



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0121601
(43) 공개일자 2016년10월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/50 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/50 (2013.01)
A61K 38/1825 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7027888(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년03월19일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2015-7014075
원출원일자(국제) 2008년03월19일
심사청구일자 2015년06월26일
- (85) 번역문제출일자 2016년10월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/057563
- (87) 국제공개번호 WO 2008/121563
국제공개일자 2008년10월09일
- (30) 우선권주장
60/921,297 2007년03월30일 미국(US)
60/988,060 2007년11월14일 미국(US)

- (71) 출원인
암브록스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 92037 라호야 노스 터레이 파
인스 로드 10975 스위트 100
- (72) 발명자
쿠제 토마스 피
미국 92131 캘리포니아주 샌 디에고 글렌크릭 서
클 10988
마리아니 로베르토
미국 92101 캘리포니아주 샌 디에고 웨스트 애쉬
스트리트 #1208 350
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

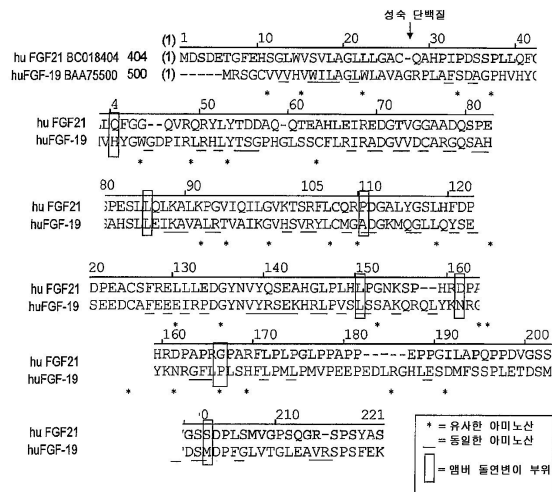
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 그 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)

C12N 15/09 (2013.01)

(72) 발명자

헤이스 푸트남 안나-마리아 에이

미국 92124 캘리포니아주 샌 디에고 세스페드 드라이브 11522

키페 윌리엄 엠

미국 90046 캘리포니아주 웨스트 할리우드 #205 노스 크레슨트 하이츠 볼러바드 1425

누드슨 닉

미국 92127 캘리포니아주 샌 디에고 마티널 서클 10709

호 릴리언

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 캐년 블러프 코트 6232

핑크스태프 제이슨

미국 92024 캘리포니아주 엔시너터스 윈더링 로드 2095

크레이노브 바딤

미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 화이트 오크 레인 5457

명세서

청구범위

청구항 1

비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드로서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 서열 번호 1의 22, 36, 56, 83, 96, 99, 104 또는 135번째 아미노산 위치, 또는 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 또는 서열 번호 7의 상응하는 아미노산 위치에서 치환되고, 상기 폴리펩티드는 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산의 치환을 포함하는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6 또는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결되고, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 파라 치환, 오르토 치환 또는 메타 치환 페닐알라닌을 포함하는 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드가 인간 FGF-21의 생물학적 활성을 유지하는 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드가 FGF-21 폴리펩티드 효현제, 부분 효현제, 길항제, 부분 길항제, 또는 역 효현제(inverse agonist)인 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드가 폴리-히스티딘, 친화성 에피토프, 상기 폴리펩티드 서열의 N-말단에서 메티오닌, 알부민 또는 그의 부분, 또는 인간 혈청 알부민 또는 그의 부분과 융합된 상기 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하거나, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 파라-아세틸-페닐알라닌인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 0.1 kDa~100 kDa의 평균 분자량을 갖는 수용성 중합체, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 수용성 중합체, 또는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하고 30 kDa의 평균 분자량을 갖는 수용성 중합체, 또는 분지형 또는 멀티아암형 수용성 중합체, 또는 올리고사카라이드에 연결되는 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드가 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 갖지 않는 상응하는 인간 FGF-21 폴리펩티드에 비해 증가된 생체내 반감기를 나타내는 것인 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드.

청구항 8

약학적으로 허용되는 담체 및 제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항의 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는, 제2형 당뇨병, 비만, 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 당불내성, 고혈당증, 대사 증후군, 글루코스 대사 장애, 또는 이들의 조합의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 9

제2형 당뇨병, 비만, 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 당불내성, 고혈당증, 대사 증후군, 글루코스 대사 장애, 또는 이들의 조합의 치료, 예방 또는 중증도 저감을 위한 치료 요법에 사용하기 위한 의약으로서, 예방적 또는 치료적 유효량의 제8항의 약학 조성물을 포함하는 의약.

청구항 10

폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 조건 하에 오르토고날 tRNA 합성효소, 오르토고날 tRNA 또는 둘 다의 존재 하에 발현될 경우 제1항 내지 제7항 중 한 항의 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 생성하는 하나 이상의 선택적 코돈을 포함하는 핵산.

청구항 11

제10항의 핵산을 포함하는 세포로서, 오르토고날 tRNA 합성효소 또는 오르토고날 tRNA를 포함하는 세포.

청구항 12

적절한 배지 중에서, 제10항의 핵산을 포함하는 진핵 세포를 배양하는 단계로서, 상기 핵산은, 오르토고날 tRNA 합성효소, 오르토고날 tRNA 또는 둘 다를 포함하는 진핵 세포에서 발현될 경우, 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 생성하는 것인 단계를 포함하는, 진핵 세포에서 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 13

진핵 세포에서 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서, 적절한 배지 중에서, 상기 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 진핵 세포를 배양하는 단계로서, 상기 핵산은, 오르토고날 tRNA 합성효소, 오르토고날 tRNA 또는 둘 다를 포함하는 진핵 세포에서 발현될 경우, 상기 폴리펩티드 서열을 생성하는 것인 단계, 및

상기 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 수용성 중합체와 접촉시켜, 상기 수용성 중합체를 포함하는 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 생성하는 단계

를 포함하는 것인, 진핵 세포에서 변형된 인간 FGF-21 폴리펩티드를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]

[0002] 본 출원은 2007년 3월 30일에 출원된 미국 가특허 출원 제60/921,297호 및 2007년 11월 14일에 출원된 미국 가특허 출원 제60/988,060호를 기초로 우선권과 이익을 주장하며, 상기 가특허 출원의 명세서 및 개시 내용은 그 전체를 본원에서 참고로 포함한다.

[0003] [발명의 분야]

[0004] 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 임의로 변형된 FGF-21 폴리펩티드에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 섬유아세포 성장 인자는 발생중인 조직과 성체 조직에서 광범위하게 발현되는 대형 폴리펩티드로서[Baird et al., Cancer Cells, 3:239-243 (1991)], 신생혈관형성, 유사 분열, 패턴 형성, 세포 분화, 대사 조절 및 조직 손상의 수복을 비롯한 다수의 생리학적 기능에 있어서 중요한 역할을 한다[McKeehan et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59:135-176 (1998); Burgess, W. H. et al., Annu. Rev. Biochem. 58:575-606 (1989)]. 프로타타입 섬유아세포 성장 인자(FGF), 즉, FGF-1 및 FGF-2는 섬유아세포의 유사분열 촉진제(마이트젠)으로서 뇌와 뇌하수체에서 처음 분리되었다. FGF-3은 마우스 유방 종양 바이러스에 의한 활성화의 일반적 표적인 것으로 확인되었고[Dickson et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 638:18-26 (1991)]; FGF-4 내지 FGF-6은 암 유전자 생성물인 것으로 확인되었다[Yoshida et al., Ann. NY Acad. Sci. 638:27-37 (1991); Goldfarb et al., Ann. NY Acad. Sci. 638:38-52 (1991); Coulier et al., Ann. NY Acad. Sci. 638:53-61 (1991)]. FGF-10은 상동성에 기초한 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 래트의 폐로부터 확인되었다[Yamasaki et al., J. Biol. Chem.

271:15918-15921 (1996)]. FGF-11 내지 FGF-14(FGF 상동성 인자(FHF) 1~4)는 랜덤 cDNA 서열분석, 데이터베이스 검색 및 상동성에 기초한 PCR의 병용에 의해 인간의 망막으로부터 확인되었다[Smallwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9850-9857 (1996)]. FGF-15는 키메라 호메오도메인 암 단백질의 하류 표적인 것으로 확인되었다[McWhirter et al., Development 124:3221-3232 (1997)]. FGF-16, FGF-17 및 FGF-18은 각각 상동성에 기초한 PCR에 의해 래트의 심장과 배아로부터 확인되었다[Miyake et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:148-152 (1998); Hoshikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 244:187-191 (1998); Ohbayashi et al., J. Biol. Chem. 273:18161-18164 (1998)]. FGF-19는 데이터베이스 검색을 통해 인간 태아의 뇌로부터 확인되었다[Nishimura et al., Biochim. Biophys. Acta 1444:148-151 (1999)]. 이들은 약 30~60%의 아미노산 동일성을 갖는 보존된 약 120개 아미노산 잔기로 이루어진 코어를 갖는다.

[0006] 자연 발생 돌연변이의 동물 모델, 과발현 및 분석을 통해 섬유아세포 성장 인자 및 그 수용체를 다양한 질병과 연관시키게 되었으며[참고 문헌: Wilkie et al., Current Biology, (1995) 5:500-507; Pugh-Humphreys et al., In: The Cytokine Handbook, A. Thomson ed, 2nd edition, Academic Press, Harcourt Brace & co. publishers, London, pp 525-566], 이는 활성의 조절이 치료에 이용될 수 있음을 시사한다. 예를 들어, 화합물 수라민(Suramin)에 의한 섬유아세포 성장 인자-2의 억제제는 마우스에서 신혈관 형성 및 종양 증식을 방지한다[Pesenti et al., British Journal of Cancer, 66:367-372]. 섬유아세포 성장 인자는 또한 신생혈관형[Lyons, M. K., et al., Brain Res. (1991) 558:315-320], 상처 치유[Uhl, E., et al., Br. J. Surg. (1993) 80:977-980, 1993], 성상교세포증, 신경교 세포 증식 및 분화[Biagini, G. et al., Neurochem. Int. (1994) 25:17-24], 뇌혈관 확장[Tanaka, R. et al., Stroke (1995) 26:2154-2159] 및 신경 성장 촉진/신경 조절 과정에 있어서도 기능을 한다.

[0007] 섬유아세포 성장 인자는 또한 혈류 및 칼슘 독성으로부터의 보호를 비롯한 다수의 긍정적인 효과를 나타내어, 뇌 허혈의 결과를 개선시킨다[Mattson, M. P. et al., Semin. Neurosci. (1993) 5:295-307; Doetecj. W. D. et al., J. Neurotrauma (1996) 13:309-316]. 염기성 FGF 치료는 허혈 심근에서 신생혈관형성을 촉진한다[Schumacher et al., Circulation (1998) 97:645-650]. 염기성 FGF는 기능 회복을 증진하고 국소 뇌경색 후의 뉴런 발아를 촉진한다[Kawamata et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(1997) 94 (15):8179-84]. 공개된 문헌에 따르면, FGF 패밀리는 적어도 22개의 구성원으로 구성된다[Reuss et al., Cell Tissue Res. 313:139-157 (2003)].

[0008] 섬유아세포 성장 인자 21(FGF-21)은 간에서 우선적으로 발현되는 것으로 보고되었으며[Nishimura et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206 (2000); WO 01/36640; 및 WO 01/18172, 모두 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함함], 허혈성 혈관 질환, 상처 치유, 및 폐, 기관지 또는 폐포 세포 또는 기능 손실과 관련된 질환 및 수많은 다른 질환의 치료제로서 알려져 있다. FGF-21은 간, 신장 및 근육 조직에서 주로 발현된다[본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2004-0259780호의 실시예 2 참조]. 상기 FGF-21 유전자는 3개의 엑손으로 이루어져 있으며 19번 염색체 상에 위치한다. 다른 FGF와는 달리, FGF-21은 증식 효과와 종양 형성 효과를 나타내지 않는다[Genome Biol. 2001; 2(3): REVIEWS 3005].

[0009] 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2001-0012628호는, 인간 FGF-21의 뉴클레오타이드 및 단백질 서열을 개시한다[각각 미국 특허 출원 공개 제2001-0012628호의 서열 번호 1 및 2 참조]. 상기 공보에서 서열 번호 2(sbgFGF-19로 칭해짐)는 209개 아미노산의 길이이며 N 말단에 28개 아미노산의 리더 서열을 포함한다. 본 명세서에서 서열 번호 3으로서 제시된 인간 FGF-21 서열은 미국 특허 출원 공개 제2001-0012628호의 서열 번호 2와 동일한 서열이다. 이 서열은 174번 위치에 프롤린(P)을 갖는 단일 염기 다형(SNP)을 가지며, 이하 "FGF-21의 209 아미노산 P형"이라 칭한다.

[0010] 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제6,716,626호는, 인간 FGF-21과, 다른 포유동물에서, 특히 마우스 및 래트에서의 상동성 단백질에 관해 기재한다. 미국 특허 제6,716,626호의 서열 번호 1로서 제시된 마우스 FGF는 간에서 많이 발현되고 고환 및 흉선에서 발현되었으며, 인간 FGF-21은 간 질환 및/또는 고환 기능 장애 또는 흉선 유래 세포의 기능 장애의 발생과 그로부터의 회복에 있어서 역할을 할 수 있음이 시사되었다. 미국 특허 제6,716,626호의 서열 번호 4는 209개 아미노산의 길이이고 N 말단에 28개 아미노산의 리더 서열을 포함한다. 본 명세서에서 서열 번호 6으로 제시된 인간 FGF-21 서열은 미국 특허 제6,716,626호의 서열 번호 4의 서열과 동일한 서열이다. 이 서열은 174번 위치에 루신(L)을 갖는 단일 염기 다형(SNP)을 가지며, 이하 "FGF-21의 209 아미노산 L형"이라 칭한다.

[0011] 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2004-0259780호는 인간 FGF-21에 관해 기재하며, 208개 아미노산의 길이이고(미국 특허 출원 공개 제2004-0259780호의 서열 번호 2) N 말단에 27개 아

미노산의 리더 서열을 포함하는 서열을 제시한다. 본 명세서에서 서열 번호 7로서 제시된 인간 FGF-21 서열은 미국 특허 출원 공개 제2004-0259780호의 서열 번호 2의 서열과 동일한 서열이다. 이 서열은 173번 위치에 루신(L)을 갖는 단일 염기 다형(SNP)을 가지며, 이하 "FGF-21의 208 아미노산 L형"이라 칭한다.

[0012] FGF-21은, 인슐린의 존재 및 부재하에 마우스 3T3-L1 지방 세포에서 글루코스 흡수를 촉진하고, *ob/ob* 및 *db/db* 마우스 및 8주령 ZDF 래트에서 용량 의존적으로 식후 혈당 및 공복 혈당, 중성지방 및 글루카곤 수치를 감소시키는 것으로 확인되었으며, 따라서 이것은 FGF-21을 당뇨병 및 비만의 치료제로서의 사용할 수 있는 기초를 제공한다(본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 03/011213; 문헌[Kharitonov et al., J Clin Invest. 2005 Jun; 115(6):1627-35] 참조). 문헌[Kharitonov et al., J Clin Invest. 2005 Jun; 115(6):1627-35]은 또한 인간 FGF-21을 발현하는 유전자이식 마우스가 저혈당증이고 인슐린 민감성이며 식이 유발 비만에 내성이 있다는 것을 제시하였다. 문헌[Kharitonov et al., Endocrinology (출판중)]은 또한 FGF-21이 붉은털 원숭이(Rhesus monkey)에서 글루코스, 중성지방, 인슐린 및 글루카곤을 낮춘다고 제시한다.

[0013] 또한, FGF-21은 중환자의 사망률 및 발병률을 감소시키는 데 효과적인 것으로 확인되었다[본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 03/059270 참조]. FGF-21은, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2005-0176631호에서, 전체적인 대사 상태에 영향을 주어, 패혈증뿐만 아니라 비감염성의 발병 원인에 기인하는 전신성 염증 반응 증후군(SIRS)에 대한 신체 스트레스 반응 중에 발생할 수 있는 부정적인 부작용을 상쇄할 수 있다고 개시된 바 있다. 따라서, FGF-21은 중환자에게서 발생하는 사망률 및 발병률을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 중환자는 지속적인 의사의 관리, 간호 및 호흡 관리를 요하는 생리학적으로 불안정한 환자를 포함한다. 이러한 유형의 관리는, 꾸준한 감시와 치료 조정을 제공하기 위해서 세세한 사항에 특별한 관심을 기울일 것을 요한다. 중환자는, 생리학적 대상부전 위험이 있어서, 부작용 발생을 방지하기 위해 집중 관리 의료가 즉각적인 개입을 할 수 있도록 지속적인 모니터링을 요하는 환자를 포함한다. 중환자는, 지속적인 조정 관리(titrated care)를 제공할 수 있는 팀에 의해 제공되어야 하는 모니터링 및 연명 조치에 대한 특별한 필요성을 가지고 있다.

[0014] PEG화 FGF-21 폴리펩티드는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 2005/091944에 기재되어 있다. WO 2005/091944에 기재된 FGF-21 폴리펩티드는 181개 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다. WO 2005/091944의 서열 번호 1로서 제시된 성숙, 야생형 또는 본래의 인간 FGF-21 서열에는 리더 서열이 없다. 이러한 인간 FGF-21은 마우스 FGF-21(약 79%의 아미노산 동일성) 및 래트 FGF-21(약 80%의 아미노산 동일성)과 동일성이 매우 크다. 본 명세서에서 서열 번호 5로서 제시된 인간 FGF-21 서열은 WO 05/091944의 서열 번호 1의 서열과 동일한 서열이다. 이 서열은 146번 위치에 루신(L)을 갖는 단일 염기 다형(SNP)을 갖는다. 당업자라면 본 명세서에 개시된 용도에 따라 인간 FGF-21 서열에 대해 충분한 상동성을 갖는 선택적인 포유동물 FGF-21 폴리펩티드 서열 또는 유사체, 뮤테인(mutain) 또는 유도체를 용이하게 이용할 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 서열 번호 1로서 제시된 인간 FGF-21 서열은 146번 위치에 프롤린(P)을 갖는 단일 염기 다형(SNP)을 갖는다. 서열 번호 1의 N 말단 His 태그 버전은 본 명세서에서 서열 번호 2로서 제시된다.

[0016] WO 2005/091944는 FGF-21 화합물의 특정 잔기에 대한 하나 이상의 PEG 분자의 공유 결합에 관해 기재한다. 생성된 화합물은 본래의 FGF-21에 비해 연장된 제거 반감기를 지니고 제거율이 감소된 생물학적 활성을 갖는 PEG화 FGF-21 화합물이었다. 이 PEG 분자는 시스테인 또는 라이신 잔기에 공유 결합되었다. 하나 이상의 PEG 분자의 부착이 가능하도록 다양한 위치에서 시스테인에 의한 치환이 이루어졌다. 하나 이상의 라이신 잔기(56, 59, 69 및 122)에서의 PEG화에 관해 기재되어 있다.

[0017] PEG화 FGF-21 화합물은 제2형 당뇨병, 비만, 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 당불내성, 고혈당증 및 대사 증후군을 포함하나 이들에 한정되지 않는 질환을 앓고 있는 피험체의 치료에 유용할 것이다. 순환 반감기를 길게 할 수 있음으로 해서 효능을 증가시킬 수 있고 더 적은 용량을 필요로 하여, 이러한 치료를 요하는 피험체의 편의성을 증가시키고 동시에 투약 요건에 대한 피험체의 순응 확률을 증가시킬 수 있는 PEG화 FGF-21 화합물을 갖는 것이 특히 유익할 것이다. 대사 증후군은 하기 징후 중 3 가지 이상을 함께 보이는 것으로 정의할 수 있다: 복부 지방 - 대부분의 남성에게 있어서 허리 둘레 40 인치 이상; 고혈당 - 공복 후 110 밀리그램/데시리터(mg/dL) 이상; 고중성지방 - 혈중 150 mg/mL 이상; 저 HDL - 40 mg/dL 미만; 및 130/85 이상의 혈압.

[0018] 친수성 중합체 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG로 약칭)의 공유 결합은, 수용해도, 생체이용률을 증가시키거나, 혈청 반감기를 증가시키거나, 치료 반감기를 증가시키거나, 면역원성을 조절하거나, 생물학적 활성을 조절하거나, 또는 단백질, 펩티드 및 특히 소수성 분자를 비롯한 다수의 생물학적 활성 분자의 순환 시간을 연장시키는 방법이다. PEG는 의약, 인공 임플란트뿐만 아니라, 생체적합성, 독성의 부재 및 면역원성의 부재가 중요한 다른 용도

에도 널리 사용되어 왔다. PEG의 원하는 특성을 최대화하기 위해서는, PEG 중합체, 또는 생물학적 활성 분자에 부착된 중합체의 총 분자량과 수화 상태가, 모분자의 생물학적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 증가된 수용해도 및 순환 반감기와 같이 PEG 중합체 부착과 일반적으로 관련되어 있는 유익한 특성들을 부여하도록 충분히 높아야 한다.

