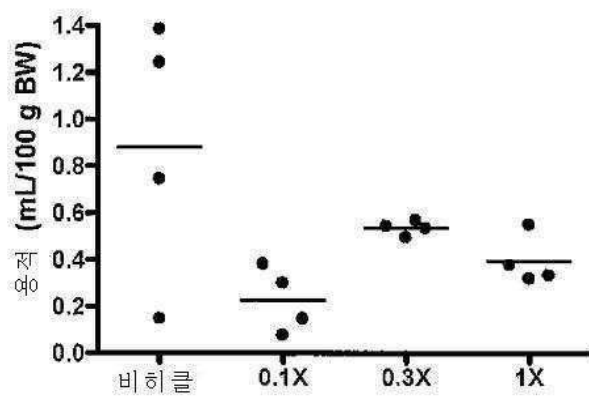
도면20h

암컷 통-이반스 래트 내
기준 소변 배출량(-16 내지 0시간)



도면20i

암컷 통-이반스 래트 내 소변 배출량(0 내지 6시간)
상의 PEG-릴랙신 변이체 IV 투여의 효과



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kraynov, Vadim

Knudsen, Nick

Hewet, Amha

de Dios, Kristine

Pinkstaff, Jason

Sullivan, Lorraine

<120> Modified Relaxin Polypeptides and Their Uses

<130> AMBX-0174.00PCT

<150> 61/374,582

<151> 2010-08-17

<160> 34

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu

20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

85

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

20

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly

1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu

20 25 30

Gln Lys Arg

35

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg

1 5

<

210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gc 72

<210> 11

<211> 87

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgagatt 60

gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87

<210> 12

<211> 159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120

cgcgcgcaga ttgccatttg cggcattgagc acctggagc 159

<210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 atgaaaaaga atatgcatt ttttcttaaa cgg 33
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 atgattgaag gtggtcgt 18
 <210> 15
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
 1 5 10 15
 Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
 20 25 30
 Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
 35 40 45
 Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
 50 55 60
 Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
 65 70 75 80
 Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 85 90
 <210> 16
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> Mutant synthetase derived from *Methanococcus jannaschii*
synthetase

<400> 16

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

1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val

20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60
Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys

100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His

145 150 155 160
Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu

305

<210> 17

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA

<400> 17

ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccgc cggacca 77

<210> 18

<211> 77

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 18

ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccgcccgc cggacca 77

<210> 19

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized amber supressor tRNA

<400> 19

cccagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgtttct gtaggagttc 60
gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 20

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA

<400> 20

gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct ctaggagtt 60
cgagggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-L-phenylalanine

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

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

115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu

305

<210> 22

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-benzoyl-L-phenylalanine

<400> 22

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

1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly

20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His

145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300
Arg Leu

305

<210> 23

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
propargyl-phenylalanine

<400

> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190

 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305
 <210> 24
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-phenylalanine

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Leu

305

<210> 25

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-phenylalanine

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175
 Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190

 Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205
 Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220
 Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

 Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285
 Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300
 Leu
 305
 <210> 26
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Arg Leu

305

<210> 27

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 27

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
 145 150 155 160
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 28
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 28

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 29

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
 145 150 155 160
 Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 30
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 31

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-acetyl

-phenylalanine

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
 145 150 155 160
 Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190
 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255
 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 32
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine

<400> 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 33

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140
 Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
 145 150 155 160
 Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175
 His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

 Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205
 Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220
 Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240
 Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

 Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270
 Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285
 Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300
 Arg Leu
 305
 <210> 34
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

Arg Leu

305