- [0019] PEG 유도체는 흔히 반응성 화학 작용기, 예컨대 라이신, 시스테인 및 히스티딘 잔기, N 말단 및 탄수화물 부분을 통해 생물학적 활성 분자에 연결된다. 치료용 FGF-21 화합물의 제제화에 관해 연구가 진행된 바 있지만, 많은 이유로 인하여 순조롭지 않았는데, 그 이유 중 하나는, 단백질 및 다른 분자는 대개 중합체 부착에 이용 가능한 반응 부위의 수가 한정되어 있기 때문이다. 대개, 중합체 부착을 통한 변형에 가장 적합한 부위가 수용체 결합에서 중요한 역할을 하며 분자의 생물학적 활성 유지에 필수적이다. 그 결과, 생물학적 활성 분자 상의 그러한 반응 부위에서의 중합체 사슬의 무계획적인 부착은 종종 중합체에 의해 변형된 분자의 생물학적 활성의 현저한 저하 또는 심지어 완전한 상실을 초래한다[R. Clark et al., (1996), J. Biol. Chem., 271:21969-21977]. 선행 기술의 접근법은, 원하는 이점을 표적 분자에 부여하기 위해 충분한 중합체 분자량을 갖는 접합체를 형성하기 위해서, 일반적으로 그 분자에 다수의 중합체 아암(arm)을 무작위로 부착시키는 방법을 이용하였는데, 이는 모분자의 생물학적 활성을 감소시키거나 심지어 완전한 상실시킬 위험을 증가시킨다.
- [0020] 단백질에 대한 PEG 유도체의 부착 지점을 형성하는 반응 부위는 단백질의 구조에 의해 결정된다. 효소를 비롯한 단백질은 $H_2N-CHR-COOH$ 의 일반 구조를 갖는 다양한 알파-아미노산 서열로 이루어진다. 한 아미노산의 알파 아미노 부분(H_2N)은 인접 아미노산의 카복실 부분($-COOH$)에 연결되어, $-(NH-CHR-CO)_n-$ (여기서, 첨자 "n"은 수백 또는 수천일 수 있음)으로 나타낼 수 있는 아마이드 결합을 형성한다. R로 표시되는 단편은 단백질의 생물학적 활성과 PEG 유도체의 부착을 위한 반응 부위를 포함할 수 있다.
- [0021] 예를 들어, 아미노산 라이신의 경우, 엡실론 위치뿐만 아니라 알파 위치에도 $-NH_2$ 부분이 존재한다. 엡실론 $-NH_2$ 는 염기성 pH 조건하에서 반응에 자유롭게 이용된다. PEG에 의한 단백질 유도체화 분야의 기술 중 상당수가, 단백질 내에 존재하는 라이신 잔기의 엡실론 $-NH_2$ 부분에서의 부착을 위한 PEG 유도체를 개발하는 데 주력하였다 ["Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17]. 그러나 이러한 PEG 유도체는, 단백질 표면 상에 대개는 다수가 존재하는 라이신 잔기 중 어느 하나에 선택적으로 부착시킬 수 없다는 점에서, 모두 공통된 제약을 갖고 있다. 이것은, 라이신 잔기가 단백질 활성화에 중요한 경우, 또는 예를 들어 효소 활성 부위에 존재하는 경우, 또는 수용체 결합 부위의 경우와 같이 라이신 잔기가 단백질과 다른 생물학적 분자의 상호작용을 매개하는 데 역할을 하는 경우에 심각한 제약이 될 수 있다.
- [0022] 종래의 단백질 PEG화 방법에 있어서 동등하게 중요한 제2의 문제점은 PEG 유도체가 원하는 것이 아닌 다른 잔기와 원치않는 부반응을 겪을 수 있다는 것이다. 히스티딘은 구조식 $-N(H)-$ 로 표시되는 반응성 이미노 부분을 포함하나, 엡실론 $-NH_2$ 와 반응하는 다수의 반응성 화학종 역시 $-N(H)-$ 와 반응할 수 있다. 마찬가지로, 아미노산 시스테인의 측쇄는 구조식 $-SH$ 로 표시되는 자유 설프하이드릴기를 보유한다. 일부 경우, 라이신의 엡실론 $-NH_2$ 기에 유도된 PEG 유도체는 시스테인, 히스티딘 또는 다른 잔기와도 반응한다. 이로 인해 PEG 유도체화 생물 활성 분자의 복잡하고 불균질한 혼합물이 생성될 수 있어서, 대상이 되는 생물 활성 분자의 활성을 파괴할 위험이 발생할 수 있다. 명확히 정의되어 있고 예측 가능한 단백질 표면 상의 특정 부위로 생물 활성 분자에 하나 이상의 PEG 중합체가 선택적으로 커플링될 수 있도록, 화학적 작용기가 단백질 내 단일 부위에 도입되도록 하는 PEG 유도체를 개발하는 것이 바람직할 것이다.
- [0023] 당업계에서는, 라이신 잔기 이외에도, 시스테인, 히스티딘 및 N 말단을 비롯한 다른 아미노산 측쇄를 표적으로 하는 활성화된 PEG 반응체의 개발에 상당한 노력이 기울여졌다. 이에 대해서는, 예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제6,610,281호 및 문헌["Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17]을 참조할 수 있다. 시스테인 잔기는 부위 지정 돌연변이 유발법 및 당업계에 공지된 다른 기법을 이용하여 단백질 구조에 부위 선택적으로 도입될 수 있으며, 형성된 자유 설프하이드릴 부분은 티올 반응성 작용기를 보유하는 PEG 유도체와 반응할 수 있다. 그러나, 이러한 접근법은, 자유 설프하이드릴기의 도입이 생성된 단백질의 발현, 폴딩 및 안정성을 악화시킬 수 있다는 점에서 곤란하다. 따라서, 단백질에 하나 이상의 PEG 분자를 선택적으로 커플링할 수 있음과 동시에 설프하이드릴 및 단백질에 일반적으로 존재하는 다른 화학적 작용기와 상용성인(즉, 원치않는 부반응을 일으키지 않는), FGF-21로 화학적 작용기를 도입하는 방법을 개발할 것이 요망된다.

[0024] 기술의 샘플링으로부터 알 수 있는 바와 같이, 단백질의 측쇄, 특히 라이신 아미노산 측쇄 상의 $-NH_2$ 부분 및 시스테인 측쇄 상의 $-SH$ 부분의 부착을 위해 개발된 이러한 유도체 중 다수가 그 합성 및 사용에 있어서 문제가 있는 것으로 판명되었다. 일부는 단백질과 불안정한 결합을 형성하고, 이것은 가수분해되고, 이로 인해 분해, 붕괴되거나 또는 혈류와 같은 수성 환경에서 불안정하다. 일부는 보다 안정한 결합을 형성하지만, 결합이 형성되기 전에 가수분해되는데, 이는 단백질이 부착되기 전에 PEG 유도체 상의 반응기가 불활성화될 수 있다는 것을 의미한다. 일부는 다소 독성이 있어서 생체내 사용에 덜 적합하다. 일부는 실제 사용하기에는 너무 느린 속도로 반응한다. 일부는, 단백질 활성을 담당하는 부위에 부착됨으로써 단백질 활성의 손실을 초래한다. 일부는 이들이 부착하는 부위에 특이적이지 않고, 이 역시 원하는 활성의 손실과 결과의 재현성 결여로 이어질 수 있다. 폴리(에틸렌 글리콜) 부분에 의한 단백질 변형과 관련된 문제점을 극복하기 위해, 보다 안정하거나(예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제6,602,498호 참조), 분자 및 표면 상의 티올 부분과 선택적으로 반응하는(예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제6,610,281호 참조) PEG 유도체가 개발되었다. 당업계에서는, 생리학적 환경하에서 화학적으로 비활성이고 필요하게 된 후에야 선택적으로 반응하여 안정한 화학 결합을 형성하는 PEG 유도체가 분명 요구되고 있다.

[0025] 최근, 단백질 과학 분야에서, 단백질의 부위 특이적 변형과 관련된 한계점 중 다수를 극복할 수 있을 것으로 전망하는 완전히 새로운 기술이 보고되었다. 구체적으로, 원핵생물 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*; *E. coli*)(예를 들어, 문헌[L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500] 참조) 및 진핵생물 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*; *S. cerevisiae*)(예를 들어, 문헌[J. Chin et al., Science 301:964-7 (2003)] 참조)의 단백질 생합성 기구에 새로운 구성요소들이 추가되었는데, 이는 생체내에서 단백질에 비유전적으로 코딩된 아미노산의 통합을 가능하게 하였다. 광친화성 표지 및 광이성질체화 가능한 아미노산, 광가교결합 아미노산(예를 들어, 문헌[Chin, J. W., et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:11020-11024]; 및 문헌[Chin, J. W., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027] 참조), 케토 아미노산, 중원자를 포함하는 아미노산 및 글리코실화된 아미노산을 비롯하여 신규한 화학적, 물리적 또는 생물학적 특성을 갖는 다수의 새로운 아미노산이 이 방법에 의해 앰버(amber) 코돈인 TAG에 반응하여 이. 콜라이 및 효모에서 높은 충실도로 효율적으로 단백질 내로 도입되었다. 이에 대해서는, 예를 들어, 문헌[J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027]; 문헌[J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 3(11):1135-1137]; 문헌[J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024]; 및 문헌[L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11]을 참조할 수 있다. 상기 참고 문헌은 모두 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다. 이들 연구는, 단백질 내에 존재하지 않으며, 유전적으로 코딩된 20종의 일반 아미노산에 존재하는 모든 작용기에 대해 화학적으로 비활성이고, 효율적 및 선택적으로 반응하여 안정한 공유 결합을 형성하는 데 사용될 수 있는, 케톤기, 알킨기 및 아지드 부분과 같은 화학적 작용기를 선택적이면서 통상적으로 도입할 수 있음을 입증하였다.

[0026] 비유전적으로 코딩된 아미노산을 단백질로 도입할 수 있는 능력은 라이신의 엡실론- NH_2 , 시스테인의 설프하이드릴- $-SH$, 히스티딘의 이미노기 등과 같은 천연 작용기에 대한 유용한 대용물이 될 수 있는 화학적 작용기의 도입을 가능하게 한다. 일부 화학적 작용기는 유전적으로 코딩된 20종의 일반 아미노산에 존재하는 작용기에 대해 비활성이긴 하지만 분명히 효율적으로 반응하여 안정한 결합을 형성하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 아지드 및 아세틸렌 기는 측매량의 구리 존재하에 수성 조건에서 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응을 겪는 것으로 알려져 있다. 이에 대해서는, 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 참조할 수 있다. 예를 들어, 아지드 부분을 단백질 구조로 도입함으로써, 단백질 내에 존재하는 아민, 설프하이드릴, 카복실산, 하이드록실기에 대해 화학적으로 비활성이지만, 또한 아세틸렌 부분과 순조롭게 또 효율적으로 반응하여 고리화첨가 반응 생성물을 형성하는 작용기를 도입할 수 있다. 중요한 점은, 아세틸렌 부분이 없을 경우, 다른 단백질 측쇄 존재하에 생리학적 조건하에서 아지드 부분이 화학적으로 비활성이고 비반응성인 상태로 존재한다는 것이다.

[0027] 본 발명은, 특히, FGF-21 폴리펩티드의 활성 및 그 제조 방법과 관련된 문제를 해결하고, 또한, 개선된 치료 반감기와 같은 개선된 생물학적 또는 약리학적 특성을 갖는 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0028] 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다.

- [0029] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 이작용성 중합체, 이작용성 링커, 또는 하나 이상의 추가적인 FGF-21 폴리펩티드에 연결된다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 링커에 의해 수용성 중합체에 연결되거나 수용성 중합체에 결합된다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 이작용성 중합체이다. 일부 실시형태에서, 상기 이작용성 중합체는 제2 폴리펩티드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 제2 폴리펩티드는 FGF-21 폴리펩티드이다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함하는 수용성 중합체에 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개의 아미노산은 비천연적으로 코딩된 아미노산이다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 서열 번호 34~36에서 1번 위치 앞(즉, N 말단)에서부터 C 말단까지 중 하나 이상의 위치에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 87, 77, 83, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 서열 번호 3, 4, 6, 7의 리더 또는 신호 서열, 또는 다른 FGF-21 서열에 도입된다. 일부 실시형태에서, 리더 서열은 서열 번호 39, 40, 41, 42, 43 또는 44로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, FGF-21 분비 구성체는 서열 번호 39, 40, 41, 42, 43 또는 44로부터 선택되는 리더 서열을 갖는 pVK7ara(Nde/Eco)로 클로닝된다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉 N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 서열 번호 34~36의 1번 위치 앞(즉, N 말단)에서부터 C 말단까지 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 위

치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 87, 77, 83, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 서열 번호 3, 4, 6, 7, 39, 40, 41, 42, 43, 44 또는 다른 FGF-21 서열의 리더 또는 신호 서열에서 하나 이상의 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 서열 번호 3, 4, 6, 7 또는 다른 FGF-21 서열의 리더 또는 신호 서열에서 하나 이상의 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다.

[0034] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는, 단백질, 폴리펩티드, 소분자, 또는 핵산을 포함하나 이들에 한정되지 않는, FGF-21 폴리펩티드 수용체 또는 결합 파트너에 대한 FGF-21 폴리펩티드의 친화력을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 안정성과 비교할 때 FGF-21 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 면역원성과 비교할 때 FGF-21 폴리펩티드의 면역원성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 혈청 반감기 또는 순환 시간과 비교할 때 FGF-21 폴리펩티드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 수용해도와 비교할 때 FGF-21 폴리펩티드의 수용해도를 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 용해도와 비교할 때 숙주 세포에서 제조된 FGF-21 폴리펩티드의 용해도를 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 발현 또는 합성과 비교할 때 숙주 세포에서의 FGF-21 폴리펩티드의 발현을 증가시키거나 시험관내에서의 합성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 치환을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드는 효현재 활성을 유지하거나 숙주 세포에서의 발현 수준을 유지 또는 개선시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 프로테아제 내성과 비교할 때 FGF-21 폴리펩티드의 프로테아제 내성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 미국 특허 제6,716,626호는 프로테아제 절단을 변경하기 위해 치환시킬 수 있는 잠재적 부위가 2개의 프롤린 잔기 내의 일염기성 부위를 포함하나 이에 한정되지 않는다고 기재하였다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21 폴리펩티드와 상호작용할 때의 FGF-21 수용체의 신호 전달 활성과 비교할 때 FGF-21 수용체의 신호 전달 활성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21 폴리펩티드의 결합과 비교할 때 수용체와 같은 다른 분자에 대한 그 결합을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0036] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 FGF-21의 상용성과 비교할 때 약학적 보존제(예를 들어, m-크레솔, 페놀, 벤질 알코올)와의 FGF-21 폴리펩티드의 상용성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 증가된 상용성은 보관 중에 단백질의 생리화학적 특성 및 생물학적 특성을 유지하는 보존용 약학 제제의 제조를 가능하게 한다. 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 WO 2005/091944는, 증대된 약학적 안정성을 갖는 다음과 같은 FGF-21 뮤테인의 예에 관해 언급한다: WO 05/091944의 서열 번호 1의 다음 중 하나가 전하를 띠는 아미노산 및/또는 극성이나 전하를 띠지 않는 아미노산으로 치환된 것: 글리신 42, 글루타민 54, 아르기닌 77, 알라닌 81, 루신 86, 페닐알라닌 88, 라이신 122, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 프롤린 130, 아르기닌 131, 루신 139, 알라닌 145, 루신 146, 이소루신 152, 알라닌 154, 글루타민 156, 글리신 161, 세린 163, 글리신 170, 또는 세린 172. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드 내의 상응하는 위치에 이들 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있고/있거나 하나 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 글리신 42, 글루타민 54, 아르기닌 77, 알라닌 81, 루신 86, 페닐알라닌 88, 라이신 122, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 프롤린 130, 아르기닌 131, 루신 139, 알라닌 145, 프롤린/루신 146, 이소루신 152, 알라닌 154, 글루타민 156, 글리신 161, 세린 163, 글리신 170, 세린 172(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에서 치환된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 글루타메이트 91, 아르기닌 131, 글루타민 108, 아르기닌 77, 아르기닌 72, 히스티딘 87, 루신 86, 아르기닌 126, 글루타메이트 110, 타이로신 83, 프롤린 146, 아르기닌 135, 아르기닌 96, 아르기닌 36(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에

서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에서 치환된다.

[0037]

WO 05/091944는 약학적 안정성이 증대된 FGF-21의 추가적인 뮤테인에 관해 기재한다. 이러한 뮤테인은 FGF-21에서 하기 중 2개 이상이 시스테인으로 치환된 것을 포함한다(WO 05/091944의 서열 번호 1 참조): 아르기닌 19, 타이로신 20, 루신 21, 타이로신 22, 트레오닌 23, 아스파테이트 24, 아스파테이트 25, 알라닌 26, 글루타민 27, 글루타민 28, 알라닌 31, 루신 33, 이소루신 35, 루신 37, 발린 41, 글리신 42, 글리신 43, 글루타메이트 50, 글루타민 54, 루신 58, 발린 62, 루신 66, 글리신 67, 라이신 69, 아르기닌 72, 페닐알라닌 73, 글루타민 76, 아르기닌 77, 아스파테이트 79, 글리신 80, 알라닌 81, 루신 82, 글리신 84, 세린 85, 프롤린 90, 알라닌 92, 세린 94, 페닐알라닌 95, 루신 100, 아스파테이트 102, 타이로신 104, 타이로신 107, 세린 109, 글루타메이트 110, 프롤린 115, 히스티딘 117, 루신 118, 프롤린 119, 아스파라긴 121, 라이신 122, 세린 123, 프롤린 124, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 아스파테이트 127, 알라닌 129, 프롤린 130, 글리신 132, 알라닌 134, 아르기닌 135, 루신 137, 프롤린 138, 또는 루신 139. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드 내의 상응하는 위치에서 상기 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있고/있거나, 하나 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치 중 하나 이상에서 치환된다: 아르기닌 19, 타이로신 20, 루신 21, 타이로신 22, 트레오닌 23, 아스파테이트 24, 아스파테이트 25, 알라닌 26, 글루타민 27, 글루타민 28, 알라닌 31, 루신 33, 이소루신 35, 루신 37, 발린 41, 글리신 42, 글리신 43, 글루타메이트 50, 글루타민 54, 루신 58, 발린 62, 루신 66, 글리신 67, 라이신 69, 아르기닌 72, 페닐알라닌 73, 글루타민 76, 아르기닌 77, 아스파테이트 79, 글리신 80, 알라닌 81, 루신 82, 글리신 84, 세린 85, 프롤린 90, 알라닌 92, 세린 94, 페닐알라닌 95, 루신 100, 아스파테이트 102, 타이로신 104, 타이로신 107, 세린 109, 글루타메이트 110, 프롤린 115, 히스티딘 117, 루신 118, 프롤린 119, 아스파라긴 121, 라이신 122, 세린 123, 프롤린 124, 히스티딘 125, 아르기닌 126, 아스파테이트 127, 알라닌 129, 프롤린 130, 글리신 132, 알라닌 134, 아르기닌 135, 루신 137, 프롤린 138, 또는 루신 139(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산).

[0038]

WO 05/091944는 또한, Cys75-Cys93에서의 자연 발생의 것 이외에도, 다음과 같은 조작된 디설파이드 결합(시스테인으로 치환된 아미노산)을 갖는 FGF-21의 특정 뮤테인에 관해 기재한다: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Asp127Cys-Gly132Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19Cys-Pro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys, 또는 Arg77Cys-Ala81Cys(여기서, 넘버링은 WO 05/091944의 서열 번호 1을 기준으로 한 것임). 조작된 디설파이드 결합을 갖는 추가적인 뮤테인으로는 Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; 또는 Asp25Cys-Lys122Cys(여기서, 넘버링은 WO 05/091944의 서열 번호 1을 기준으로 한 것임)이 있다. 조작된 디설파이드 결합을 갖는 추가적인 뮤테인으로는 Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys(여기서, 넘버링은 WO 05/091944의 서열 번호 1을 기준으로 한 것임)이 있다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드 내의 상응하는 위치(들)에서 이러한 치환을 하나 이상 포함할 수 있고/있거나 하나 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 내의 상응하는 위치(들)에서 이러한 치환을 하나 이상 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 서열 번호 34~36에서 1번 위치 앞(즉, N 말단)에서부터 C 말단까지 중 상응하는 위치에서 이러한 치환을 하나 이상 포함할 수 있다.

[0039]

WO 05/091944는 PEG화된 추가적인 FGF-21 뮤테인에 관해 기재한다. 이러한 뮤테인은 하기 치환 중 하나를 포함하였다: D25C, D38C, L58C, K59C, P60C, K69C, D79C, H87C, E91C, E101C, D102C, L114C, L116C, K122C, R126C, P130C, P133C, P140C. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드 내의 상응하는 위치에서 이러한 치환을 하나 이상 포함할 수 있고/있거나 하나 이상의 다른 치환, 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133, 140번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에서 치환된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 서열 번호 34~36에서 1번 위치 앞(즉,

N 말단)에서부터 C 말단까지 중 상응하는 위치에서 이러한 치환을 하나 이상 포함할 수 있다.

[0040] WO 05/091944는 하기 위치, 즉, 19, 21, 26, 28, 29, 30, 36, 39, 42, 50, 56, 61, 64, 65, 68, 70, 71, 77, 81, 85, 86, 90, 92, 94, 98, 107, 108, 112, 113, 123 및 124번 위치에서의 시스테인 치환에 관해 기재한다. WO 05/091944는 하기 위치, 즉, 24, 27, 37, 40, 44, 46, 49, 57, 88, 89, 106, 110, 111, 115, 120 및 139번 위치에서의 시스테인 치환에 관해 기재한다. WO 05/091944는 또한, 하기 위치, 즉, 18, 45, 47, 48, 78, 83, 99, 103, 125, 128, 131, 132 및 138번 위치에서의 시스테인 치환에 관해 기재한다. WO 05/091944는 또한, 하기 위치, 즉, 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122, 126, 130, 133 및 140번 위치에서의 시스테인 치환에 관해 기재한다.

[0041] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 조작된 결합은 하나 이상의 비천연 아미노산에 의해 생성된다. 분자내 결합은 적절한 조건하에서의 단백질 내 2개 아미노산(아미노산 중 하나 또는 둘 다가 비천연 아미노산일 수 있음) 간의 반응; 적절한 조건하에서의, 각각 천연적으로 코딩되거나 비천연적으로 코딩될 수 있는 2개 아미노산과 링커, 중합체 또는 다른 분자의 반응 등을 비롯한 다양한 방식에 의해 생성될 수 있다.

[0042] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드에서의 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 천연 또는 비천연 아미노산에 의한 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드에서의 아미노산 치환은 천연 또는 비천연 아미노산에 의한 것일 수 있으나, 단, 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드에서의 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 천연 아미노산에 의한 것일 수 있고, 추가적으로 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 것이다.

[0043] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아세틸기, 아미노옥시기, 하이드라진기, 하이드라지드기, 세미카바지드기, 아지드기, 또는 알킨기를 포함한다.

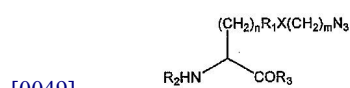
[0044] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하기 구조를 갖는다:



[0046] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬 또는 치환된 아릴이며; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이며; R₄는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다.

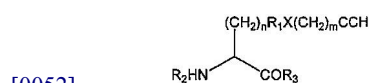
[0047] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 아미노옥시기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하이드라지드기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하이드라진기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 세미카바지드기를 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하기 구조를 갖는다:



[0050] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나, 존재하지 않고; m은 0~10이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다.

[0051] 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 알킨기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하기 구조를 갖는다:



[0053] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이며; X는 O, N, S이거나, 존재

하지 않고; m은 0~10이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다.

- [0054] 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩티드는 FGF-21 폴리펩티드 효현제, 부분 효현제, 길항제, 부분 길항제, 또는 역 효현제(inverse agonist)이다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드 효현제, 부분 효현제, 길항제, 부분 길항제, 또는 역 효현제는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드 효현제, 부분 효현제, 길항제, 부분 길항제, 또는 역 효현제는 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 하나 이상의 번역 후 변형, 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자를 포함한다.
- [0055] 본 발명은 또한 엄격한 조건하에 서열 번호 8~14에 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 엄격한 조건하에 서열 번호 8~14에 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산으로서, 상기 폴리뉴클레오티드가 하나 이상의 선택터 코돈을 포함하는 것인 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 서열 번호 1~7에 제시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 갖는 서열 번호 1~7에 제시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 당업자에게는 다수의 다양한 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 임의의 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것이 자명하다.
- [0056] 일부 실시형태에서, 상기 선택터 코돈은 앰버(amber) 코돈, 오크(ochre) 코돈, 오팔(opal) 코돈, 특이(unique) 코돈, 희귀(rare) 코돈, 5 염기 코돈 및 4 염기 코돈으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0057] 본 발명은 또한 수용성 중합체에 연결된 FGF-21 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단리된 FGF-21 폴리펩티드를, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 부분을 포함하는 수용성 중합체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드로 도입된 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은, 20종의 일반 아미노산 중 어느 것에 대해서도 비반응성이었던 수용성 중합체에 대해 반응성을 나타낸다. 일부 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드로 도입된 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20종의 일반 아미노산 중 어느 것에 대해서도 비반응성이었던 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자에 대해 반응성을 나타낸다.
- [0058] 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체에 연결된 FGF-21 폴리펩티드는, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조한다. 일부 실시형태에서, 상기 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드 기는 아미드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.
- [0059] 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체에 연결된 FGF-21 폴리펩티드는, 카보닐기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드와 반응시킴으로써 제조한다.
- [0060] 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체에 연결된 FGF-21 폴리펩티드는, 알킨 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 아지드 부분을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조한다. 일부 실시형태에서, 상기 아지드 또는 알킨 기는 아미드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체에 연결된 FGF-21 폴리펩티드는, 아지드 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 알킨 부분을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조한다. 일부 실시형태에서, 상기 아지드 또는 알킨 기는 아미드 결합을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분자량이 약 0.1 kDa~약 100 kDa이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분자량이 0.1 kDa~50 kDa이다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 중합체이다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지는 분자량이 1 kDa~100 kDa, 또는 1 kDa~50 kDa이다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드에 연결된 수용성 중합체는 폴리알킬렌 글리콜 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진기, 세미카바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카보닐 부분을 포함하고, 상기 수용성 중합체는 아미노옥시, 하이드라지드, 하이드라진, 또는 세미카바지드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상

기 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 알킨 부분을 포함하고, 상기 수용성 중합체는 아지드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드 부분을 포함하고, 상기 수용성 중합체는 알킨 부분을 포함한다.

[0065] 본 발명은 또한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다.

[0066] 본 발명은 또한 셀렉터 코돈을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 FGF-21 폴리펩티드로 치환하여 삽입하기 위한 오르토고날(orthogonal) RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함한다.

[0067] 본 발명은 또한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은, FGF-21 폴리펩티드가 발현될 수 있게 하는 조건하에, FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들, 오르토고날 RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함하는 세포를 배양하는 단계; 및 상기 세포 및/또는 배양 배지로부터 상기 FGF-21 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함한다.

[0068] 본 발명은 또한 FGF-21 폴리펩티드의 치료 반감기, 혈청 반감기 또는 순환 시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 FGF-21 폴리펩티드의 면역원성을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 천연 FGF-21 폴리펩티드의 임의의 하나 이상의 아미노산을 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하는 단계 및/또는 상기 FGF-21 폴리펩티드를 링커, 중합체, 수용성 중합체, 또는 생물학적 활성 분자에 연결하는 단계를 포함한다.

[0069] 본 발명은 또한 치료를 요하는 피험체를 유효량의 본 발명 FGF-21 분자로 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 치료적 유효량으로 상기 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다.

[0070] 본 발명은 또한 서열 번호 1~7에 제시된 서열 또는 임의의 다른 FGF-21 폴리펩티드 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공하는데, 단, 하나 이상의 아미노산은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 본 발명은 또한 서열 번호 1, 2, 4 및 5에 제시된 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진기, 세미카바지드기, 아지드기, 또는 알킨기를 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 약학적으로 허용되는 담체 및 서열 번호 1~7에 제시된 서열 또는 임의의 다른 FGF-21 폴리펩티드 서열을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공하는데, 여기서 하나 이상의 아미노산은 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 치환된다. 본 발명은 또한 약학적으로 허용되는 담체 및 서열 번호 1~7에 제시된 서열을 포함하는 FGF 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 사카라이드 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체는 사카라이드 부분을 통해 폴리펩티드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자는 사카라이드 부분을 통해 상기 FGF-21 폴리펩티드에 연결된다.

[0072] 본 발명은 또한 FGF-21 폴리펩티드의 하나의 아미노산에 대한 공유 결합에 의해 연결된 수용성 중합체를 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 부분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 수용성 중합체에 공유 결합된 아미노산은 폴리펩티드 내에 존재하는 비천연적으로 코딩된 아미노산이다.

[0073] 본 발명은 하나 이상의 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자는 상기 폴리펩티드에 리보솜에 의해 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통해 상기 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시형태에서, 상기 폴리펩티드는 단일PEG화된다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착된 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 제공하는데, 여기서 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 폴리펩티드의 소정의 부위에 리보솜에 의해 도입된다.

[0074] 본 발명의 범위 내에는 FGF-21 코딩 영역에 연결된 FGF-21 리더 또는 신호 서열뿐만 아니라 FGF-21 코딩 영역에

연결된 이중성 신호 서열도 포함된다. 선택된 이중성 리더 또는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 것, 예를 들어 숙주 분비 시스템에 의해 분비되고 경우에 따라 신호 펩티다제에 의해 절단되는 것이어야 한다. 본 발명의 리더 서열은 서열 번호 3 및 서열 번호 6으로부터의 3 루신 리더(아미노산 1~28번 위치), 서열 번호 4 및 서열 번호 7로부터의 2 루신 리더(아미노산 1~27번 위치), 서열 번호 2로부터의 His 태그(아미노산 1~10번 위치), 서열 번호 39, 서열 번호 40, 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44 중에서 선택될 수 있다. 질환 또는 질병을 본 발명의 FGF-21로 치료하는 방법은 신호 또는 리더 펩티드가 있거나 없는 FGF-21을 사용한 치료를 포함하는 것으로 한다.

[0075] 본 발명은 또한 지방 세포에서의 글루코스 흡수 증가를 유도하는 방법으로서, 상기 세포에 글루코스 흡수 증가를 유도하는 데 유효한 양으로 FGF-21을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 상기 글루코스 흡수 증가는 더 빠르고 더 효율적인 글루코스 이용에 의해 에너지 소비 증가를 유발할 수 있다.

[0076] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 PEG를 포함하나 이에 한정되지 않는 분자에 접합시키는 것은, 비천연 아미노산에의 접합에 이용되는 독특한 화학 반응으로 인해 실질적으로 정제된 FGF-21을 제공한다. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21을 PEG와 같은 다른 분자에 접합시키는 것은, 실질적으로 순수한 FGF-21을 제공하기 위해, 접합 단계 전 또는 후에 수행되는 다른 정제 기법과 함께 수행할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0077] 정의

[0078] 본 발명은 본 명세서에 기재된 특정한 방법, 프로토콜, 세포주, 구성체 및 시약에 한정되지 않고 변경될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하기 위한 것이지만 본 발명의 범위를 한정하려는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구의 범위에 의해서만 한정되는 것으로 이해되어야 한다.

[0079] 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에서 사용될 때, 단수 형태의 표현은, 그 문맥이 명백히 달리 나타내지 않는다면, 복수 형태의 표현도 포함한다. 따라서, 예를 들어 "FGF-21" 또는 "FGF-21 폴리펩티드"라고 하는 것은 이러한 단백질 하나 이상을 지칭하는 것이며, 당업자에게 알려진 그 균등물도 포함한다.

[0080] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 갖는 자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 어떠한 방법, 장치 및 재료도 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 재료를 이하에 기재하였다.

[0081] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물 및 특허는, 예를 들어 본 명세서에서 기술된 발명과 관련하여 이용될 수 있는, 간행물에 기재된 구성 및 방법을 설명하고 개시하기 위한 목적으로 참고 문헌으로서 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에서 언급된 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 그 개시내용만이 제공된다. 본 명세서에서 어떠한 것도 본 발명자들이 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 이러한 개시내용을 예상할 자격이 없음을 인정한 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0082] "실질적으로 정제된"이란 표현은, FGF-21 폴리펩티드가, 천연의 환경에, 즉, 천연 세포, 또는 재조합에 의해 제조된 FGF-21 폴리펩티드의 경우 숙주 세포에 존재하는 단백질에 일반적으로 동반되거나 이와 상호작용하는 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 포함하지 않을 수 있음을 말한다. 세포 물질을 실질적으로 포함하지 않을 수 있는 FGF-21 폴리펩티드는 (건조 중량을 기준으로) 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 오염 단백질을 함유하는 단백질 제제를 포함한다. FGF-21 폴리펩티드 또는 그 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 제조될 경우, 그 단백질은 세포의 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. FGF-21 폴리펩티드 또는 그 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 제조될 경우, 그 단백질은 세포의 건조 중량을 기준으로 약 5 g/L, 약 4 g/L, 약 3 g/L, 약 2 g/L, 약 1 g/L, 약 750 mg/L, 약 500 mg/L, 약 250 mg/L, 약 100 mg/L, 약 50 mg/L, 약 10 mg/L 또는 약 1 mg/L 또는 그 미만으로 배양 배지 중에 존재할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 "실질적으로 정제된" FGF-21 폴리펩티드는 순도가, SDS-PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동 등과 같은 적절한 방법에 의해 측정시, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 특히, 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도, 더 특히, 약 90% 이상의 순도, 약 95% 이상의 순도, 약 99% 이

상의 순도, 또는 그 이상일 수 있다.

- [0083] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"란 삽입에 이용된 방법(예를 들어, 직접 흡수법, 형질도입법, f-교배(mating) 또는 재조합 숙주 세포를 생성하기 위한 당업계에 공지된 다른 방법)에 관계없이 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 말한다. 상기 외인성 폴리뉴클레오티드는 비통합(nonintegrated) 벡터(예를 들어, 플라스미드)로서 유지되거나, 또는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [0084] 본 명세서에서 사용되는 "배지"란 용어는 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵생물 숙주 세포, 포유동물 숙주 세포, CHO 세포, 원핵생물 숙주 세포, 이. 콜라이 또는 슈도모나스 숙주 세포를 포함하는 임의의 숙주 세포 및 세포 내용물을 유지하거나 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반고체 또는 경질의 지지체를 포함한다. 따라서, 이 용어는 증식 단계 전 또는 후의 배지를 비롯하여, 숙주 세포가 배양된 배지, 예를 들어 FGF-21 폴리펩티드가 분비된 배지를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한, 세포 내에서 FGF-21 폴리펩티드가 생성되고 숙주 세포가 용해 또는 파괴되어 상기 FGF-21 폴리펩티드를 방출하는 경우와 같이, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충액 또는 시약을 포함할 수 있다.
- [0085] 본 명세서에서 단백질 리폴딩과 관련하여 사용되는 "환원제"란 설프하이드릴기를 환원 상태로 유지하고 분자내 또는 분자간 디설파이드 결합을 환원시키는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적절한 환원제로는 디티오프레이트(DTT), 2-머캅토에탄올, 디티오에리트ريت, 시스테인, 시스테인(2-아미노에탄티올) 및 환원된 글루타티온을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 당업자에게는 다종 다양한 환원제가 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합하다는 것이 자명하다.
- [0086] 본 명세서에서 단백질 리폴딩과 관련하여 사용되는 "산화제"란 산화되는 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적절한 산화제로는 산화된 글루타티온, 시스틴, 시스테인, 산화된 디티오프레이트, 산화된 에리트레이트 및 산소를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 당업자에게는 다종 다양한 산화제가 본 발명의 방법에 사용하기에 적합하다는 것이 자명할 것이다.
- [0087] "당뇨병 치료제"란 용어는 본 명세서에 기재된 임의의 병증, 질병 또는 합병증을 비롯하여 임의의 글루코스 대사 질환 또는 그 합병증을 치료, 예방 또는 다른 방식으로 그 중증도를 저감하는 데 유용한 임의의 약물을 의미한다. 당뇨병 치료제로는 인슐린, 티아졸리딘온, 설프닐요소, 벤조산 유도체, α-글루코시다제 억제제 등을 포함한다. 본 발명 조성물의 일부가 될 수 있는 당뇨병 치료제의 다른 일반 부류(정의된 용어는 따옴표로 표시함)로는 미국 약전(official United States Pharmacopoeia) 또는 국가 공인 처방서(official National Formulary)(또는 이것의 임의의 증보)에서 인정하는 "약품(drug article)"; 미국 법률 21편(Title 21 of the United States Code)에서 사용되는 용어로서 미국 FDA에 의해 승인된 "신약" 및 "동물 신약"; 미국 또는 해외의 정부 기관의 승인을 요하는 임의의 약물("승인된 약물"); 21 U.S.C. § 355(a)에 따르면 규제 승인을 얻을 필요가 있는 임의의 약물("규제 승인 약물"); 21 U.S.C. § 379(g) 하에 인체 약물 신청이 이루어졌거나 진행 중인 임의의 제제("인체 약물")를 포함한다(이러한 정의와 관련하여 언급된 모든 법령 코드는 본 출원의 최초 출원일 당시의 코드에 해당함). 다른 당뇨병 치료제도 본 명세서에 개시되어 있으며, 당업자에게 알려져 있다. 본 명세서에서 사용되는 본 발명의 당뇨병 치료용 조성물은 HbA1c 수치를 기저값으로부터 10% 이상의 차이로 감소시킬 수 있는 것이 바람직하고, 본 명세서에서 사용되는 본 발명의 당뇨병 치료용 조성물은 HbA1c 수치를 기저값으로부터 50% 이상의 차이로 감소시킬 수 있는 것이 더 특히 바람직하다. 당뇨병 치료제로는 인슐린의 분비 또는 활성을 추가로 증강시킬 수 있는 소분자 인슐린 작용 증강제, 타우린, 알파 리포산, 오디 추출물, 크롬, 글루타민, 에니코스테마 리토랄 블루메(*Encicostemma littorale Blume*), 전초(*Scoparia dulcis*), 타라곤(*Tarragon*)의 추출물, 천심련(*Andrographis paniculata*), 이소말트, 트레할로스 또는 D-만노스를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는 "변성 제제" 또는 "변성제"란 단백질의 가역적 언폴딩(unfolding)을 유발하는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 변성 제제 또는 변성제의 강도는 특정 변성 제제 또는 변성제의 특성과 농도 양자에 의해 결정된다. 적절한 변성 제제 또는 변성제는 카오토프(chao trope), 계면활성제, 유기 용매, 수혼화성 용매, 인지질, 또는 상기 제제 중 2종 이상의 조합일 수 있다. 적절한 카오토프로는 요소, 구아니딘 및 소듐 티오시아네이트를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 유용한 계면활성제로는 강력 계면활성제, 예컨대 소듐 도데실 설페이트, 또는 폴리옥시에틸렌 에테르(예를 들어, Tween 또는 Triton 계면활성제), 사코실, 약비이온성 계면활성제(예를 들어, 디기토닌), 약양이온성 계면활성제(예를 들어, N-2,3-(디올레일옥시)-프로필-N,N,N-트리메틸암모늄), 약이온성 계면활성제(예를 들어, 콜산나트륨 또는 데옥시콜산나트륨) 또는 양쪽이온성 계면활성제[설프obetain(Zwittergent), 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-1-프로판 설페이트(CHAPS) 및 3-

(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-2-하이드록시-1-프로판 설포네이트(CHAPSO)를 포함하나, 이들에 한정되지 않음]를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 아세토니트릴, 저급 알칸올(특히, 에탄올 또는 이소프로판올과 같은 C₂-C₄ 알칸올), 또는 저급 알칸디올(특히, 에틸렌-글리콜과 같은 C₂-C₄ 알칸디올)과 같은 유기, 수산화성 용매를 계면활성제로서 사용할 수 있다. 본 발명에 유용한 인지질은 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 및 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체 또는 변형체, 예컨대 디헥사노일포스파티딜콜린 또는 디헥타노일포스파티딜콜린과 같은 천연 인지질일 수 있다.

[0089] 본 명세서에서 사용되는 "리폴딩(refolding)"이란 디설파이드 결합을 포함하는 폴리펩티드를 부적절하게 폴딩된 또는 폴딩되지 않은 상태에서 디설파이드 결합에 대하여 본래의 또는 적절하게 폴딩된 입체구조(conformation)로 전환시키는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 나타낸다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 "코폴딩(cofolding)"이란 구체적으로 서로 상호작용하는 2개 이상의 폴리펩티드를 이용하여 폴딩되지 않은 또는 부적절하게 폴딩된 폴리펩티드를 본래의 적절히 폴딩된 폴리펩티드로 전환시키는 리폴딩 과정, 반응 또는 방법을 나타낸다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 "FGF-21 폴리펩티드," "섬유아세포 성장 인자 21" 또는 "FGF-21" 및 이들의 하이픈이 없는 형태의 용어들은 섬유아세포 성장 인자 21의 하나 이상의 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드 및 단백질뿐만 아니라, 그 생물학적 활성에 관계없이, 또한, 재조합법(cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 DNA로부터 제조되든지 또는 다른 형태의 핵산으로부터 제조되든지 간에), 시험관법, 핵산 분자의 미세주입, 합성법, 유전자이식법 및 유전자 불활성화법을 포함하나 이들에 한정되지 않는 그 합성 또는 제조 방법에 관계없이, 이들의 FGF-21 유사체, FGF-21 동형체, FGF-21 모방체, FGF-21 단편, 하이브리드 FGF-21 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 상동체, 글리코실화 패턴 변이체, 변이체, 스플라이스 변이체 및 뮤테인을 포함한다. "FGF-21 폴리펩티드" 및 "FGF-21"이란 용어는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 포함한다.

[0092] 천연 FGF-21의 다중 다양한 아미노산 위치에서의 치환이 개시된 바 있다. 치환은 약학적 안정성을 조절하고, 효현제 활성을 증가시키고, 프로테아제 내성을 증가시키고, 폴리펩티드를 길항제로 전환시키는 것 등을 포함하나 이들에 한정되지 않으며, 이러한 치환을 갖는 FGF-21도 "FGF-21 폴리펩티드" 또는 "FGF-21"이라는 용어에 포함된다.

[0093] 리더 서열이 없는 FGF-21의 서열에 대해서는, 본원의 서열 번호 1, 서열 번호 2 및 서열 번호 5를 참조할 수 있다. 리더 서열이 있는 FGF-21의 서열에 대해서는 본원의 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 6 및 서열 번호 7을 참조할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 서열 번호 1~7, 또는 FGF-21 폴리펩티드의 임의의 다른 서열과 실질적으로 동일하다. FGF-21의 다수의 다형체가 확인된 바 있다. 미국 특허 출원 공개 제2001-0012628호 및 미국 특허 제6,716,626호에서는 같은 위치에서의 루신 또는 프롤린이 개시되었다. 미국 특허 제6,716,626호 및 미국 특허 출원 공개 제2004-0259780호에는 1개 아미노산(루신)이 다른 N 말단 리더 또는 신호 서열이 개시되어 있다. 돌연변이체를 비롯한 FGF-21 및 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 FGF-21 폴리펩티드를 발현시키고 정제하는 방법은 잘 알려져 있으며, 미국 특허 제6,716,626호; 미국 특허 출원 공개 제2005/0176631호, 제2005/0037457호, 제2004/0185494호, 제2004/0259780호, 제2002/0164713호 및 제2001/0012628호; WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463(모두 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함함)에 개시된 것들을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0094] "FGF-21 폴리펩티드"란 용어는 또한 천연 FGF-21의 약학적으로 허용되는 염 및 전구약물, 및 상기 염의 전구약물, 다형체, 수화물, 용매화물, 생물학적 활성 단편, 생물학적 활성 변이체 및 입체이성질체뿐만 아니라, 천연 FGF-21의 효현제, 모방체 및 길항제 변이체와 그 폴리펩티드 융합체를 포함한다. 아미노 말단, 카복실 말단 또는 이들 둘 다에 추가적인 아미노산을 포함하는 융합체 역시 "FGF-21 폴리펩티드"란 용어에 포함된다. 예시적인 융합으로는, 예를 들어 재조합 발현으로부터 생성된 리더 또는 신호 펩티드가 없는 FGF-21의 성숙 형태 또는 그 일부분의 N 말단에 메티오닌이 연결되는 메티오닐 FGF-21(메티오닌은 재조합 발현으로부터 생성된 FGF-21의 N 말단에 연결됨), (폴리-히스티딘 또는 친화성 에피토프를 포함하나 이들에 한정되지 않는) 정제를 목적으로 한 융합, 혈청 알부민 결합 펩티드와의 융합 및 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질과의 융합을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,750,373호는 개개의 해당 수용체 분자에 대하여 변경된 결합 특성을 갖는 신규한 단백질(예컨대 성장 호르몬 및 항체 단편 변이체)를 선택하는 방법에 관해 기술한다. 이 방법은 필라멘트형 과지 M13의 유전자 III 코트 단백질의 카복실 말단 도메인에 관심있는 단백질을 코딩하는 유전자를 융합시키는 단계를 포함한다. FGF-21 및 하나 이상의 다른 분자[각질세포 성장 인

자(KGF)를 포함하나 이에 한정되지 않음]를 포함하는 키메라 분자를 생성할 수 있다[Reich-Slotky, R. et al., J. Biol. Chem. 270:29813-29818 (1995)]. 이 키메라 분자는 FGF-21 분자 및 KGF 분자 중 하나 또는 둘 다의 특정 영역 또는 단편을 포함할 수 있다. 임의의 이같은 단편은, 표준 생화학적 방법에 의해, 또는 상기 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써, 그 단백질로부터 제조할 수 있다. FGF-21 또는 그 단편은 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 그 일부분을 포함하는 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 이러한 융합 구성체는 진핵 숙주 세포에서의 FGF-21 또는 그 단편의 발현을 증대시키는 데 적합하다. 예시적인 HSA 단백질로는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,766,883호 및 PCT 공개 공보 WO 97/24445에 개시된, N 말단 폴리펩티드(아미노산 1~369, 1~419, 1번 아미노산에서 출발하는 중간 길이)를 포함한다. 다른 키메라 폴리펩티드는 HSA 단백질의 C 말단 및 N 말단 각각에 부착되는 FGF-21 또는 그 단편을 갖는 HSA 단백질을 포함할 수 있다. 이러한 HSA 구성체는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,876,969호에 개시되어 있다. FGF-21의 포유동물 세포 발현에 관해서는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 2005/091944에 기재되어 있다.

[0095] 다양한 참고 문헌이 중합체 접합 또는 글리코실화에 의한 폴리펩티드의 변형에 관해 개시한다. "FGF-21 폴리펩티드"란 용어는 PEG와 같은 중합체에 접합된 폴리펩티드를 포함하며, 시스테인, 라이신, 또는 다른 잔기의 하나 이상의 추가적인 유도체화로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 FGF-21 폴리펩티드는, 링커 또는 중합체를 포함할 수 있거나(여기서 상기 링커 또는 중합체가 접합되는 아미노산은 본 발명에 따른 비천연 아미노산일 수 있음), 라이신 또는 시스테인에의 커플링과 같이 당업계에 공지된 기법을 이용하여 천연적으로 코딩된 아미노산에 접합시킬 수 있다.

[0096] FGF-21 및 다른 폴리펩티드의 중합체 접합에 대해서는, 예를 들어 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 2005/091944에 보고되었다. 미국 특허 제4,904,584호는 PEG화 라이신 제거 폴리펩티드를 개시하며, 이 폴리펩티드의 경우 하나 이상의 라이신 잔기가 결실되었거나 임의의 다른 아미노산 잔기로 치환되었다. WO 99/67291은 PEG에 의한 단백질의 접합 방법을 개시하는데, 이 경우 상기 단백질 상의 하나 이상의 아미노산 잔기는 결실되고 상기 단백질은 단백질에의 접합이 이루어지기에 충분한 조건하에 PEG와 접촉된다. WO 99/03887은 성장 호르몬 수퍼패밀리에 속하는 PEG화 폴리펩티드 변이체를 개시하는데, 이 경우 시스테인 잔기가 이 폴리펩티드의 특정 영역에 위치하는 비필수 아미노산 잔기로 치환되었다. WO 00/26354는 상응하는 모폴리펩티드에 비해 알레르기 유발성이 감소된, 하나 이상의 추가적인 글리코실화 부위를 포함하는 글리코실화 폴리펩티드의 제조 방법을 개시한다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,218,092호는 본래의 폴리펩티드에 비해 하나 이상의 추가적인 탄수화물쇄가 도입되도록 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 다른 폴리펩티드를 변형시키는 것에 관해 개시한다.

[0097] "FGF-21 폴리펩티드"란 용어는 또한 임의의 아미노산 위치에서 글리코실화된 폴리펩티드, 이 폴리펩티드의 N 결함 또는 O 결함 글리코실화 형태를 포함하나 이들에 한정되지 않는 글리코실화된 FGF-21을 포함한다. 하나의 뉴클레오티드 변화를 포함하는 변이체 역시 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성 변이체로서 간주된다. 또한, 스플라이스 변이체 역시 포함된다. "FGF-21 폴리펩티드"란 용어는 또한, 화학적 방법에 의해 연결되거나 융합 단백질로서 발현된, 임의의 하나 이상의 FGF-21 폴리펩티드 또는 임의의 다른 폴리펩티드, 단백질, 탄수화물, 중합체, 소분자, 링커, 리간드, 또는 임의의 유형의 다른 생물학적 활성 분자의 이중이량체, 동종이량체, 이종다량체, 또는 동종다량체뿐만 아니라, 예를 들어 생물학적 활성은 유지한 채로 특정 결실 또는 다른 변형을 포함하는 폴리펩티드 유사체를 포함한다.

[0098] 본 명세서에 기재된 FGF-21의 아미노산 위치를 말할 때는 모두, 달리 명시하지 않는다면, 서열 번호 1에서의 위치를 기준으로 한 것이다(즉, 비교가 서열 번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 다른 FGF-21 서열을 기준으로 이루어졌다고 말할 경우). 예를 들어, 서열 번호 1의 77번 위치의 아미노산은 아르기닌이고, 상응하는 아르기닌은 서열 번호 2의 87번 위치에 위치한다. 당업자라면 서열 번호 1의 위치에 상응하는 아미노산 위치를 서열 번호 2, 3, 4, 5, 6 및 7과 같은 임의의 다른 FGF-21 분자에서 쉽게 확인할 수 있다는 것을 알 것이다. 당업자라면 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 임의의 다른 FGF-21 서열의 위치에 상응하는 아미노산 위치를 FGF-21 융합체, 변이체, 단편 등과 같은 임의의 다른 FGF-21 분자에서 쉽게 확인할 수 있다는 것을 알 것이다. 예를 들어, BLAST와 같은 서열 정렬 프로그램을 이용하여 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 다른 FGF-21 서열에서의 위치에 상응하는 단백질 내 특정 위치를 정렬하고 확인할 수 있다. 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 다른 FGF-21 서열과 관련하여 본 명세서에 기재된 치환, 결실 또는 부가는 또한, 본 명세서에 기재되어 있거나 당업계에 공지된 FGF-21 융합체, 변이체, 단편 등에 있어서의 상응하는 위치에서의 치환, 결실 또는 부가를 의미하기도 하며, 본 발명에 명백히 포함된다.

[0099] "FGF-21 폴리펩티드" 또는 "FGF-21"이란 용어는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 FGF-21

폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 하나 이상의 비천연 아미노산 변형과 함께 하나 이상의 천연 아미노산을 갖는 변형으로 이루어질 수 있다. 천연 FGF-21 폴리펩티드 내의 다중 다양한 아미노산 위치에 있어서의 대표적인 치환으로서, 약학적 안정성을 조절하는 치환, 상기 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성 중 하나 이상을 조절하는 치환(예컨대, 효연제 활성을 증가시키는 치환을 포함하나 이에 한정되지 않음), 상기 폴리펩티드의 용해도를 증가시키는 치환, 프로테아제 감수성을 감소시키는 치환, 상기 폴리펩티드를 길항제로 전환시키는 치환 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 치환들이 개시되었으며, 이들은 "FGF-21 폴리펩티드"란 용어에 포함된다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 길항제는 FGF-21 분자의 수용체 결합 영역에 존재하는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0100] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 부가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조절할 수 있다. 예를 들어, 상기 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 대한 친화성을 조절하거나, 순환 반감기를 조절하거나, 치료 반감기를 조절하거나, 상기 폴리펩티드의 안정성을 조절하거나, 프로테아제에 의한 절단을 조절하거나, 용량을 조절하거나, 방출 또는 생체이용률을 조절하거나, 정제를 용이하게 하거나, 또는 특정 투여 경로를 개선 또는 변경할 수 있다. 마찬가지로, FGF-21 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체 결합 도메인(FLAG 또는 폴리-His를 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 다른 친화성에 기초한 서열(FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 폴리펩티드의 검출(GFP를 포함하나 이에 한정되지 않음), 정제 또는 다른 특성을 개선시키는 연결된 분자(바이오틴을 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함할 수 있다.

[0101] "FGF-21 폴리펩티드"란 용어는 또한, 동일하거나 상이한 비천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄, 천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄에 비천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄를 통해 직접적으로 연결되거나 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 및 이종다량체를 포함한다. 예시적인 링커로는 작은 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리테트라하이드로퓨란, 또는 다양한 길이의 폴리펩티드를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0102] "비천연적으로 코딩된 아미노산"은 20종의 일반 아미노산 중 하나, 파이로라이신(pyrrolysine) 또는 셀레노시스테인(selenocysteine)이 아닌 아미노산을 말한다. "비천연적으로 코딩된 아미노산"이란 용어와 동의어로 사용될 수 있는 다른 용어로는 "비천연 아미노산", "비자연 발생 아미노산" 등이 있다. "비천연적으로 코딩된 아미노산"이란 용어는 또한, 천연적으로 코딩된 아미노산(20종의 일반 아미노산 또는 파이로라이신 및 셀레노시스테인을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)의 변형(예를 들어, 번역 후 변형)에 의해 발생되지만 그 자체가 번역 복합체(translation complex)에 의해 성장하는 폴리펩티드 쇄 내로 자연적으로 도입되는 것은 아닌 아미노산을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 이같이 비천연적으로 코딩된 아미노산의 예로는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포타이로신을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0103] "아미노 말단 변형기"란 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 유사하게, "카복시 말단 변형기"란 폴리펩티드의 카복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 말한다. 말단 변형기로는 다양한 수용성 중합체, 펩티드 또는 단백질(예컨대 혈청 알부민), 또는 펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 다른 부분들을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0104] "작용기", "활성 부분", "활성화 기", "이탈기", "반응성 부위", "화학적 반응기" 및 "화학적 반응성 부분"이란 용어들은 당업계에서 사용되는 것들로서, 본 명세서에서는 분자의 정의 가능한 별개의 부분 또는 단위를 가르킨다. 상기 용어들은 화학 분야에서 어느 정도 동의어로 사용되며, 몇 가지 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와 반응하는 분자의 일부분을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

[0105] 본 명세서에서 "결합(linkage)" 또는 "링커(linker)"란 용어는 일반적으로 화학 반응의 결과로서 형성되며 전형적으로 공유 결합인 기 또는 결합(bond)을 나타내기 위해 사용된다. 가수분해에 안정한 결합은, 결합이 수중에서 실질적으로 안정하고 유용한 pH 값에서(생리학적 조건을 포함하나 이에 한정되지 않음) 장기간 동안, 가능한 경우 심지어 무기한 동안 물과 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 가수분해에 불안정한 또는 가수분해에 의해 분해 가능한 결합은, 결합이 수중에서 또는 수용액 중에서(예를 들어, 혈액을 포함함) 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 효소에 불안정한 또는 효소에 의해 분해 가능한 결합은, 결합이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 당업계에서 이해되고 있는 바와 같이, PEG 및 관련 중합체는 중합체 골격 내에, 또는 중합체 골격과 중합체 분자의 말단 작용기들 중 하나 이상의 말단 작용기 사이의 링커기 내에 분해 가능한 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성제 상의 알코올기와 PEG 카복실산 또는 활성화된 PEG 카복실산과의

반응에 의해 형성된 에스테르 결합은 생리학적 조건하에서 일반적으로 가수분해되어 상기 생물학적 활성제를 방출시킨다. 가수분해에 의해 분해 가능한 다른 결합으로는 카보네이트 결합; 아민과 알데히드의 반응으로부터 생성된 이민 결합; 알코올과 포스페이트기의 반응에 의해 형성된 포스페이트 에스테르 결합; 하이드라지드와 알데히드의 반응 생성물인 하이드라존 결합; 알데히드와 알코올의 반응 생성물인 아세탈 결합; 포르메이트와 알코올의 반응 생성물인 오르토에스테르 결합; 아민기(PEG와 같은 중합체의 말단에 존재하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음)와 펩티드의 카복실기에 의해 형성된 펩티드 결합; 및 포스포아미다이트기(중합체의 말단에 존재하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음)와 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록실기에 의해 형성된 올리고뉴클레오타이드 결합을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0106] 본 명세서에서 사용될 때 "생물학적 활성 분자", "생물학적 활성 부분" 또는 "생물학적 활성제"란 용어는 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포존(transposon), 프리온, 곤충, 진균, 식물, 동물 및 인간을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유기체에 관한 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 줄 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 특히, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 생물학적 활성 분자는 인간 또는 다른 동물에서 질환을 진단하거나, 치유하거나, 완화하거나, 치료하거나, 예방하기 위한, 또는 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 복지를 향상시키기 위한 임의의 물질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 생물학적 활성 분자의 예로는 펩티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 백신, 면역원, 경질 약물, 연질 약물, 탄수화물, 무기 원자 또는 분자, 염료, 지질, 뉴클레오시드, 방사성 핵종(radionuclide), 올리고뉴클레오타이드, 변성독소, 독소, 원핵 및 진핵 세포, 바이러스, 플라사카라이드, 바이러스로부터 얻어지거나 이로부터 유래되는 핵산 및 그 일부분, 박테리아, 곤충, 동물 또는 임의의 다른 세포 또는 세포 유형, 리포솜, 마이크로입자 및 미셀을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 생물학적 활성제의 부류에는 약물, 전구약물, 방사성 핵종, 조영제(imaging agent), 중합체, 항생제, 살진균제, 항바이러스제, 항염증제, 항종양제, 심혈관계, 항불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제, 미생물 유래 독소 등이 포함되나, 이들에 한정되지 않는다.

[0107] "이작용성 중합체"는 다른 부분(아미노산 측기를 포함하나 이에 한정되지 않음)과 특이적으로 반응하여 공유 결합 또는 비공유 결합을 형성할 수 있는 2개의 별개의 작용기를 포함하는 중합체를 말한다. 특정 생물학적 활성 성분 상의 기와 반응하는 1개의 작용기와 제2 생물학적 성분 상의 기와 반응하는 다른 기를 갖는 이작용성 링커를 이용함으로써, 제1 생물학적 활성 성분, 이작용성 링커 및 제2 생물학적 활성 성분을 포함하는 접합체를 형성할 수 있다. 각종 화합물을 펩티드에 부착시키기 위한 다수의 방법 및 링커 분자가 알려져 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 유럽 특허 공개 제188,256호; 미국 특허 제4,671,958호; 제4,659,839호; 제4,414,148호; 제4,699,784호; 제4,680,338호; 및 제4,569,789호를 참조할 수 있다. "다작용성 중합체"는 다른 부분(아미노산 측기를 포함하나 이에 한정되지 않음)과 특이적으로 반응하여 공유 결합 또는 비공유 결합을 형성할 수 있는 2개 이상의 별개의 작용기를 포함하는 중합체를 말한다. 이작용성 중합체 또는 다작용성 중합체는 임의의 원하는 길이 또는 분자량을 가질 수 있고 FGF-21에 연결된 하나 이상의 분자와 FGF-21의 수용체 또는 FGF-21 사이에 특정한 소정의 공간 또는 입체구조를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0108] 치환기가 왼쪽에서 오른쪽으로 기재되는 관용 화학식으로 특징되는 경우, 이들은 구조를 오른쪽에서 왼쪽으로 기재하는 것으로부터 비롯되는 화학적으로 동일한 치환기도 동등하게 포함하는데, 예를 들어, 구조식 $-CH_2O-$ 는 구조식 $-OCH_2-$ 와 동등하다.

[0109] "치환기"란 용어는 "비간섭 치환기"를 포함하나 이에 한정되지 않는다. "비간섭 치환기"는 안정한 화합물이 형성되게 하는 기를 말한다. 적절한 비간섭 치환기 또는 라디칼로는 할로, C_1-C_{10} 알킬, C_2-C_{10} 알케닐, C_2-C_{10} 알키닐, C_1-C_{10} 알콕시, C_1-C_{12} 아랄킬, C_1-C_{12} 알카릴, C_3-C_{12} 시클로알킬, C_3-C_{12} 시클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루오일, 크실레닐, 비페닐, C_2-C_{12} 알콕시알킬, C_2-C_{12} 알콕시아릴, C_7-C_{12} 아릴옥시알킬, C_7-C_{12} 옥시아릴, C_1-C_6 알킬설퍼닐, C_1-C_{10} 알킬설폰닐, $-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$ (여기서, m 은 1~8임), 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오로알킬, 복소환 라디칼, 치환된 복소환 라디칼, 니트로알킬, $-NO_2$, $-CN$, $-NRC(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, C_2-C_{10} 알킬 티오알킬, $-C(O)O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-OH$, $-SO_2$, $=S$, $-COOH$, $-NR_2$, 카보닐, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})-CF_3$, $-C(O)-CF_3$, $-C(O)NR_2$, $-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})-S-(C_6-C_{10} \text{ 아릴})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$ (여기서, m 은 각각 1~8임), $-C(O)NR_2$, $-C(S)NR_2$, $-SO_2NR_2$, $-NRC(O)NR_2$, $-NRC(S)NR_2$, 이들의 염 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 여기에서 사용된 각각의 R은 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아

릴 또는 치환된 아릴, 아랄킬, 또는 알카릴이다.

[0110] "할로겐"이란 용어는 불소, 염소, 요오드 및 브롬을 포함한다.

[0111] 그 자체로서 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 완전 포화, 단일 불포화 또는 다불포화이어도 좋은 직쇄, 분지쇄 또는 환형 탄화수소 라디칼 또는 이들의 조합을 의미하며, 표시된 수의 탄소 원자를 갖는(즉, C_1 - C_{10} 은 1~10개의 탄소를 의미함) 2가 또는 다가 라디칼을 포함할 수 있다. 포화 탄화수소 라디칼의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 이들의 동족체 및 이성질체, 예를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등과 같은 기를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 불포화 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 알킬기이다. 불포화 알킬기의 예로는 비닐, 2-프로펜일, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1-프로피닐 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 동족체 및 이성질체를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 또한, "알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 이하에서 보다 상세히 정의하는 알킬의 유도체(예컨대 "헤테로알킬")을 포함하는 의미이다. 탄화수소기에 한정되는 알킬기는 "호모알킬"이라 한다.

[0112] 그 자체로서 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "알킬렌"이란 용어는, 구조식 $-CH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 의 기를 예로 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는, 알칸으로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하며, 이하에서 "헤테로알킬렌"으로서 지칭되는 기를 추가로 포함한다. 일반적으로, 알킬 (또는 알킬렌) 기는 1~24개의 탄소 원자를 가지며, 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 기가 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 특정 실시형태이다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 보다 짧은 쇠의 알킬 또는 알킬렌 기이다.

[0113] "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오(또는 티오알콕시)"란 용어는 통상의 의미로 사용되며, 각각 산소 원자, 아미노기 또는 황 원자를 통해 분자의 나머지 부분에 부착된 알킬기를 말한다.

[0114] 그 자체로서 또는 다른 용어와 함께 사용되는 "헤테로알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, O, N, Si 및 S로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 헤테로원자와 언급된 수의 탄소 원자로 이루어진, 직쇄 또는 분지쇄 또는 환형 탄화수소 라디칼 또는 이들의 조합을 의미하며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 경우에 따라 산화될 수 있고 질소 헤테로원자는 경우에 따라 4차화될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N, S 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치, 또는 알킬기가 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치에 위치할 수 있다. 예로는 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 및 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 예를 들어, $-CH_2-NH-OCH_3$ 및 $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 와 같이 최대 2개의 헤테로원자가 연속될 수 있다. 마찬가지로, "헤테로알킬렌"이란 용어는 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 로 예시되는 바와 같은(단, 이들에 한정되지 않음) 헤테로알킬로부터 유도된 2가 라디칼을 의미한다. 헤테로알킬렌기의 경우, 동일하거나 상이한 헤테로원자가 쇠의 말단 중 한쪽 또는 양쪽에 존재할 수도 있다(알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 아미노옥시 알킬렌 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음). 또한, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연결기의 배향은 연결기의 화학식이 기재된 방향에 내포되어 있지 않다. 예를 들어, 화학식 $-C(O)_2R'$ 은 $-C(O)_2R'$ 과 $-R'C(O)_2-$ 를 둘 다 나타낸다.

[0115] 그 자체로서 또는 다른 용어와 함께 사용되는 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 환형 버전을 나타낸다. 따라서, 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬은 포화, 부분 불포화 및 완전 불포화 고리 결합을 포함한다. 또한, 헤테로시클로알킬의 경우, 헤테로원자가, 복소환이 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치를 차지할 수 있다. 시클로알킬의 예로는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 헤테로시클로알킬의 예로는 1-(1,2,5,6-테트라하이드로피리디닐), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라하이드로푸란-2-일, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 상기 용어는 2환 및 3환 고리 구조를 포함한다. 유사하게, 그 자체로서 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "헤테로시클로알킬렌"이란 용어는 헤테로시클로알킬로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하고, 그 자체로서 또는 다른 치환기의 일부로서 사용되는 "시클로알킬렌"이란 용어는 시클로알킬로부터 유도된 2가 라디칼을 의미한다.

- [0116] 본 명세서에서 사용되는 "수용성 중합체"란 용어는 수성 용매 중에서 용해될 수 있는 임의의 중합체를 말한다. FGF-21 폴리펩티드에 대한 수용성 중합체의 결합은, 비변형 형태에 비해 증가 또는 조절된 혈청 반감기, 또는 증가 또는 조절된 치료 반감기, 조절된 면역원성, 응집 및 다량체 형성과 같이 조절된 물리적 회합 특성, 변경된 수용체 결합, 하나 이상의 결합 파트너에 대한 변경된 결합 및 변경된 수용체 이량체화 또는 다량체화를 유발할 수 있다. 수용성 중합체는 그 자신의 생물학적 활성을 보유할 수도 있고 보유하지 않을 수도 있으며, FGF-21을, 하나 이상의 FGF-21 폴리펩티드 또는 하나 이상의 생물학적 활성 분자를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 물질에 부착시키기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적절한 중합체로는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 모노 C₁-C₁₀ 알콕시 또는 이의 아릴옥시 유도체(본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허 제5,252,714호에 기재되어 있음), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말레산 무수물, N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아미드, 텍스트란, 텍스트란 유도체(텍스트란 설페이트를 포함함), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 글리칸, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체(메틸셀룰로스 및 카복시메틸 셀룰로스를 포함하나, 이들에 한정되지 않음), 전분 및 전분 유도체, 폴리펩티드, 폴리알킬렌 글리콜 및 그 유도체, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 그 유도체, 폴리비닐 에틸 에테르, 및 α - β -폴리[(2-하이드록시에틸)-DL-아스파르트아미드 등, 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 수용성 중합체의 예로는 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0117] 본 명세서에서 사용될 때 "폴리알킬렌 글리콜" 또는 "폴리(알켄 글리콜)"이란 용어는 폴리에틸렌 글리콜(폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜 및 이들의 유도체를 말한다. "폴리알킬렌 글리콜"이란 용어는 평균 분자량이 0.1 kDa~100 kDa인 선형 및 분지형 중합체를 둘 다 포함한다. 다른 예시적 실시형태는, 예를 들어 Shearwater Corporation의 카탈로그["Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)]와 같은 상업적 공급업체의 카탈로그에 기재되어 있다.
- [0118] 달리 명시하지 않는다면, "아릴"이란 용어는 서로 접합되거나 공유 결합되는 단일 고리 또는 다중 고리(1~3개의 고리를 포함하나 이에 한정되지 않음)일 수 있는 다불포화, 방향족, 탄화수소 치환기를 의미한다. "헤테로아릴"이란 용어는 N, O 및 S로부터 선택되는 1~4개의 헤테로원자를 함유하는 아릴기(또는 고리)를 지칭하며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 경우에 따라 산화되고, 상기 질소 원자(들)이 경우에 따라 4차화된다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 아릴기 및 헤테로아릴기의 비한정적인 예로는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴 및 6-퀴놀릴을 들 수 있다. 상기 아릴 및 헤테로아릴 고리계 각각에 대한 치환기는 후술하는 허용 가능한 치환기의 군에서 선택된다.
- [0119] 간결함을 위해, (아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬을 포함하나, 이들에 한정되지 않는) 다른 용어들과 함께 사용될 때 "아릴"이란 용어는 상기에 정의한 바와 같은 아릴 고리 및 헤테로아릴 고리를 둘 다 포함한다. 따라서, "아릴알킬"이란 용어는, 탄소 원자(메틸렌기를 포함하나, 이에 한정되지 않음)가, 예를 들어 산소 원자로 치환된 알킬기[페녹시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않음]를 포함하는 알킬기에 아릴기가 부착된 라디칼(벤질, 페닐, 피리딜메틸 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)을 포함하는 것이다.
- [0120] 상기 용어("알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴"을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)는 각각 표시된 라디칼의 치환 형태와 비치환 형태를 둘 다 포함한다. 각 유형의 라디칼에 대한 예시적인 치환기는 이하에 제시한다.
- [0121] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(중중 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐 및 헤테로시클로알케닐로 칭해지는 기를 포함함)에 대한 치환기는 -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'', -NR-C(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂[수의 범위는 0~(2m'+1)이고, 여기서 m'은 이러한 라디칼 내의 총 탄소 원자수임]로부터

선택되는 다양한 기 중 하나 이상일 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''는 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1~3개의 할로겐으로 치환된 아릴을 포함하나 이에 한정되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물이 1개보다 많은 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 독립적으로 선택되며, R', R'', R''' 및 R'''' 기도 이들 기가 1개보다 많이 존재할 경우, 마찬가지로 독립적으로 선택된다. R' 및 R''이 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 질소 원자와 함께 5원, 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R''은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 치환기 설명에서, 당업자라면 "알킬"이란 용어가 수소가 아닌 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예컨대 할로알킬(-CF₃ 및 -CH₂CF₃를 포함하나, 이들에 한정되지 않음) 및 아실(-C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 포함하는 것임을 이해할 것이다.

[0122] 상기 알킬 라디칼에 대해 기재된 치환기와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴 기에 대한 치환기는 달라지며, 할로젠, -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'', -NR-C(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, 플루오로(C₁-C₄)알콕시 및 플루오로(C₁-C₄)알킬[수의 범위는 0 내지 방향족 고리계 상의 열린 껍질 원자의 총수이고, 여기서 R', R'', R''' 및 R''''은 독립적으로 수소, 알킬, 헤테로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로부터 선택됨]로부터 선택되나, 이들에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 화합물이 1개보다 많은 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 독립적으로 선택되며, 각각의 R', R'', R''' 및 R'''' 기 역시 이들 기가 1개보다 많이 존재할 경우, 독립적으로 선택된다.

[0123] 본 명세서에서 사용될 때 "조절된 혈청 반감기"란 표현은 비변형 형태와 비교할 때 변형된 FGF-21의 순환 반감기에 양의(positive) 또는 음의(negative) 변화가 있음을 의미한다. 혈청 반감기는 FGF-21을 투여한 후 다양한 시점에서 혈액 시료를 채취하여 각 시료 중의 해당 분자의 농도를 측정함으로써 측정한다. 혈청 농도와 시간의 상관관계를 통해 혈청 반감기를 계산할 수 있다. 증가된 혈청 반감기는 약 2배 이상인 것이 바람직하지만, 예를 들어, 만족스러운 투여 계획이 가능하거나 독성 효과를 피할 수 있는 경우라면 더 작은 증가도 유용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가는 약 3배 이상, 약 5배 이상, 또는 약 10배 이상이다.

[0124] 본 명세서에서 사용되는 "조절된 치료 반감기"란 표현은 비변형 형태와 비교할 때 치료적 유효량의 FGF-21의 반감기에 양의 또는 음의 변화가 있음을 의미한다. 치료 반감기는 투여 후 다양한 시점에 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정한다. 증가된 치료 반감기는 바람직하게는 유리한 특정 투여 계획 또는 유리한 특정 총 투여량을 이용할 수 있게 하거나, 원치않는 효과를 피할 수 있게 한다. 일부 실시형태에서, 증가된 치료 반감기는 증가된 효능, 변형된 분자와 그 표적의 증가된 또는 감소된 결합, 프로테아제와 같은 효소에 의한 분자의 증가된 또는 감소된 분해, 또는 비변형 분자의 또 다른 파라미터 또는 작용 메커니즘의 증가 또는 감소, 또는 수용체 매개 분자 제거에 있어서의 증가 또는 감소로부터 비롯된다.

[0125] 핵산 또는 단백질에 적용될 때의 "단리된"이란 용어는 핵산 또는 단백질이 자연 상태에서 서로 회합되어 있는 세포내 성분들 중 적어도 일부를 포함하고 있지 않는 것, 또는 핵산 또는 단백질이 그 생체내 또는 시험관내 제조 농도보다 높은 수준으로 농축되었음을 의미한다. 이것은 균질한 상태일 수 있다. 단리된 물질은 건조 또는 반건조 상태이거나, 또는 수용액을 포함하나 이에 한정되지 않는 용액 중에 존재할 수 있다. 단리된 성분은 추가의 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약학 조성물의 성분일 수 있다. 순도 및 균질도는 일반적으로 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 포함하나 이에 한정되지 않는 분석 화학 기법을 이용하여 측정한다. 제제 중에 존재하는 주된 성분이 단백질인 경우 이 단백질을 실질적으로 정제되었다고 한다. 특히, 단리된 유전자는 이 유전자의 측면에 위치하고 관심있는 유전자가 아닌 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로부터 분리되어 있을 때 단리되었다고 한다. "정제된"이란 표현은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 사실상 하나의 밴드를 형성하는 것을 의미한다. 특히, 이것은 핵산 또는 단백질의 순도가 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 그 이상인 것을 의미할 수 있다.

[0126] "핵산"이란 용어는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드, 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 중합체를 말한다. 특별히 한정하지 않는다면, 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 천연 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 특별히 달리 한정하지 않는다면, 이 용어는 또한, PNA(펩티도핵산), 안티센스 기법에 사용되는 DNA의 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드

드 유사체를 지칭한다. 달리 명시하지 않는다면, 특정 핵산 서열은 또한, 이들의 보존적 변형 변이체(축퇴성 코돈 치환을 포함하나 이에 한정되지 않음) 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명시적으로 표시된 서열을 내포하고 있다. 특히, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3의 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성하는 것에 의해 이루어질 수 있다[Batzer et al., Nucleic Acids Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].

[0127] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이란 용어들은 아미노산 잔기들로 이루어진 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 즉, 폴리펩티드에 대한 설명은 펩티드의 설명과 단백질의 설명에 동일하게 적용되고, 그 반대도 마찬가지이다. 상기 용어들은 천연 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연적으로 코딩된 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본 명세서에서 사용될 때, 이 용어들은 전체 길이 단백질을 비롯한 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기들은 공유 펩티드 결합에 의해 연결되어 있다.

[0128] "아미노산"이란 용어는 천연 및 비천연 아미노산뿐만 아니라, 천연 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 말한다. 천연적으로 코딩된 아미노산은 20종의 일반 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린), 파이로라이신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 천연 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 예를 들어, 수소에 결합된 α -탄소, 카복실기, 아미노기 및 R 기를 갖는 화합물, 예컨대 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폰사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 말한다. 그러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 천연 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 아미노산이라고 하는 것은, 예를 들어, 천연 단백질 형성성 L-아미노산; D-아미노산, 화학적 변형 아미노산, 예컨대 아미노산 변이체 및 유도체; 천연 비단백질 형성성 아미노산, 예컨대 β -알라닌, 오르니틴 등; 및 아미노산의 특징인 것으로 당업계에 알려져 있는 특성을 갖는 화학적 합성 화합물을 포함한다. 비천연 아미노산의 예로는 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), 측쇄에 추가적인 메틸렌을 갖는 아미노산("호모" 아미노산), 및 측쇄의 카복실산 작용기가 설폰산기로 치환된 아미노산(예를 들어, 시스테인산)을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0129] 본 명세서에서 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에서 권장하는 널리 알려진 3 문자 기호 또는 1 문자 기호로 지칭될 수 있다. 뉴클레오타이드 역시 통상적으로 인정되는 1 문자 코드로 지칭될 수 있다.

[0130] "보존적 변형 변이체"는 아미노산 서열과 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정한 핵산 서열에 있어서, "보존적" 변형 변이체란 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 말하거나, 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우 실질적으로 동일한 서열을 말한다. 예를 들어, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여, 기능상 동일한 다수의 핵산이 임의의 소정의 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 지정된 모든 위치에서, 그 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않으면서 전술한 임의의 해당 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이가 보존적 변형 변이의 한 종류인 "침묵 변이(silent variation)"이다. 본 명세서에서 폴리펩티드를 코딩하는 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 가능한 모든 침묵 변이를 포함한다. 당업자라면 핵산 내의 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG와, 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 제외)은 변형되어 기능상 동일한 분자를 생성할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 기재된 각각의 서열에 내포되어 있다.

[0131] 아미노산 서열의 경우, 당업자라면, 코딩된 서열에 대해 단일 아미노산 또는 작은 비율(%)의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개개의 치환, 결실 또는 부가가, 그 변경이 아미노산의 결실, 아미노산의 부가 또는 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산의 치환으로 귀결될 경우, "보존적 변형 변이체"라는 것을 이해할 것이다. 기능상 유사한 아미노산을 제시한 보존적 치환 표가 당업자에게 알려져 있다. 이와 같은 보존적 변형 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 중간 동족체 및 대립유전자 변이체에 추가적인 것으로서 이들을 배제하지 않는다.

[0132] 기능상 유사한 아미노산을 제시한 보존적 치환 표는 당업자에게 알려져 있다하기 8개 군은 각각 서로 간에 보존적 치환인 아미노산들을 포함한다:

- [0133] 1) 알라닌(A), 글리신(G);
- [0134] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);
- [0135] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);
- [0136] 4) 아르기닌(R), 라이신(K);
- [0137] 5) 이소루신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V);
- [0138] 6) 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W);
- [0139] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및
- [0140] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)
- [0141] (예를 들어, 문헌[Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd Edition (December 1993))] 참조)
- [0142] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "동일성(%)"이란 용어는 동일한 2개 이상의 서열 또는 부분 서열(subsequence)을 말한다. "실질적으로 동일한" 서열이란, 서열이, 하기 서열 비교 알고리즘 (또는 당업자가 입수 가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 이용하거나 수동 정렬 및 시각적 조사로 측정할 경우, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 대하여 최대 상응도로 비교 및 정렬할 때 일정 비율(%)의 동일한(즉, 특정 영역에 대하여 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%의 동일성을 보이는) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 가질 경우를 지칭한다. 이 정의는 테스트 서열의 상보체에 적용되기도 한다. 동일성은 적어도 약 50개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이에 해당하는 영역, 또는 75~100개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이에 해당하는 영역, 또는 특정되지 않은 경우, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 전체 서열에 걸쳐 나타날 수 있다. 인간 이외의 종 유래의 동족체를 비롯하여 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 엄격한 하이브리드화 조건하에 라이브리리를, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그 단편을 갖는 표지된 프로브로 스크리닝하는 단계 및 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 전체 길이 cDNA 및 게놈 클론을 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다. 이러한 하이브리드화 기법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0143] 서열 비교를 위해, 일반적으로 한 서열이 기준 서열로서 사용되고, 이 기준 서열에 대해 테스트 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 경우, 테스트 서열 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 부분 서열 좌표가 지정되며, 필요에 따라, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용하거나, 대안의 파라미터를 지정할 수 있다. 그 후, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터를 기초로 기준 서열에 대한 테스트 서열의 서열 동일성(%)을 계산한다.
- [0144] 본 명세서에서 사용되는 "비교 윈도우"는 20~600개, 일반적으로 약 50개~약 200개, 더 일반적으로 약 100개~약 150개로 구성되는 군에서 선택되는 연속된 위치들의 수 중 어느 하나의 분절을 지칭하는 것을 포함하며, 이 경우, 두 서열을 최적으로 정렬한 후 동일한 수의 연속된 위치들을 갖는 기준 서열에 서열이 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 문헌[Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국부적 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444]의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘의 전산화된 실행(미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA), 또는 수동 정렬 및 시각적 조사(예를 들어, 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement))] 참조)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0145] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성(%)을 측정하기에 적합한 알고리즘의 일례로는 각각 문헌[Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402] 및 문헌[Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 기재되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있다. BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 인터넷으로(www.ncbi.nlm.nih.gov) 공개적으로 입수가 가능하다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 워드 길이(wordlength; W) 11, 기대값(E) 10, M = 5, N = -4 및 양쪽 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 워드 길이 3 및 기대값(E) 10, 및 BLOSUM62 점수 행렬(문헌[Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915] 참조), 정렬(B) 50, 기대값(E) 10, M = 5, N = -4 및 양쪽 가닥의 비교를 이용한다. BLAST 알고리즘은 일반적으로 턴 오

프턴(turned off) "낮은 복잡도(low complexity)" 필터를 사용하여 수행한다.

- [0146] BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 사이의 유사성을 통계적으로 분석한다(예를 들어, 문헌[Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매치(match)가 우연히 발생할 확률의 지표를 제공하는 최소 합계 확률(P(N))이다. 예를 들어, 기준 핵산에 대해 테스트 핵산을 비교할 때 최소 합계 확률이 약 0.2 미만, 또는 약 0.01 미만, 또는 약 0.001 미만일 경우, 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다.
- [0147] "~에 선택적으로(또는 특이적으로) 하이브리드화하는"이란 어구는 특정 뉴클레오타이드 서열이 복합 혼합물(전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 포함하나 이들에 한정되지 않음) 중에 존재할 경우, 엄격한 하이브리드화 조건하에 분자가 상기 특정 서열에만 결합하거나 이중체를 형성하거나 하이브리드화하는 것을 말한다.
- [0148] "엄격한 하이브리드화 조건"이란 어구는 당업계에 공지되어 있는 바와 같이 저이온 강도 및 고온 조건하에서의 DNA, RNA, PNA 서열, 또는 다른 핵산 모방체, 또는 이들의 조합의 하이브리드화를 말한다. 일반적으로, 엄격한 조건하에서는, 프로브가 복합 핵산 혼합물(전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 포함하나 이들에 한정되지 않음) 중의 표적 서열에 하이브리드화하지만, 복합 혼합물 중의 다른 서열에는 하이브리드화하지 않는다. 엄격한 조건은 서열 의존적이며 상이한 환경하에서는 상이하다. 더 긴 서열일수록 더 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드화한다. 핵산의 하이브리드화에 대한 포괄적인 지침은 문헌[Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]을 참조할 수 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 특정 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 열적 용점(T_m)보다 약 5~10℃ 더 낮도록 선택된다. 상기 T_m 은 (특정 이온 강도, pH 및 핵산 농도에서) 표적에 상보성인 프로브의 50%가 평형 상태로 표적 서열에 하이브리드화하는 온도이다(표적 서열이 과잉량 존재하기 때문에, T_m 에서 프로브의 50%는 평형 상태로 점유된다). 엄격한 조건은, pH 7.0~8.3에서, 염 농도가 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온 농도, 일반적으로 약 0.01~1.0 M의 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고 온도가 짧은 프로브(10~50개 뉴클레오타이드를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 대해서는 약 30℃ 이상, 긴 프로브(50개보다 긴 뉴클레오타이드를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 대해서는 60℃ 이상인 조건일 수 있다. 엄격한 조건은, 포름알데히드와 같은 불안정화제를 첨가하여 형성할 수도 있다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화를 위해서는, 양성 신호가 백그라운드 하이브리드화의 2배 이상, 경우에 따라 10배 이상일 수 있다. 대표적인 엄격한 하이브리드화 조건은 다음과 같을 수 있다: 50% 포름아미드, 5× SSC 및 1% SDS, 42℃에서 항온처리, 또는 5× SSC, 1% SDS, 65℃에서 항온처리, 65℃에서 0.2× SSC 및 0.1% SDS로 세척. 이러한 세척은 5분, 15분, 30분, 60분, 120분 또는 그 이상의 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0149] 본 명세서에서 사용되는 "진핵생물"이란 용어는 동물(포유동물, 곤충, 파충류, 조류 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음), 섬모충, 식물(외떡잎 식물, 쌍떡잎 식물 및 조류(藻類) 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음), 진균류, 효모, 편모충, 미포자충 및 원생생물 등을 비롯한 계통발생적 진핵생물(Eucarya) 영역에 속하는 유기체를 말한다.
- [0150] 본 명세서에서 사용되는 "비진핵생물"이란 용어는 비진핵생물 유기체를 말한다. 예를 들어, 비진핵생물 유기체는 진정세균(*Eubacteria*)[에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 썬머스 썬모필러스(*Thermus thermophilus*), 또는 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음] 계통발생적 영역, 또는 고세균(*Archaea*)[메타노코커스 잔나스키이(*Methanococcus jannaschii*), 메타노박테리움 썬모오토티로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 할로박테리움(*Halobacterium*), 예를 들어 할로페락스 볼카니이(*Haloferax volcanii*) 및 할로박테리움 중 NRC-1, 아키오글로버스 풀기더스(*Archaeoglobus fulgidus*), 파이로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코쉬이(*Pyrococcus horikoshii*), 아우로피룸 페르닉스(*Aeuropyrum pernix*) 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음] 계통발생적 영역에 속할 수 있다.
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 "피해체"란 용어는, 일부 실시형태에서는 처치, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 포유동물, 다른 실시형태에서는 처치, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 인간을 의미한다. 동물은 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험 동물(예를 들어, 래트, 마우스, 기니피그 등)일 수 있다.
- [0152] 본 명세서에 사용되는 "유효량"이란 용어는, 치료 대상 질병, 병증 또는 질환의 증상 중 하나 이상을 어느 정도

까지 경감시키는, 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드의 투여량을 말한다. 본 명세서에 기재된 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 예방, 증진 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.

[0153] "증진시키다" 또는 "증진시키는"이란 표현은 원하는 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 것을 의미한다. 따라서, 치료제의 효과를 "증진시키는" 것에 있어서 "증진시키는"이란 표현은 소정의 계에 대한 다른 치료제의 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 능력을 말한다. 본 명세서에서 사용되는 "증진시키는 유효량"이란 소정의 계에 있어서 다른 치료제의 효과를 증진시키기에 적당한 양을 의미한다. 환자에게 사용될 경우, 이러한 용도에 유효한 양은 질병, 질환 또는 병증의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료 의사의 판단에 따라 달라진다.

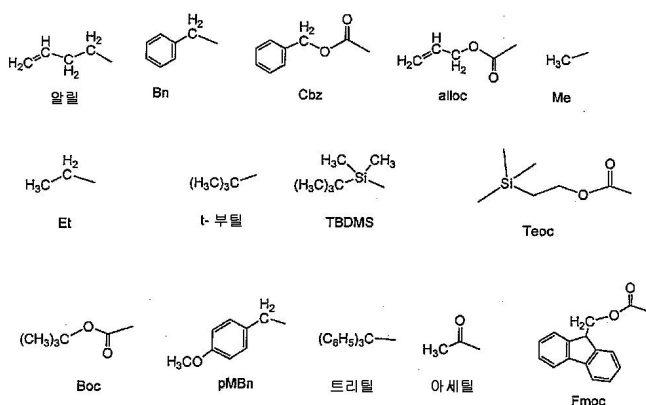
[0154] 본 명세서에서 사용되는 "변형된"이란 표현은 소정의 폴리펩티드에 가해진 임의의 변경, 예컨대 폴리펩티드의 길이, 폴리펩티드의 아미노산 서열, 화학적 구조, 번역 동시 변형 또는 번역 후 변형에 가해진 변경을 의미한다. "(변형된)" 형태란 표현은 언급된 폴리펩티드가 경우에 따라 변형될 수 있음을, 즉, 언급된 폴리펩티드가 변형될 수도 있고 변형되지 않을 수도 있음을 의미한다.

[0155] "번역 후 변형"이란 표현은 천연 또는 비천연 아미노산이 폴리펩티드 쇄에 도입된 후 그러한 아미노산에 대해 일어나는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 변형을 말한다. 이 용어는, 예를 들어 생체내에서 번역과 동시에 일어나는 변형, 시험관내에서 번역과 동시에 일어나는 변형(예컨대, 세포 비함유 번역 시스템 내에서의 변형), 생체내에서의 번역 후 변형 및 시험관내에서의 번역 후 변형을 포함한다.

[0156] 예방 용도에 있어서, FGF-21 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 특정 질병, 질환 또는 병증에 감수성이 있거나 달리 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양이 "예방적 유효량"으로서 정의된다. 사용시, 정확한 양은 역시 환자의 건강 상태, 체중 등에 따라 달라진다. 당업계에서는 통상적인 실험(예를 들어, 용량 증가 임상 시험)을 통해 이같은 예방적 유효량을 결정할 수 있는 것으로 널리 인정되고 있다.

[0157] "보호된"이란 표현은 특정한 반응 조건하에 화학적 반응성 작용기의 반응을 방지하는 "보호기" 또는 부분이 존재함을 의미한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응기의 종류에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 화학적 반응기가 아민 또는 하이드라지드인 경우, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc)의 군으로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응기가 티올인 경우, 보호기는 오르토포리딜디설파이드일 수 있다. 화학적 반응기가 카복실산, 예를 들어 부탄산 또는 프로피온산, 또는 하이드록실기인 경우, 보호기는 벤질 또는 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. Nvoc 및 MeNvoc과 같은 광불안정 기를 비롯한 당업계에 공지된 다른 보호기도 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에서 또는 이와 함께 사용될 수 있다. 당업계에 공지된 다른 보호기도 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 또는 이와 함께 사용될 수 있다.

[0158] 예를 들어, 차단/보호 기는 하기로부터 선택될 수 있다:



[0159] 다른 보호기는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999]에 기재되어 있다.

[0160]

[0161] 치료 용도에 있어서, 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 질병, 병증 또는 질환을 이미 앓고 있는 환자에게, 상기 질병, 질환 또는 병증의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "치료적 유효량"으로 정의되며, 질병, 질환 또는 병증의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료 의사의 판단에 따라 달라지게 된다. 당업계에서는 통상적인 실험(예를 들어, 용량 증가 임상 시험)을 통해 이같은 치료적 유효량을 결정할 수 있는 것으로 널리 인정되고 있다.

다.

[0162] "치료하는"이란 용어는 예방적 및/또는 치료적 처치를 지칭하는 것으로 사용된다.

[0163] 본 명세서에 제시된 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩티드는 하나 이상의 원자가 자연 상태에서 통상적으로 발견되는 원자량 또는 질량수와 상이한 원자량 또는 질량수를 갖는 원자로 치환된 동위원소 표지 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물 내로 도입될 수 있는 동위원소의 예는 각각 ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl 과 같은 수소, 탄소, 질소, 산소, 불소 및 염소의 동위원소를 포함한다. 본 명세서에 기재된 특정 동위원소 표지 화합물, 예를 들어, ^3H 및 ^{14}C 와 같은 방사성 동위원소가 도입된 화합물은 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용할 수 있다. 또한, 중수소, 즉 ^2H 와 같은 동위원소로의 치환은 보다 큰 대사 안정성, 예를 들어 생체내 반감기 증가 또는 투여량 요구 감소로부터 비롯된 치료적 이점을 제공할 수 있다.

[0164] 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 이들의 혼합물을 포함하나 이들에 한정되지 않는 모든 이성질체는 본 명세서에 기재된 조성물의 일부로서 간주된다. 또 다른 또는 추가적인 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩티드는 이를 필요로 하는 유기체에 투여시 대사되어 대사물질을 생성하고, 이 대사물질은 원하는 치료 효과를 비롯한 원하는 효과를 유발하는 데 사용된다. 추가적인 또는 또 다른 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩티드의 활성 대사물질이 제공된다.

[0165] 일부 경우에, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩티드는 호변이성질체로서 존재할 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩티드는 비수화된 형태로 존재할 수도 있고 물, 에탄올 등과 같은 약학적으로 허용되는 용매에 의해 수화된 형태로 존재할 수도 있다. 상기 수화된 형태 역시 본 명세서에 개시된 것으로 간주된다. 당업자라면 본 명세서에 개시된 화합물 중 일부가 몇 종의 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다는 것을 알 것이다. 이같은 모든 호변이성질체는 본 명세서에 개시된 조성물의 일부로서 간주된다.

[0166] 달리 명시하지 않는다면, 당업계의 기술 범위에 있는 질량 분광분석법, NMR, HPLC, 단백질 화학법, 생화학법, 제조합 DNA 기법 및 약리학적 기법과 같은 통상적인 방법이 사용된다.

[0167] [상세한 설명]

[0168] I. 서론

[0169] 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 FGF-21 분자가 본 발명에서 제공된다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 FGF-21 폴리펩티드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 하나 이상의 번역 후 변형은, 특정 반응기에 적합한 것으로 당업자에게 알려진 화학적 방법을 이용하여 제1 반응기를 포함하는 하나 이상의 비천연 아미노산에, 제2 반응기를 포함하는, 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합제, 방사선훈중, 세포 독성 화합물, 약물, 친화성 표지, 광친화성 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이트제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 사카라이드, 수용성 덴드리머, 시클로텍스트린, 억제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 부분, 방사성 부분, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이징된 부분, 화학선에 의해 여기 가능한 부분, 광이성질체화 가능한 부분, 바이오틴, 바이오틴 유사체, 중원자를 도입하는 부분, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 부분, 동위원소 표지 부분, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅 기(intercalating group), 발색단, 에너지 전달제, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오타이드, 라디오트랜스미터, 중성자 포획제, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 분자를 부착시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 상기 제1 반응기는 알킬닐 부분[비천연 아미노산 p-프로파길옥시페닐알라닌(여기서, 프로파길기는 또한 때때로 아세틸렌 부분이라 칭해짐)을 포함하나, 이에 한정되지 않음]이고, 상기 제2 반응기는 아지도 부분이며, [3+2] 고리화첨가 반응 화학법이 이용된다. 또 다른 예로서, 상기 제1 반응기는 아지도 부분(비천연 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌을 포함하나, 이에 한정되지 않음)이고, 상기 제2 반응기는 알킬닐 부분이다. 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 특정 실시형태에서, 하나 이상의 번역 후 변형이 사카라이드 부분을 포함하는 경우, 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는 하나 이상의 비천연 아미노산(케토 작용기를 포함하는 비천연 아미노산을 포함하나, 이에 한정되지 않음)이 사용된다. 특정 실시형태에서, 상기 번역 후 변형은 진핵 세포 또는 비진핵 세포에서 생체내에서 제조된다. 링커, 중합체, 수용성

중합체, 또는 다른 분자가 상기 분자를 폴리펩티드에 부착시킬 수 있다. 상기 분자는 폴리펩티드에 직접 연결될 수 있다.

[0170] 특정 실시형태에서, 상기 단백질은 한 숙주 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서 상기 번역 후 변형은 다른 종류의 숙주 세포에 의해서는 정상적으로 만들어지지 않는다. 특정 실시형태에서, 상기 단백질은 진핵 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서 상기 번역 후 변형은 비진핵 세포에 의해서는 정상적으로 만들어지지 않는다. 이러한 번역 후 변형의 예로는 글리코실화, 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질 결합 변형 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 상기 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합에 의해 올리고사카라이드를 아스파라긴에 부착시키는 것을 포함한다(올리고사카라이드가 (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc 등을 포함하는 경우를 포함하나, 이에 한정되지 않음). 또 다른 실시형태에서, 상기 번역 후 변형은 GalNAc-세린, GalNAc-트레오닌, GlcNAc-세린, 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의해 세린 또는 트레오닌에 올리고사카라이드(Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc 등을 포함하나 이에 한정되지 않음)를 부착시키는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 분비 또는 위치 지정 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함할 수 있다. 분비 신호 서열의 예로는 원핵 분비 신호 서열, 진핵 분비 신호 서열, 박테리아 발현을 위해 5' 최적화된 진핵 분비 신호 서열, 새로운 분비 신호 서열, 펙테이트 리아제(pectate lyase) 분비 신호 서열, Omp A 분비 신호 서열, 및 파지 분비 신호 서열을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 분비 신호 서열의 예로는 STII(원핵), Fd GIII 및 M13(파지), Bgl2(효모), 및 트랜스포존으로부터 유도된 신호 서열 bla를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 임의의 이같은 서열은 원하는 결과를 폴리펩티드에 제공하도록 변형될 수 있다(한 신호 서열을 다른 신호 서열로 치환하는 것, 리더 서열을 다른 리더 서열로 치환하는 것 등을 포함하나 이들에 한정되지 않음).

[0171] 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 또는 그 이상의 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있으며, 예를 들어, 단백질 내에, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 상이한 비천연 아미노산을 포함하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 상이한 부위가 존재할 수 있다. 특정 실시형태에서, 자연 발생 형태의 단백질 내에 존재하는 1개 이상(그러나 전부보다는 적은)의 특정 아미노산이 비천연 아미노산으로 치환된다.

[0172] 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21에 기초한 방법 및 조성물을 제공한다. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 FGF-21로 도입하는 것은, 일반적으로 발생하는 20종의 아미노산과는 반응하지 않으면서 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산과의 특정한 화학 반응을 포함하는 접합 화학의 적용을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21은 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄를 통해 연결된다. 본 발명은, 케톤, 아지드 또는 아세틸렌 부분을 포함하나 이들에 한정되지 않는 20종의 자연적으로 도입되는 아미노산에 존재하지 않는 작용기 또는 치환기를 포함하는 아미노산을 포함하나 이들에 한정되지 않는 비유전적으로 코딩된 아미노산을 선택적 코돈에 반응하여 단백질로 선택적으로 도입하고 그러한 아미노산을 적절한 반응성 PEG 유도체로 후속 변형하기 위한 매우 효율적인 방법을 제공한다. 그 후, 아미노산 측쇄가 도입되면, 이것은 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 특정 작용기 또는 치환기에 적절한 것으로 당업자에게 알려진 화학법을 이용하여 변형시킬 수 있다. 다중 다양한 공지된 화학법이 수용성 중합체를 단백질로 도입하기 위해 본 발명에 사용하기에 적합하다. 이러한 방법으로는 각각 아세틸렌 또는 아지드 유도체(이를 포함하나 이에 한정되지 않음)와의 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다[참고 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].

[0173] Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응은 친핵성 치환 반응이 아니라 고리화첨가 반응을 수반하기 때문에, 단백질을 매우 높은 선택도로 변형시킬 수 있다. 이 반응은 반응 혼합물에 촉매량의 Cu(I) 염을 첨가하여 우수한 위치선택성(1,4 > 1,5)으로 수성 조건하에 실온에서 행해질 수 있다[참고 문헌: Tornøe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; 및 Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; 및 WO 03/101972]. [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 본 발명 단백질에 부가될 수 있는 분자로는 아지도 또는 아세틸렌 유도체를 포함하나 이들에 한정되지 않는 적절한 작용기 또는 치환기를 갖는 실질적으로 임의의 분자를 포함한다. 이러한 분자들은, 각각, p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 아세틸렌기, 또는 p-아지도-페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 아지도기에 의해 비천연 아미노산에 부가될 수 있다.

- [0174] Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응으로부터 형성되는 5원 고리는 일반적으로 환원 환경에서 가역적이 아니며 수성 환경에서 장기간 동안 가수분해에 안정하다. 그 결과, 다중 다양한 물질의 물리적 및 화학적 특성이 요구되는 수성 조건하에 본 발명의 활성 PEG 유도체에 의해 변형될 수 있다. 아지드 및 아세틸렌 부분은 서로에 대해 특이적이기 때문에(예를 들어, 유전적으로 코딩된 20종의 일반 아미노산 중 어느 것과 반응하지 않음), 단백질이 매우 높은 특이성으로 하나 이상의 특정 부위에서 변형될 수 있다는 것이 더욱 더 중요하다.
- [0175] 본 발명은 또한 하나 이상의 아세틸렌 또는 아지드 부분을 갖는 수용성이며 가수분해에 안정한 PEG 유도체의 유도체 및 관련 친수성 중합체를 제공한다. 아세틸렌 부분을 포함하는 PEG 중합체 유도체는 셀렉터 코돈에 반응하여 단백질에 선택적으로 도입된 아지드 부분과의 커플링에 매우 특이적이다. 유사하게, 아지드 부분을 포함하는 PEG 중합체 유도체는 셀렉터 코돈에 반응하여 단백질에 특이적으로 도입된 아세틸렌 부분과의 커플링에 매우 선택적이다.
- [0176] 더 구체적으로, 상기 아지드 부분은 알킬 아지드, 아릴 아지드 및 이들 아지드의 유도체를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 상기 알킬 및 아릴 아지드의 유도체는 아세틸렌 특이적 반응성이 유지되는 한 다른 치환기들도 포함할 수 있다. 상기 아세틸렌 부분은 알킬 및 아릴 아세틸렌 및 각각의 유도체를 포함한다. 상기 알킬 및 아릴 아세틸렌의 유도체는 아지드 특이적 반응성이 유지되는 한 다른 치환기들도 포함할 수 있다.
- [0177] 본 발명은 다중 다양한 작용기, 치환기 또는 부분을 갖는 물질과, 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광가교결합체; 방사성핵종; 세포 독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이트제; 보조 인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 덴드리머; 시클로덱스트린; 억제성 리보핵산; 생물학적 물질; 나노입자; 스핀 표지; 형광단; 금속 함유 부분; 방사성 부분; 신규 작용기; 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기; 광케이지된 부분; 화학선에 의해 여기 가능한 부분; 광이성질체화 가능한 부분; 바이오틴; 바이오틴 유사체; 중원자를 도입하는 부분; 화학적으로 절단 가능한 기; 광절단 가능한 기; 연장된 측쇄; 탄소 결합된 당; 산화환원 활성 물질; 아미노 티오산; 독성 부분; 동위원소 표지 부분; 생물물리적 프로브; 인광성 기; 화학발광성 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 인터칼레이팅 기; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적 활성 물질; 검출 가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오티드; 래디오트랜스미터; 중성자 포획제; 또는 상기의, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 물질과의 접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 상응하는 아세틸렌 또는 아지드 부분을 갖는 PEG 중합체 유도체와 아지드 또는 아세틸렌 부분을 갖는 물질의 접합체를 포함한다. 예를 들어, 아지드 부분을 포함하는 PEG 중합체는 아세틸렌 작용기를 보유하는 비유전적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단백질 내의 위치에서 생물학적 활성 분자에 커플링될 수 있다. PEG와 생물학적 활성 분자가 커플링되는 결합은 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응 생성물을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0178] PEG가 생물학적 물질의 표면을 변형시키는 데 사용될 수 있다는 것은 잘 확립되어 있다(예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제6,610,281호; 문헌[Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci, 3(1):125-136 (2000)] 참조). 본 발명은 또한 하나 이상의 반응성 아지드 또는 아세틸렌 부위 및 Huisgen [3+2] 고리화첨가 결합을 통해 표면에 커플링된 본 발명의 아지드 또는 아세틸렌 함유 중합체 중 하나 이상을 갖는 표면을 포함하는 생물학적 물질을 포함한다. 생물학적 물질 및 다른 물질은 또한, 후속 반응에 이용될 수 있는 아지드 또는 아세틸렌 부분을 남기는, 아지드 또는 아세틸렌 결합 이외의 결합을 통해, 예컨대 카복실산, 아민, 알코올 또는 티올 부분을 포함하는 결합을 통해 아지드 또는 아세틸렌 활성화 중합체 유도체에 커플링될 수 있다.
- [0179] 본 발명은 본 발명의 아지드 및 아세틸렌 함유 중합체를 합성하는 방법을 포함한다. 아지드 함유 PEG 유도체의 경우, 상기 아지드는 상기 중합체의 탄소 원자에 직접 결합될 수 있다. 대안으로, 상기 아지드 함유 PEG 유도체는 아지드 부분을 갖는 결합체를 통상적인 활성화된 중합체의 한쪽 말단에 부착시켜, 생성된 중합체가 그 말단에 아지드 부분을 갖도록 함으로써 제조할 수 있다. 아세틸렌 함유 PEG 유도체의 경우, 상기 아세틸렌은 상기 중합체의 탄소 원자에 직접 결합될 수 있다. 대안으로, 상기 아세틸렌 함유 PEG 유도체는 아세틸렌 부분을 갖는 결합체를 통상적인 활성화된 중합체의 한쪽 말단에 부착시켜, 생성된 중합체가 그 말단에 아세틸렌 부분을 갖도록 함으로써 제조할 수 있다.
- [0180] 더 구체적으로, 상기 아지드 함유 PEG 유도체의 경우, 하나 이상의 활성 하이드록실 부분을 갖는 수용성 중합체는 반응을 겪어 그 위에 반응성이 더 큰 부분, 예컨대 메실레이트, 트레실레이트, 토실레이트 또는 할로젠 이탈기를 갖는 치환된 중합체를 생성한다. 설폰닐산 할라이드, 할로젠 원자 및 다른 이탈기를 포함하는 PEG 유도체

의 제조 및 용도는 당업자에게 알려져 있다. 그 후, 얻어진 치환된 중합체는 반응을 겪어, 중합체의 말단에서 반응성이 더 큰 부분을 아지드 부분으로 치환한다. 대안으로, 하나 이상의 활성 친핵성 또는 친전자성 부분을 갖는 수용성 중합체는 한쪽 말단에 아지드를 갖는 결합제와의 반응을 겪어서, PEG 중합체와 결합제 사이에 공유 결합이 형성되고, 상기 중합체의 말단에 아지드 부분이 위치한다. 아민, 티올, 하이드라지드, 하이드라존, 알코올, 카복실레이트, 알데히드, 케톤, 티오에스테르 등을 비롯한 친핵성 및 친전자성 부분은 당업자에게 공지되어 있다.

[0181] 더 구체적으로, 아세틸렌 함유 PEG 유도체의 경우, 하나 이상의 활성 하이드록실 부분을 갖는 수용성 중합체가 반응을 겪어서, 아세틸렌 부분을 포함하는 전구체로부터 할로겐 또는 다른 활성화된 이탈기를 치환한다. 대안으로, 하나 이상의 활성 친핵성 또는 친전자성 부분을 갖는 수용성 중합체가 한쪽 말단에 아세틸렌을 갖는 결합제와 반응을 겪어서, PEG 중합체와 결합제 사이에 공유 결합이 형성되고, 상기 중합체 말단에 아세틸렌 부분이 위치한다. 유기 합성 및 PEG 유도체의 제조 및 사용에 있어서의 할로겐 부분, 활성화된 이탈기, 친핵성 및 친전자성 부분의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0182] 본 발명은 또한, 아지드 또는 아세틸렌 부분을 포함하는 PEG 또는 PEG 유도체와 같은 수용성 중합체를 포함하이에 한정되지 않는, 변형된 단백질에 다른 물질을 부가하기 위한 단백질의 선택적 변형 방법을 제공한다. 상기 아지드 및 아세틸렌 함유 PEG 유도체는, 생체적합성, 안정성, 용해도 및 면역원성의 부재가 중요한 표면 및 분자의 특성을 변형시킴과 동시에, 당업계에 종래에 알려진 것이 아닌, 단백질에 PEG 유도체를 부착시키는 보다 선택적인 방법을 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0183] II. 섬유아세포 성장 인자

[0184] 다종 다양한 세포 및 조직 유형의 성장, 증식, 생존 및 분화에 대한 FGF의 잠재적 활성화로 인해, FGF는 상처 치유, 예컨대 근골격 질환, 예를 들어 골절, 인대 및 조직 회복, 건염, 활액낭염 등; 피부 질환, 예를 들어, 화상, 베인 상처, 열상, 욕창, 치유 속도가 느린 궤양 등의 치유; 심근경색 및 허혈 상태에서의 조직 보호, 회복 및 신생혈관형성의 유도, 신경계 질환, 예를 들어 신경퇴행성 질환 및 뇌졸중의 치료, 황반변성을 비롯한 안질환의 치료 등을 비롯한 다양한 다수의 적응증을 위한 치료제로서 계속 사용될 것이다.

[0185] 지금까지 확인된 섬유아세포 성장 인자(FGF) 단백질은 다양한 세포 유형의 성장 및 분화를 조절하는 신호 전달 분자의 패밀리에 속한다. 인체 생리학 및 병리학에 있어서의 FGF 단백질의 중요성은 부분적으로 배발생, 혈관 형성 및 성장과 뼈 성장에 있어서의 중요한 역할과 관련이 있다. 시험관내 실험을 통해, 내피세포, 혈관 평활근 세포, 섬유아세포와 심근 세포 및 골격근 세포의 세포 성장 및 분열을 조절하는 데 있어서의 FGF의 역할이 입증되었다. FGF 패밀리의 다른 구성원 및 그 생물학적 역할에 대해서는 문헌[Crossley et al., Development 21:439-451 (1995)]; 문헌[Ohuchi et al., Development 124:2235-2244 (1997)]; 문헌[Gemel et al., Genomics 35:253-257 (1996)]; 및 문헌[Ghosh et al., Cell Growth and Differentiation 7:1425-1434 (1996)]에 기재되어 있다.

[0186] FGF 단백질은 또한 암 세포 성장에 있어서의 역할로 인해 인간의 건강 및 질병에 중요하다. 예를 들어, FGF-8은 유방암 및 전립선암 세포에서 안드로겐 유도 성장 인자로서 확인되었다[Tanaka et al., FEBS Lett. 363:226-230 (1995); 및 P.N.A.S. 89:8928-8932 (1992)].

[0187] 정상적인 발생에 있어서의 FGF의 역할은 FGF 수용체의 연구를 통해 부분적으로 규명되고 있다. 문헌[Wilke, T. et al., Dev. Dynam. 210:41-52 (1997)]에서는, FGFR1, FGFR2 및 FGFR3 전사체가 닭의 배발생 단계에서 머리의 특정한 영역에 국재화된다는 것을 밝혔다. 발현 패턴은, 비정상적 막내 골 형성증인 크루존 증후군(Crouzon syndrome)에 있어서의 인간 FGFR 돌연변이에 의해 영향을 받은 영역과 서로 관련지어졌다. 문헌[Belluardo, N. et al., Jour. Comp. Neur. 379:226-246 (1997)]은 래트 뇌에서의 FGFR 1, 2 및 3 mRNA의 국재화를 연구하였으며, 몇 개의 뇌 영역에 있어서 세포 특이성을 발견하였다. 또한, FGFR1 및 FGFR2 mRNA는 뇌 손상 후에 성상교세포 반응성 세포에서 발현되었으며, 이는 뇌 질환 및 손상에 있어서의 특정 FGF의 역할을 지지하는 것이다. 문헌[Ozawa, K. et al., Mol. Brain Res. 41:279-288 (1996)]은 FGF-1 및 FGF-5 발현이 출생 후 증가하는 반면, FGF3, FGF-6, FGF-7 및 FGF-8 유전자는 출생 후 시기보다 배아기 후기에 더 많이 발현되는 것으로 확인되었다고 보고하였다. 보조 인자인 클로토 베타(Klotho beta: Klb) 또한 FGF-21 및 그 수용체의 신호 전달에 관여할 수 있다. Klb는 FGFR1 및 FGFR4가 FGF21에 결합하는 능력을 증가시키는 것으로 보고되었다. Klb는 1회 관통(single-pass) 막관통 단백질로서, 전체 막관통 형태의 역할은 알려져 있지 않지만, FGF23과 관련하여, 클로토가 FGF23 결합을 증진시키고 FGF 수용체의 인산화를 증가시키는 한편, 클로토 베타는 FGF-21 결합을 증진시키는 것으로 확인되었다[H. Kurosu, Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, M. G.

Baum, S. Schiavi, M.-C. Hu, O. W. Moe, M. Kuro-o, Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. J. Biol. Chem. 281, 6120-6123 (2006), 모두 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함함].

[0188] Katoh 등의 문헌[International Journal of Oncology (2006) 29:163-168]은 FGF 패밀리 및 이 패밀리 구성원의 계통발생학적 분석에 관해 기재한다. Katoh 등의 문헌은 또한 위장관에 있어서의 신호 전달 경로 네트워크에 관해서도 고찰한다.

[0189] Plotnikov 등의 문헌[Cell (1999) 98:641-650]은 FGF 수용체 1(FGFR1)에 결합된 FGF2 및 이들 복합체 중 둘 사이에 형성되는 2겹 대칭 이량체의 결정 구조에 관해 기재한다. Plotnikov 등은 상기 수용체의 이량체화 및 FGF와 헤퍼린에 의한 이량체화의 유도에 관한 모델을 제공한다.

[0190] 향후 상기 FGF 패밀리의 추가 구성원이 발견될 가능성이 있다. 상기 FGF 패밀리의 새로운 구성원은, 컴퓨터에 의한 예상 단백질 서열의 2차 및 3차 구조 분석과 특정 표적에 결합하는 분자를 확인하도록 설계된 선별 기법에 의해 동정될 수 있다.

[0191] 따라서, 상기 FGF 패밀리에 관한 설명은 예시를 목적으로 제공된 것으로, 단지 예에 불과하며, 본 명세서에 기재된 방법, 조성물, 전략법 및 기법의 범위를 한정하는 것이 아니다. 또한, 본 출원에서 FGF-21이라고 하는 것은 일반 용어를 상기 FGF 패밀리의 임의의 구성원의 일례로서 사용하기 위해 이용된 것이다. 따라서, FGF-21 폴리펩티드 또는 단백질과 관련하여 본 명세서에 기재된 변형법 및 화학법은 본 명세서에 구체적으로 열거된 것들을 비롯하여 FGF 패밀리의 임의의 구성원에 동등하게 적용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0192] III. 본 발명에서 사용되는 일반적 제조합 핵산 방법

[0193] 본 발명의 많은 실시형태에서, 관심있는 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 단리하고 클로닝하고 종종 제조합 방법을 이용하여 변형시킨다. 이러한 실시형태는 단백질 발현을 위해, 또는 변이체, 유도체, 발현 카세트, 또는 FGF-21 폴리펩티드로부터 유도된 다른 서열을 제조하는 과정에서 이용되나 이들에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 이종성(heterologous) 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0194] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 모 폴리펩티드의 아미노산 서열(서열 번호 1~7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 기초로 합성되고, 그 후 관련 아미노산 잔기(들)의 도입(즉, 삽입 또는 치환) 또는 제거(즉, 결실 또는 치환)가 이루어지도록 뉴클레오티드 서열을 변화시키는 것에 의해 생성될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 통상적인 방법에 따라 부위 지정 돌연변이 유발법에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 대안으로, 뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 합성기의 사용을 포함하나 이에 한정되지 않는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오티드는 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 기초하여, 바람직하게는, 제조합 폴리펩티드가 제조되는 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선택하여 디자인한다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 일부를 코딩하는 몇몇 작은 올리고뉴클레오티드는 PCR, 절찰 또는 절찰 연쇄 반응에 의해 합성되고 조립될 수 있다. 예를 들어, 전술한 내용과 관련하여 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:189-193(1991)], 및 미국 특허 제6,521,427호를 참조할 수 있다.

[0195] 본 발명은 제조합 유전학 분야에 있어서의 통상적인 기법을 이용한다. 본 발명에 사용되는 일반적 방법을 개시하는 기본 문헌으로는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001)]; 문헌[Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)]; 및 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다.

[0196] 분자생물학적 기법을 설명하는 일반 문헌으로는 문헌[Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger)]; 문헌[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 문헌[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 들 수 있다. 이러한 문헌들은 비천연 아미노산을 포함하는 단백질의 제조를 위한 셀렉터 코돈을 포함하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드, 오르토고날 tRNA, 오르토고날 합성효소 및 이들의 쌍을 제조하는 것(이러한 것들을 포함하나 이에 한정되지 않음)에 관련된 돌연변이 유발법, 벡터의 사용, 프로모터 및 많은 다른 관련 주제를 기술하고 있다.

[0197]

신규 합성효소 또는 tRNA의 제조, tRNA 분자의 돌연변이 유발, 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 돌연변이 유발, tRNA 라이브러리의 제조, 합성효소 라이브러리의 제조, 선택터 코돈의 제조, 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드에서 비천연 아미노산을 코딩하는 선택터 코돈을 삽입하는 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 목적을 위해 다양한 종류의 돌연변이 유발 기법이 본 발명에서 사용된다. 이는 부위 지정 돌연변이 유발법, 무작위 포인트 돌연변이 유발법, 상동성 재조합법, DNA 셔플링법 또는 다른 반복적 돌연변이 유발법, 키메라 구축법, 우라실 함유 주형을 사용한 돌연변이 유발법, 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이 유발법, 포스포로티오에이트 변형 DNA 돌연변이 유발법, 겹을 갖는 이중체 DNA를 사용한 돌연변이 유발법 등, PCT 매개 돌연변이 유발법 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 다른 적절한 방법은 포인트 미스매치 수복법, 수복 결합 숙주 균주를 사용한 돌연변이 유발법, 제한 선택 및 제한 정제법, 결실 돌연변이 유발법, 전체 유전자 합성에 의한 돌연변이 유발법, 이중 가닥 파괴 수복법 등을 포함한다. 키메라 구조체를 사용하는 돌연변이 유발법을 포함하나 이에 한정되지 않는 돌연변이 유발법도 본 발명에 포함된다. 일 실시형태에서, 돌연변이 유발법은 서열, 서열 비교, 물성, 2차, 3차 또는 4차 구조, 결정 구조 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는, 천연 분자, 또는 변경된 또는 돌연변이된 천연 분자의 공지된 정보를 지침으로 할 수 있다.

[0198]

본 명세서에 기재된 문헌 및 예는 이와 같은 관련 절차를 개시하고 있다. 하기 간행물 및 이 간행물에 인용된 참고 문헌에서 추가 정보를 얻을 수 있다: 문헌[Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254 (2):157-178 (1997)]; 문헌[Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996)]; 문헌[Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985)]; 문헌[Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985)]; 문헌[Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986)]; 문헌[Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987)]; 문헌[Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:488-492 (1985)]; 문헌[Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987)]; 문헌[Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988)]; 문헌[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)]; 문헌[Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983)]; 문헌[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)]; 문헌[Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13:8749-8764 (1985)]; 문헌[Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13:8765-8787 (1985)]; 문헌[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)]; 문헌[Sayers et al., 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988)]; 문헌[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]; 문헌[Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12:9441-9456 (1984)]; 문헌[Kramer & Fritz, Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987)]; 문헌[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)]; 문헌[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)]; 문헌[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)]; 문헌[Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13:4431-4443 (1985)]; 문헌[Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.*

154:382-403 (1987)]; 문헌[Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14:5115 (1986)]; 문헌[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)]; 문헌[Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223:1299-1301 (1984)]; 문헌[Sakamar 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)]; 문헌[Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985)]; 문헌[Grundstroem et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13:3305-3316 (1985)]; 문헌[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)]; 문헌[Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993)]; 문헌[Sieber, et al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001)]; 문헌[W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994)]; 및 문헌[I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995)]. 상기 방법들 중 다수에 대한 추가적인 설명은 문헌[Methods in Enzymology Volume 154]에서 찾아볼 수 있는데, 이 문헌은 또한, 각종 돌연변이 유발법과 관련된 문제 해결을 위한 유용한 관리법을 기술하고 있다.

[0199] 예를 들어 본 발명의 돌연변이 유발에 사용하기 위한, 예를 들어 합성효소의 라이브러리를 돌연변이시키거나 tRNA를 변경하는 데 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 문헌[Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, (1981)]에 기재된 고상 포스포아미다이트 트리에스테르법에 따라, 예를 들어, 문헌[Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984)]에 기재된 바와 같이 자동 합성기를 사용하여 화학적으로 합성한다.

[0200] 본 발명은 또한 오르토고날 tRNA/RS 쌍을 통한 비천연 아미노산의 생체내 도입을 위한 진핵 숙주 세포, 비진핵 숙주 세포 및 유기체의 사용에 관한 것이다. 숙주 세포는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 구성체(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 본 발명의 벡터를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 의해 유전공학적으로 조작된다(형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 포함하나, 이들에 한정되지 않음). 예를 들어, 오르토고날 tRNA, 오르토고날 tRNA 합성효소 및 유도체화하고자 하는 단백질에 대한 코딩 영역들을 원하는 숙주 세포에서 기능성인 유전자 발현 조절 요소에 작동 가능하게 연결한다. 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지, 박테리아, 바이러스, 네이키드(naked) 폴리뉴클레오티드 또는 접합된 폴리뉴클레오티드의 형태일 수 있다. 상기 벡터는 전기천공법[Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 5824 (1985)], 바이러스 벡터에 의한 감염, 소형 비드 또는 입자로 된 매트릭스 내에 또는 표면 상에 핵산을 갖는 소립자에 의한 고속 탄도 침투(ballistic penetration)[Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)] 등을 비롯한 표준 방법에 의해 세포 및/또는 미생물 내로 도입된다.

[0201] 조작된 숙주 세포는, 예를 들어 스크리닝 단계, 프로모터의 활성화 또는 형질전환체의 선별과 같이, 그 활성화에 적합하도록 변형된 통상적인 영양 배지 중에서 배양될 수 있다. 이들 세포는 경우에 따라 유전자이식 유기체 내에서 배양될 수 있다. 세포 단리 및 배양(예를 들어, 후속 핵산 단리)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 것에 대한 다른 유용한 참고 문헌으로는 문헌[Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York] 및 이 문헌에 인용된 참고 문헌; 문헌[Payne et al., (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY]; 문헌[Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York)] 및 문헌[Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL]을 포함한다.

[0202] 표적 핵산을 세포 내로 도입하는 몇 가지 공지된 방법이 이용 가능하며, 이들 중 임의의 방법이 본 발명에 이용될 수 있다. 이들 방법은 수용 세포와, DNA를 함유하는 박테리아 원형질체의 융합, 전기천공법, 추진체 포격(projectile bombardment), 및 바이러스 벡터를 이용한 감염(이하에서 추가로 설명함) 등을 포함한다. 박테리아 세포는 본 발명의 DNA 구성체를 함유하는 다수의 플라스미드를 증폭시키는 데 사용될 수 있다. 박테리아는 대수기(log phase)까지 증식시키고, 박테리아 내의 플라스미드는 당업계에 공지된 다양한 방법(예를 들어, Sambrook의 문헌 참조)에 의해 단리될 수 있다. 또한, 박테리아로부터 플라스미드를 정제하기 위한 다수의 키트가 시판되고 있다(예를 들어, Pharmacia Biotech에서 시판하는 EasyPrep™ 및 FlexiPrep™; Stratagene에서 시판하는

StrataClean™; 및 Qiagen에서 시판하는 QIAprep™). 그 후, 단리되고 정제된 플라스미드를, 다른 플라스미드를 제조하기 위해 추가로 조작하거나, 세포를 형질감염시키는 데 사용하거나, 유기체를 감염시키기 위해 관련 벡터 내로 도입한다. 전형적인 벡터는 전사 및 번역 종결 서열, 전사 및 번역 개시 서열, 및 특정 표적 핵산의 발현 조절에 유용한 프로모터를 포함한다. 벡터는 경우에 따라 하나 이상의 독립된 종결 서열, 진핵생물, 원핵생물 또는 이들 둘 다에서 카세트의 복제를 가능하게 하는 서열(서열 벡터를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 및 원핵 및 진핵 시스템 둘 다에 대한 선별 마커를 포함하는 범용 발현 카세트를 포함한다. 벡터는 원핵생물, 진핵생물, 또는 이들 둘 다에 있어서 복제 및 도입에 적합하다. 문헌[Gilman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et al., Nature, 328:731 (1987)]; 문헌[Schneider, E., et al., Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995)]; 문헌[Ausubel, Sambrook, Berger (all supra)]을 참조할 수 있다. 클로닝에 유용한 박테리아 및 박테리오파지의 카탈로그는, 예를 들어 ATCC에 의해 제공되며, 그 예로는 ATCC가 발행한 카탈로그[The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al., (eds)]가 있다. 또한, 서열 분석, 클로닝 및 분자생물학의 다른 측면에 대한 추가 기본 절차 및 기초적인 이론적 고려사항은 문헌[Watson et al., (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY]에서 찾을 수 있다. 또한, 실질적으로 어떠한 핵산도(또한, 표준 또는 비표준의 사실상 어떠한 표지된 핵산도) 다양한 임의의 상업적 공급업체로부터, 예를 들어 Midland Certified Reagent Company(미국 텍사스주 미들랜드 소재, www.mcrc.com에서 이용 가능함), The Great American Gene Company(미국 캘리포니아주 라모나 소재, www.genco.com에서 이용 가능함), ExpressGen Inc.(미국 일리노이주 시카고 소재, www.expressgen.com에서 이용 가능함), Operon Technologies Inc.(미국 캘리포니아주 알라메다 소재) 및 많은 다른 공급업체로부터 맞춤 주문 또는 일반 주문할 수 있다.

[0203] 셀렉터 코돈

[0204] 본 발명의 셀렉터 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 골격구조를 확장시킨다. 예를 들어, 셀렉터 코돈은 특이한 3 염기 코돈, 넨센스 코돈, 예를 들어 앰버 코돈(UAG), 오키 코돈 또는 오팔 코돈(UGA)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 정지 코돈, 비천연 코돈, 4 또는 그 이상의 염기 코돈, 회귀 코돈 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. FGF-21 폴리펩티드의 적어도 일부를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드에서 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 또는 그 이상을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 수의 셀렉터 코돈을 원하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드 내로 도입할 수 있다는 것이 당업자에게는 자명하다.

[0205] 일 실시형태에서, 본 방법은 하나 이상의 비천연 아미노산을 생체내로 도입하기 위한 정지 코돈인 셀렉터 코돈의 사용을 포함한다. 예를 들어, UAG를 포함하나 이에 한정되지 않는 정지 코돈을 인식하며 O-RS에 의해 원하는 비천연 아미노산으로 아미노아실화되는 O-tRNA가 생성된다. 이 O-tRNA는 천연 숙주의 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해서는 인식되지 않는다. 통상적인 부위 지정 돌연변이 유발법을 이용하여, 관심있는 폴리펩티드 내의 관심있는 부위에, TAG를 포함하나 이에 한정되지 않는 정지 코돈을 도입할 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 참조할 수 있다. O-RS, O-tRNA, 및 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 생체내에서 조합되는 경우, 상기 비천연 아미노산은 UAG 코돈에 반응하여 도입되어, 특정 위치에 비천연 아미노산을 함유하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0206] 비천연 아미노산의 생체내 도입은 진핵 숙주 세포에 유의적인 영향을 주지 않으면서 수행될 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효율은 O-tRNA(앰버 서프레서 tRNA를 포함하나 이에 한정되지 않음)와 진핵 방출 인자(eRF를 포함하나 이에 한정되지 않음)(이는 정지 코돈에 결합하여, 리보솜으로부터 성장 펩티드의 방출을 개시함) 사이의 경쟁에 좌우되기 때문에, 억제 효율은 O-tRNA 및/또는 서프레서 tRNA의 발현 수준을 증가시키는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 방법에 의해 조절할 수 있다.

[0207] 비천연 아미노산은 회귀 코돈을 갖도록 코딩될 수도 있다. 예를 들어, 시험관내 단백질 합성 반응에 있어서 아르기닌 농도를 감소시킬 경우, 회귀 아르기닌 코돈인 AGG가 알라닌에 의해 아실화된 합성 tRNA에 의한 Ala의 삽입에 효율적인 것으로 입증된 바 있다. 예를 들어, 문헌[Ma et al., Biochemistry. 32:7939 (1993)]을 참조할 수 있다. 이 경우, 합성 tRNA는 에스케리치아 콜라이에서 소수 종으로서 존재하는 천연 tRNAArg과 경쟁한다. 일부 유기체는 모든 3 염기 코돈을 이용하지는 않는다. 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 있어서 미지정 코돈인 AGA는 시험관내 전사/번역 추출물 중에서의 아미노산의 삽입에 이용되고 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Kowal and Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997)]을 참조한다. 본 발명의 구성요소들은 생체내에서 이같은 회귀 코돈을 사용하도록 제조될 수 있다.

[0208] 셀렉터 코돈은 또한 4 또는 그 이상의 염기 코돈, 예를 들어, 4 염기 코돈, 5 염기 코돈 또는 6 염기 또는 그

이상의 염기 코돈을 포함하나 이들에 한정되지 않는 연장된 코돈을 포함한다. 4 염기 코돈의 예로는 AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 5 염기 코돈의 예로는 AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 특징은 프레임쉬프트 억제제를 기초로 하여 연장된 코돈을 이용하는 것을 포함한다. 4 또는 그 이상의 염기 코돈은, 하나 또는 복수개의 비천연 아미노산을 포함하나 이들에 한정되지 않는 아미노산을 동일한 단백질 내로 삽입할 수 있다. 예를 들어, 안티코돈(anticodon) 루프, 예를 들어 8~10개 이상의 뉴클레오티드로 구성된 안티코돈 루프를 갖는 특수 프레임쉬프트 서프레서 tRNA를 포함하나 이에 한정되지 않는 돌연변이된 O-tRNA의 존재하에, 4 또는 그 이상의 염기 코돈은 단일 아미노산으로서 판독된다. 다른 실시형태에서, 상기 안티코돈 루프는 적어도 4개의 염기로 구성된 코돈, 적어도 5개의 염기로 구성된 코돈, 또는 적어도 6개의 염기, 또는 그 이상의 염기로 구성된 코돈을 포함하나 이들에 한정되지 않는 코돈을 해독(decode)할 수 있다. 256개의 가능한 4 염기 코돈이 존재하기 때문에, 4개 이상의 염기로 구성된 코돈의 사용에 의해 동일한 세포에서 다수의 비천연 아미노산이 코딩될 수 있다. 이와 관련하여, 문헌[Anderson et al., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244]; 문헌[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 참조할 수 있다.

[0209] 예를 들어, 4 염기 코돈은 시험관내 생합성 방법을 이용하여 비천연 아미노산을 단백질 내로 도입하는 데 사용되어 왔다. 예를 들어, 문헌[Ma et al., (1993) Biochemistry. 32:7939]; 및 문헌[Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc. 121:34]을 참조할 수 있다. CGGG 및 AGGU는 시험관내에서 2개의 화학적으로 아실화된 프레임쉬프트 서프레서 tRNA를 사용하여 2-나프틸알라닌 및 라이신의 NBD 유도체를 동시에 스트렙타비딘으로 도입하는 데 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194]을 참조할 수 있다. 생체내 연구에서, Moore 등은 NCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu} 유도체가 UAGN 코돈(N은 U, A, G 또는 C일 수 있음)을 억제하는 능력을 조사하였고, 4개의 염기로 구성된 UAGA가 0 또는 -1 프레임(frame)에서 거의 해독되지 않은 채 13~26%의 효율로 UCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu}에 의해 해독될 수 있다는 것을 발견하였다. 이와 관련하여, 문헌[Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195]을 참조할 수 있다. 일 실시형태에서, 회귀 코돈 또는 넌센스 코돈을 기초로 한 연장된 코돈이 본 발명에서 사용될 수 있으며, 이는 원치않는 다른 부위에서의 미스센스 리드쓰루(missense readthrough) 및 프레임쉬프트 억제제를 감소시킬 수 있다.

[0210] 특정 시스템의 경우, 선택적 코돈은 또한 천연 3 염기 코돈 중 하나를 포함할 수 있으며, 이때 내인성 시스템은 천연 염기 코돈을 사용하지 않는다(또는 거의 사용하지 않는다). 예를 들어, 이는 천연 3 염기 코돈을 인식하는 tRNA가 결여된 시스템, 및/또는 3 염기 코돈이 회귀 코돈인 시스템을 포함한다.

[0211] 선택적 코돈은 경우에 따라 비천연 염기쌍을 포함한다. 이러한 비천연 염기쌍은 기존의 유전자 알파벳을 더 확장시킨다. 추가의 1개 염기쌍은 3 염기 코돈의 수를 64개에서 125개로 증가시킨다. 세 번째 염기쌍의 특성은 안정한 선택적 염기쌍 형성, 높은 충실도로 폴리머라제에 의한 DNA 내로의 효율적인 효소적 도입, 및 초기(nascent) 비천연 염기쌍의 합성 후 효율적인 연속 프라이머 연장을 포함한다. 본 방법 및 조성물에서 채용될 수 있는 비천연 염기쌍에 대한 설명은, 예를 들어 문헌[Hirao, et al., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology. 20:177-182]을 참조할 수 있다. 문헌[Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630]도 참조할 수 있다. 다른 관련 간행물들도 열거되어 있다.

[0212] 생체내 사용에 있어서는, 비천연 뉴클레오티드는 막 투과성을 지니고 인산화되어 상응하는 트리포스페이트를 형성한다. 또한, 증가된 유전 정보는 안정성이 있고 세포내 효소에 의해 파괴되지 않는다. Benner 등에 의해 이루어진 종래의 연구는 정규(canonical) 왓슨-크릭(Watson-Crick) 쌍에서의 수소 결합 패턴과 상이한 수소 결합 패턴을 이용하였는데, 이 중 가장 주목할 만한 예는 이소-C:이소-G 쌍이다. 이와 관련해서는, 예를 들어 문헌[Switzer et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322]; 문헌[Piccirilli et al., (1990) Nature, 343:33]; 및 문헌[Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602]을 참조할 수 있다. 이 염기들은 일반적으로 어느 정도까지 천연 염기와 쌍을 잘못 이루어 효소적으로 복제될 수 없다. Kool과 그의 동료들은 염기 사이의 소수성 패킹 상호작용이 수소 결합을 대체하여 염기쌍의 형성을 유도할 수 있다는 것을 입증하였다. 이에 관해서는 문헌[Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602]; 및 문헌[Guckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825]을 참조할 수 있다. 상기 요건을 전부 만족시키는 비천연 염기쌍을 개발하기 위한 노력으로, Schultz, Romesberg 및 그 동료들은 일련의 비천연 소수성 염기들을 체계적으로 합성하여 연구하였다. PICS:PICS 자가 쌍(self-pair)은 천연 염기쌍보다 안정한 것으로 밝혀졌고, 에스케리치아 콜라이 DNA 폴리머라

제 I의 클레나우(Klenow) 단편(KF)에 의해 DNA 내로 효율적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌[McMinn et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6]; 및 문헌[Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274]을 참조할 수 있다. 3MN:3MN 자가 쌍은 생물학적 기능에 충분한 효율성 및 선택성으로 KF에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc. 122:8803]을 참조할 수 있다. 그러나, 양쪽 염기 둘 다 추가 복제를 위한 사슬 종결 인자로 작용한다. 최근, PICS 자가 쌍을 복제하는 데 사용될 수 있는 돌연변이 DNA 폴리머라제가 개발되었다. 또한, 7AI 자가 쌍도 복제될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tae et al., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439]을 참조할 수 있다. 또한, 새로운 메탈로염기쌍인 Dipic:Py도 개발되었는데, 이것은 Cu(II)와 결합할 때 안정한 쌍을 형성한다. 문헌[Meggers et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714]을 참조할 수 있다. 연장된 코돈 및 비천연 코돈은 본질적으로 천연 코돈에 오르토고날하기 때문에, 본 발명의 방법은 이 특성을 이용하여 이들에 대한 오르토고날 tRNA를 생성할 수 있다.

[0213] 또한, 번역 우회(translational bypassing) 시스템을 이용하여, 원하는 폴리펩티드 내로 비천연 아미노산을 도입할 수 있다. 번역 우회 시스템에서, 큰 서열이 유전자 내로 도입되긴 하나 단백질로 번역되지 않는다. 이 서열은 리보솜이 서열을 건너 뛰어, 삽입 부위 하류의 번역을 재개하도록 유도하는 신호(cue)로서 작용하는 구조를 포함한다.

[0214] 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법 및/또는 조성물에 있어서의 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드(또는 그 일부)는 핵산에 의해 코딩된다. 일반적으로, 상기 핵산은 적어도 1개의 선택적 코돈, 적어도 2개의 선택적 코돈, 적어도 3개의 선택적 코돈, 적어도 4개의 선택적 코돈, 적어도 5개의 선택적 코돈, 적어도 6개의 선택적 코돈, 적어도 7개의 선택적 코돈, 적어도 8개의 선택적 코돈, 적어도 9개의 선택적 코돈, 또는 10개 이상의 선택적 코돈을 포함한다.

[0215] 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는, 예를 들어, 비천연 아미노산의 도입을 위한 하나 이상의 선택적 코돈을 포함하도록, 당업자에게 공지되어 있고 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 선택적 코돈을 포함하도록 관심있는 단백질에 대한 핵산을 돌연변이시켜, 하나 이상의 비천연 아미노산이 도입되도록 할 수 있다. 본 발명은, 예를 들어 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는, 임의의 단백질의 임의의 그러한 변이체(돌연변이체, 변형체(version)를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함한다. 유사하게, 본 발명은 또한 상응하는 핵산, 즉, 하나 이상의 비천연 아미노산을 코딩하는 하나 이상의 선택적 코돈을 갖는 임의의 핵산을 포함한다.

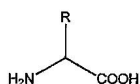
[0216] FGF-21 폴리펩티드와 같은 관심있는 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 상기 폴리펩티드의 임의의 원하는 위치에 시스테인이 도입되도록 용이하게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 중합체, 단백질 또는 다중 다양한 다른 분자를 관심있는 단백질로 도입하는 데 널리 사용된다. 시스테인을 폴리펩티드의 원하는 위치로 도입하기에 적합한 방법은, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함되는 미국 특허 제6,608,183호에 기재된 방법 및 표준 돌연변이 유발 기법 등 당업자에게 공지되어 있다.

[0217] IV. 비천연적으로 코딩된 아미노산

[0218] 다중 다양한 비천연적으로 코딩된 아미노산이 본 발명에 사용하기에 적합하다. 임의의 수의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21 폴리펩티드로 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20종의 유전적으로 코딩된 아미노산(즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린)에 대하여 실질적으로 화학적 활성을 나타내지 않는다. 일부 실시형태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20종의 일반 아미노산에 존재하지 않는 작용기와 효율적 및 선택적으로 반응하여 안정한 접합체를 형성하는 측쇄 작용기(아지도, 케톤, 알데히드 및 아미노옥시 기를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 포함한다. 예를 들어, 아지도 작용기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드는 중합체[폴리(에틸렌 글리콜)]를 포함하나 이에 한정되지 않음]와 반응하거나, 또는 대안으로, 알킨 부분을 포함하는 제2의 폴리펩티드와 반응하여, 아지도 및 알킨 작용기의 선택적 반응으로 이어지는 안정한 접합체를 형성함으로써 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응 생성물을 형성할 수 있다.

[0219] α -아미노산의 일반 구조는 다음과 같이(화학식 I) 예시된다:

I



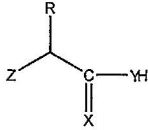
[0220]

[0221] 비천연적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 R 기가 20종의 천연 아미노산에서 사용되는 것이 아닌 임의의 치환기인 상기에 기재된 화학식을 갖는 임의의 구조이며, 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있다. 본 발명의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 측쇄의 구조만이 천연 아미노산과 다르며, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 이들이 자연 발생 폴리펩티드에서 형성되는 것과 동일한 방식으로 다른 아미노산(천연 아미노산 또는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하나 이에 한정되지 않음)과 아미드 결합을 형성한다. 그러나, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 천연 아미노산과 이들을 구별하는 측쇄를 갖는다. 예를 들어, R은 임의로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 하이드록실-, 하이드라진, 시아노-, 할로-, 하이드라지드, 알케닐, 알킬닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 설폰일-, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭, 에논, 이민, 알데히드, 에스테르, 티오산, 하이드록실아민, 아미노 기 등, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 관심있는 다른 비천연 아미노산으로는 광활성화 가능한 가교결합제를 포함하는 아미노산, 스핀 표지 아미노산, 형광 아미노산, 금속 결합 아미노산, 금속 함유 아미노산, 방사능 아미노산, 신규한 작용기를 갖는 아미노산, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 아미노산, 광케이지된 및/또는 광이성질체화 가능한 아미노산, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 포함하는 아미노산, 글리코실화된 아미노산, 예컨대 당 치환된 세린, 탄수화물에 의해 변형된 다른 아미노산, 케토 함유 아미노산, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르를 포함하는 아미노산, 중원자 치환된 아미노산, 화학적으로 절단 가능한 및/또는 광절단 가능한 아미노산, 천연 아미노산에 비해 연장된 측쇄(폴리에테르 또는 탄소 원자수가 약 5를 초과하거나 약 10을 초과하는(이에 한정되지 않음) 장쇄 탄화수소를 포함함)을 갖는 아미노산, 탄소 결합 당 함유 아미노산, 산화환원 활성 아미노산, 아미노 티오산 함유 아미노산 및 하나 이상의 독성 부분을 포함하는 아미노산을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

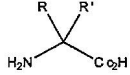
[0222] 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있고 수용성 중합체와의 반응에 유용한 비천연적으로 코딩된 예시적인 아미노산은 카보닐, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드, 세미카바지드, 아지도 및 알킨 반응기를 갖는 것들을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 사카라이드 부분을 포함한다. 이러한 아미노산의 예로는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린이 있다. 또한, 이러한 아미노산의 예로는, 아미노산과 사카라이드 사이의 천연 N 결합 또는 O 결합이 알켄, 옥심, 티오에테르, 아미드 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는, 자연에 일반적으로 존재하지 않는 공유 결합에 의해 치환되는 예들을 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 또한 천연 단백질에서는 일반적으로 존재하지 않는 사카라이드, 예컨대 2-데옥시-글루코스, 2-데옥시갈락토스 등이 있다.

[0223] 본 명세서에 제공된 비천연적으로 코딩된 아미노산 중 다수는, 예를 들어 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스 소재), Novabiochem(독일 담슈타트 소재의 EMD Biosciences의 지사), 또는 Peptech(미국 매사추세츠주 버링턴 소재)에서 시판된다. 시판되지 않는 것들은 경우에 따라 본 명세서에 기재된 바와 같이 또는 당업자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 합성한다. 유기 합성 기법의 경우, 예를 들어 문헌[Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.)]; 문헌[Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]; 및 문헌[Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조할 수 있다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호도 참조할 수 있다. 신규한 측쇄를 포함하는 비천연 아미노산에 더하여, 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산은 또한 하기 화학식 II 및 III의 구조로 예시되는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 변형된 골격 구조를 임의로 포함한다:

II



III



[0224]

[0225]

상기 식에서, Z는 일반적으로 OH, NH₂, SH, NH-R' 또는 S-R'을 포함하고; X 및 Y는 동일하거나 상이할 수 있으며 일반적으로 S 또는 O를 포함하며; R 및 R'은 경우에 따라 동일하거나 상이하며 일반적으로 화학식 I로 표시되는 상기 비천연 아미노산에 대해 상기에 기재된 R 기에 대한 구성요소와 동일한 리스트 및 수소로부터 선택된다. 예를 들어, 본 발명의 비천연 아미노산은 경우에 따라 화학식 II 및 III으로 예시되는 바와 같이 아미노 또는 카복실 기에서 치환을 포함한다. 이러한 유형의 비천연 아미노산은 20종의 일반 천연 아미노산에 해당하는 측쇄 또는 비천연 측쇄를 갖는 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 α-하이드록시산, α-티오산, α-아미노티오카복실레이트를 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 또한, α-탄소에서의 치환은 경우에 따라 L, D 또는 α-α 이치환 아미노산, 예컨대 D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-타이로신, 아미노부티르산 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 다른 구조적 대응물로는 환형 아미노산, 예컨대 프롤린 유사체 및 3원, 4원, 6원, 7원, 8원 및 9원 고리 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산, 예컨대 치환된 β-알라닌 및 γ-아미노 부티르산을 포함한다.

[0226]

다수의 비천연 아미노산이 천연 아미노산, 예컨대 타이로신, 글루타민, 페닐알라닌 등에 기반을 둔 것으로 본 발명에 사용하기에 적합하다. 타이로신 유사체는 파라 치환 타이로신, 오르토 치환 타이로신 및 메타 치환 타이로신을 포함하나 이들에 한정되지 않으며, 여기에서 치환 타이로신은 케토기(아세틸기를 포함하나 이에 한정되지 않음), 벤조일기, 아미노기, 하이드라진기, 하이드록시아민기, 티올기, 카복시기, 이소프로필기, 메틸기, C₆-C₂₀ 직쇄형 또는 분지쇄형 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸기, 폴리에테르기, 니트로기, 알킬닐기 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 그 밖에도, 다중 치환된 아릴 고리 역시 고려된다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 글루타민 유사체는 α-하이드록시 유도체, γ 치환 유도체, 환형 유도체 및 아미드 치환 글루타민 유도체를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 페닐알라닌 유사체의 예로는 파라 치환 페닐알라닌, 오르토 치환 페닐알라닌 및 메타 치환 페닐알라닌을 들 수 있으며, 여기서 치환기는 하이드록시기, 메톡시기, 메틸기, 알킬기, 알데히드, 아지도, 요오도, 브로모, 케토기(아세틸기를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 벤조일, 알킬닐기 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산의 구체적인 예로는 p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-타이로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-타이로신, 4-프로필-L-타이로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ-세린, L-Dopa, 불화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노타이로신, p-요오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌 및 p-프로파길옥시-페닐알라닌 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 다양한 비천연 아미노산의 구조의 예가, 예를 들어, WO 2002/085923(발명의 명칭: "In vivo incorporation of unnatural amino acids")에 제시되어 있다. 추가적인 메티오닌 유사체에 대해서는, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24]도 참조할 수 있다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 국제 출원 PCT/US06/47822(발명의 명칭: "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides")는 p-아미노-페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 방향족 아민 부분의 환원적 알킬화 및 환원적 아민화에 관해 기재한다.

[0227]

일 실시형태에서, 비천연 아미노산(예컨대, p-(프로파길옥시)-페닐알라닌)을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 조성물이 제공된다. p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 및 단백질 및/또는 세포(이를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함하는 다양한 조성물 역시 제공된다. 일 양태에서, 상기 p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 비천연 아미노산을 포함하는 조성물은 오르토고날 tRNA를 추가로 포함한다. 상기 비천연 아미노산은, 아미노아실 결합을 통해 오르토고날 tRNA에 공유 결합되는 것, 오르토고날 tRNA의 말단 리보스 당의 3'OH 또는 2'OH에 공유 결합되는 것 등을

비롯하여, 상기 오르토고날 tRNA에 결합(공유 결합을 포함하나, 이에 한정되지 않음)될 수 있다.

[0228] 비천연 아미노산을 통해 단백질로 도입될 수 있는 화학적 부분은 단백질의 다양한 이점 및 조작을 제공한다. 예를 들어, 케토 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해 시험관내 및 생체내에서 다수의 하이드라진 또는 하이드록실아민 함유 반응제 중 임의의 것에 의한 단백질의 선택적 변형을 가능하게 한다. 예를 들어, 중원자 비천연 아미노산이 X선 구조 데이터의 페이징(phasing)에 유용할 수 있다. 비천연 아미노산을 사용하는 중원자의 부위 특이적 도입은 또한 중원자의 위치를 선택함에 있어서 선택성과 융통성을 제공한다. 예를 들어, 광반응성 비천연 아미노산[벤조페논 및 아릴아지드(페닐아지드를 포함하나 이에 한정되지 않음) 측쇄를 갖는 아미노산을 포함하나, 이들에 한정되지 않음]은 단백질의 생체내 및 시험관내 광가교결합이 효율적으로 이루어지게 한다. 광반응성 비천연 아미노산의 예로는 p-아지도-페닐알라닌 및 p-벤조일-페닐알라닌을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 그 후, 광반응성 비천연 아미노산을 갖는 단백질은 광반응성 기를 제공하는 일시적 제어의 여기에 의해 임의로 광가교결합될 수 있다. 일례로서, 비천연 아미노의 메틸기는, 핵 자기 공명 및 진동 분광분석법의 이용을 포함하나 이들에 한정되지 않는 방법에 의해 국소 구조 및 역학의 프로브로서, 동위원소로 표지된 메틸기를 포함하나 이에 한정되지 않는 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 알킬닐 또는 아지도 작용기는, [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 분자에 의한 단백질의 선택적 변형을 가능하게 한다.

[0229] 폴리펩티드의 아미노 말단으로 도입되는 비천연 아미노산은, 20종의 천연 아미노산에서 사용되는 것이 아닌 임의의 치환기인 R 기와, α-아미노산에 일반적으로 존재하는 NH₂ 기와는 다른 제2의 반응기로 이루어질 수 있다(화학식 I 참조). 유사한 비천연 아미노산이 α-아미노산에 일반적으로 존재하는 COOH 기와는 다른 제2의 반응기에 의해 카복시 말단에 도입될 수 있다(화학식 I 참조).

[0230] 본 발명의 비천연 아미노산은 20종의 천연 아미노산에서 이용되지 않는 부가적인 특성을 제공하도록 선택 또는 디자인될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산은 경우에 따라, 예를 들어 이들이 도입되는 단백질의 생물학적 특성을 변경하도록 디자인 또는 선택될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산을 폴리펩티드 내로 포함시킴으로써 경우에 따라 하기 특성들을 변경할 수 있다: 독성, 생체내 분포, 용해도, 안정성, 예를 들어, 열 안정성, 가수분해 안정성, 산화 안정성, 효소 분해에 대한 내성 등, 정제 및 가공의 용이성, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매 활성, 산화환원 전위, 반감기, 다른 분자와 반응할 수 있는 능력(예를 들어, 공유합 또는 비공유적으로) 등.

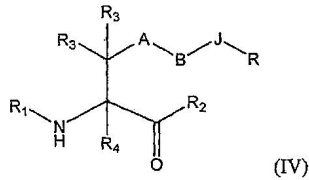
[0231] 비천연 아미노산의 구조 및 합성: 카보닐, 카보닐 유사, 마스킹된 카보닐, 보호된 카보닐기 및 하이드록실아민기

[0232] 일부 실시형태에서, 본 발명은 옥심 결합에 의해 수용성 중합체(예를 들어, PEG)에 연결된 FGF-21을 제공한다.

[0233] 많은 유형의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 옥심 결합의 형성에 적합하다. 이들은 카보닐, 디카보닐, 또는 하이드록실아민 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 이같은 아미노산들은 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 제2006/0217532호, 제2006/0217289호 및 WO 2006/069246(발명의 명칭: "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides)에 기재되어 있다. 비천연적으로 코딩된 아미노산은 또한 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제7,083,970호 및 미국 특허 제7,045,337호에도 기재되어 있다.

[0234] 본 발명의 일부 실시형태는 하나 이상의 위치에서 파라-아세틸페닐알라닌 아미노산으로 치환된 FGF-21 폴리펩티드를 이용한다. p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성에 대해서는, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Zhang, Z., et al., Biochemistry 42:6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카보닐- 또는 디카보닐 함유 아미노산도 당업자가 유사하게 제조할 수 있다. 또한, 본원에 포함되는 비천연 아미노산의 비한정적인 예시적 합성은 본 명세서에서 그 전체를 참고로 인용하는 미국 특허 제7,083,970호의 도 4, 24~34에 제시되어 있다.

[0235] 친전자성 반응기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 첨가 반응을 통해 분자를 연결하는 다양한 반응을 가능하게 한다. 이러한 친전자성 반응기로는 카보닐기(케톤기 및 디카보닐기를 포함함), 카보닐 유사 기[(케토기 및 디카보닐기를 비롯한) 카보닐기와 유사한 반응성을 가지며 카보닐기와 구조적으로 유사함], 마스킹된 카보닐기[(케토기 및 디카보닐기를 비롯한) 카보닐기로 용이하게 전환될 수 있음], 또는 보호된 카보닐기[탈보호시(케토기 및 디카보닐기를 비롯한) 카보닐기와 유사한 반응성을 지님]를 포함한다. 이러한 아미노산은 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 아미노산을 포함한다:



[0236]

[0237]

[0238]

상기 식에서,

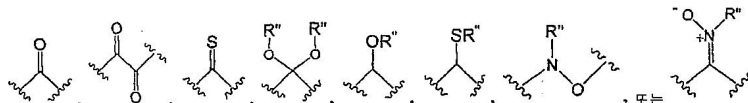
A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0239]

B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이며;

[0240]

J는



이고;

[0241]

R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0242]

각각의 R"은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 또는 보호기이거나, 또는 1개보다 많은 R" 기가 존재할 경우, 2개의 R"이 임의로 헤테로시클로알킬을 형성하며;

[0243]

R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0244]

R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0245]

R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 H, 할로젠, 저급 알킬, 또는 치환된 저급 알킬이거나, 또는 R₃과 R₄, 또는 2개의 R₃가 임의로 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬을 형성하거나; 또는

[0246]

-A-B-J-R 기가 함께 디카보닐기, 보호된 디카보닐기를 비롯한 보호된 카보닐기, 또는 마스킹된 디카보닐기를 비롯한 마스킹된 카보닐기를 비롯한 하나 이상의 카보닐기를 포함하는 이환 또는 삼환 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬을 형성하거나; 또는

[0247]

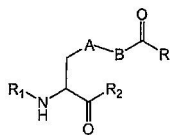
-J-R 기가 함께 디카보닐기, 보호된 디카보닐기를 비롯한 보호된 카보닐기, 또는 마스킹된 디카보닐기를 비롯한 마스킹된 카보닐기를 비롯한 하나 이상의 카보닐기를 포함하는 이환 또는 삼환 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬을 형성하고;

[0248]

단, A가 페닐렌이고 각각의 R₃이 H인 경우, B는 존재하고; A가 -(CH₂)₄이고 각각의 R₃이 H인 경우, B는 -NHC(O)(CH₂CH₂)-가 아니며; A와 B가 존재하지 않고 각각의 R₃이 H인 경우, R은 메틸이 아니다.

[0249]

또한, 하기 화학식 (V)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(V)

[0250]

[0251]

상기 식에서,

[0252]

A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0253]

B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이며;

[0254]

R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이고;

[0255]

R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0256]

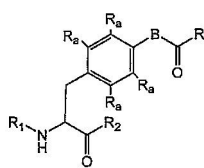
R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0257]

단, A가 페닐렌인 경우, B는 존재하고; A가 -(CH₂)₄인 경우, B는 -NHC(O)(CH₂CH₂)-가 아니며; A와 B가 존재하지 않을 경우, R은 메틸이 아니다.

[0258]

또한, 하기 화학식 (VI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(VI)

[0259]

[0260]

상기 식에서,

[0261]

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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이고;

[0262]

R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0263]

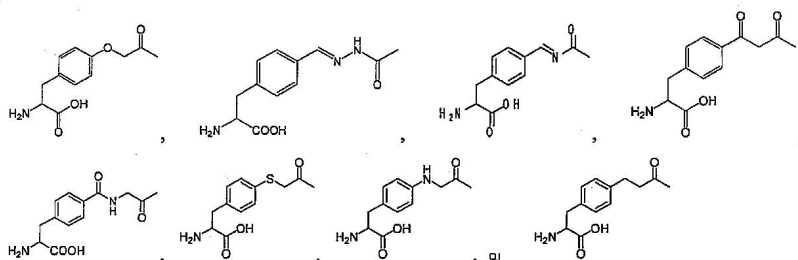
R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드

이고;

[0264] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0265] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택된다.

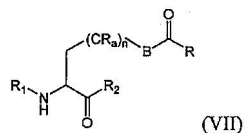
[0266] 또한, 하기 아미노산이 포함된다:



[0267]

[0268] 여기서, 이 화합물들은 임의로 아미노 보호된 기, 카복실 보호된 기 또는 이들의 염이다. 또한, 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0269] 또한, 하기 화학식 (VII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0270]

[0271] 상기 식에서,

[0272] B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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)-, $-S(O)_k-$ (여기서, 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 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이고;

[0273] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

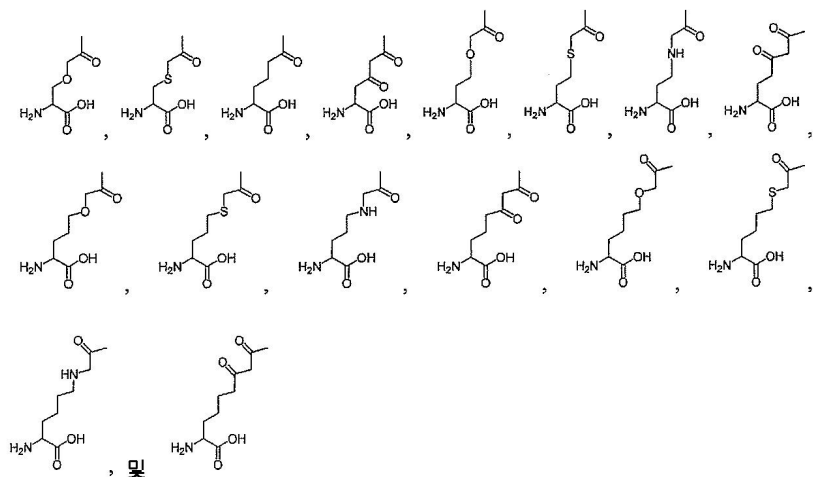
[0274] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 이고;

[0275] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0276] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되며; n은 0~8이고;

[0277] 단, A가 $-(CH_2)_4-$ 인 경우, B는 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 가 아니다.

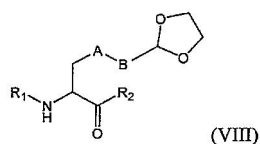
[0278] 또한, 하기 아미노산이 포함된다:



[0279]

[0280] 여기서, 이러한 화합물들은 임의로 아미노 보호된 것, 임의로 카복실 보호된 것, 임의로 아미노 보호 및 카복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0281] 또한, 하기 화학식 (VIII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0282]

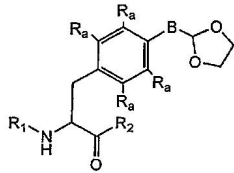
[0283] 상기 식에서, A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0284] B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이며;

[0285] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0286] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이다.

[0287] 또한, 하기 화학식 (IX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(IX)

B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이고;

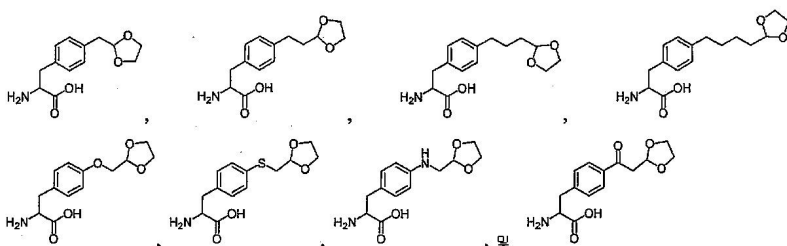
R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 이고;

R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

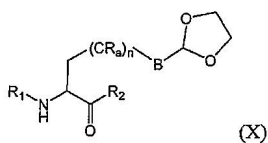
여기서 각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택된다.

또한, 하기 아미노산이 포함된다:



여기서, 이러한 화합물들은 임의로 아미노 보호된 것, 임의로 카복실 보호된 것, 임의로 아미노 보호 및 카복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

또한, 하기 화학식 (X)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(X)

상기 식에서, B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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 $-C(R')_2-N(R')-N(R')$ -(여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이고;

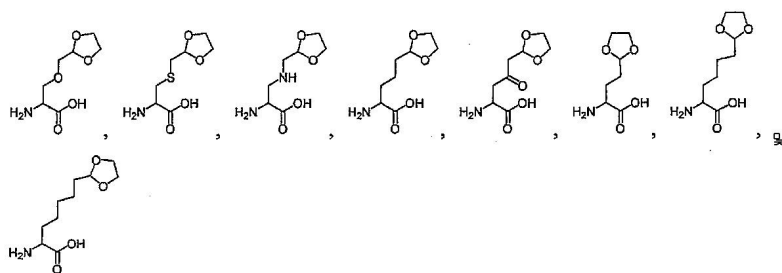
[0300] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0301] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 이고;

[0302] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0303] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되고; n 은 0~8이다.

[0304] 또한, 하기 아미노산이 포함된다:

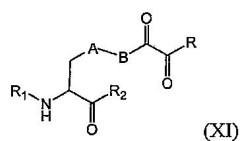


[0305]

[0306] 여기서, 이러한 화합물들은 임의로 아미노 보호된 것, 임의로 카복실 보호된 것, 임의로 아미노 보호 및 카복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0307] 모노카보닐 구조 이외에도, 본 명세서에 기재된 비천연 아미노산은 디카보닐기, 디카보닐 유사 기, 마스킹된 디카보닐기 및 보호된 디카보닐기와 같은 기를 포함할 수 있다.

[0308] 예를 들어, 하기 화학식 (XI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0309]

[0310] 상기 식에서, A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0311] B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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)-, $-S(O)_k$ -(여기서, 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)-, $-N(R')C(O)O$ -, $-S(O)_kN(R')$ -, $-N(R')C(O)N(R')$ -, $-N(R')C(S)N(R')$ -, $-N(R')S(O)_kN(R')$ -, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')$ -,

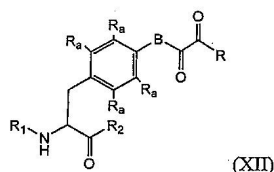
$-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되는 링커이며;

[0312] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이고;

[0313] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0314] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이다.

[0315] 또한, 하기 화학식 (XII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0316]

[0317] B 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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)-, $-S(O)_k-$ (여기서, 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 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되고;

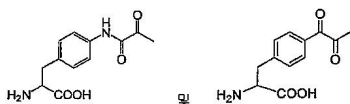
[0318] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0319] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0320] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0321] 여기서, 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택된다.

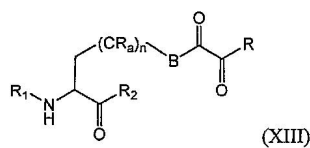
[0322] 또한, 하기 아미노산이 포함된다:



[0323]

[0324] 여기서, 이러한 화합물들은 임의로 아미노 보호된 것, 임의로 카복실 보호된 것, 임의로 아미노 보호 및 카복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0325] 또한, 하기 화학식 (XIII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0326]

[0327] 상기 식에서, B는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 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-(여기서, 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')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되고;

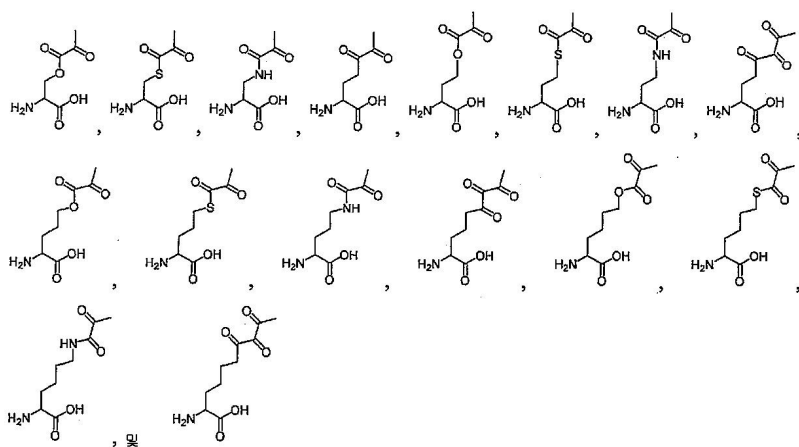
[0328] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0329] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0330] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0331] 각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택되고; n은 0~8이다.

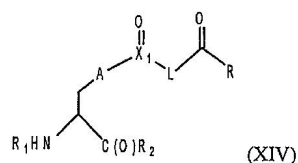
[0332] 또한, 하기 아미노산이 포함된다:



[0333]

[0334] 여기서, 이러한 화합물들은 임의로 아미노 보호된 것, 임의로 카복실 보호된 것, 임의로 아미노 보호 및 카복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0335] 또한, 하기 화학식 (XIV)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0336]

[0337] 상기 식에서,

[0338] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

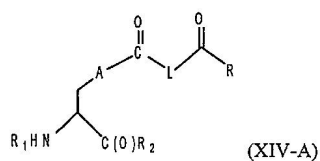
[0339] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0340] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0341] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0342] X₁은 C, S, 또는 S(O)이고; L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

[0343] 또한, 하기 화학식 (XIV-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0344]

[0345] 상기 식에서,

[0346] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

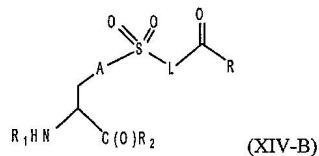
[0347] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0348] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0349] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0350] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

[0351] 또한, 하기 화학식 (XIV-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0352]

[0353] 상기 식에서,

[0354] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

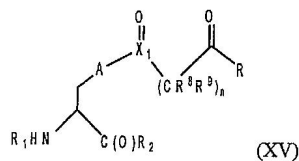
[0355] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0356] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0357] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0358] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

[0359] 또한, 하기 화학식 (XV)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0360]

[0361] 상기 식에서,

[0362] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

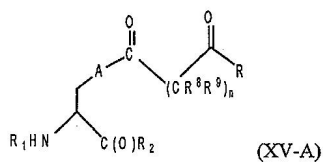
[0363] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0364] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0365] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0366] X₁은 C, S, 또는 S(O)이고; n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며; 각각의 CR⁸R⁹ 기 상의 각각의 R⁸ 및 R⁹는 독립적으로 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 구성된 군에서 선택되거나, 또는 임의의 R⁸과 R⁹는 함께 =O 또는 시클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R⁸ 기가 함께 시클로알킬을 형성할 수 있다.

[0367] 또한, 하기 화학식 (XV-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0368]

[0369] 상기 식에서,

[0370] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

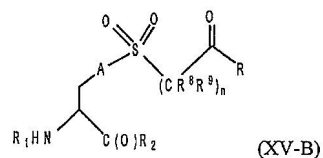
[0371] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0372] R1은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0373] R2는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0374] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 각각의 CR8R9 기 상의 각각의 R8 및 R9는 독립적으로 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 구성된 군에서 선택되거나, 또는 임의의 R8과 R9는 함께 =O 또는 시클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R8 기가 함께 시클로알킬을 형성할 수 있다.

[0375] 또한, 하기 화학식 (XV-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0376]

[0377] 상기 식에서,

[0378] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

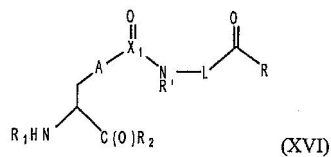
[0379] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0380] R1은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0381] R2는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0382] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고; 각각의 CR8R9 기 상의 각각의 R8 및 R9는 독립적으로 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 구성된 군에서 선택되거나, 또는 임의의 R8과 R9는 함께 =O 또는 시클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R8 기가 함께 시클로알킬을 형성할 수 있다.

[0383] 또한, 하기 화학식 (XVI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0384]

[0385] 상기 식에서,

[0386] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

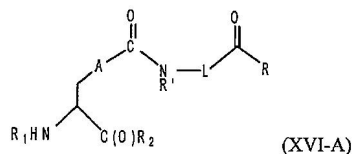
[0387] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0388] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0389] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0390] X₁은 C, S, 또는 S(O)이고; L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

[0391] 또한, 하기 화학식 (XVI-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0392]

[0393] 상기 식에서,

[0394] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

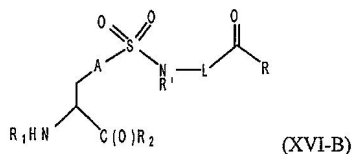
[0395] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0396] R₁은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0397] R₂는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0398] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

[0399] 또한, 하기 화학식 (XVI-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0400]

[0401] 상기 식에서,

[0402] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

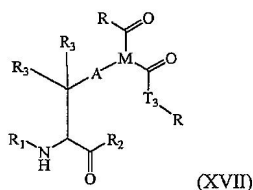
[0403] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0404] R1은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이고;

[0405] R2는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0406] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)(여기서, R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬임)이다.

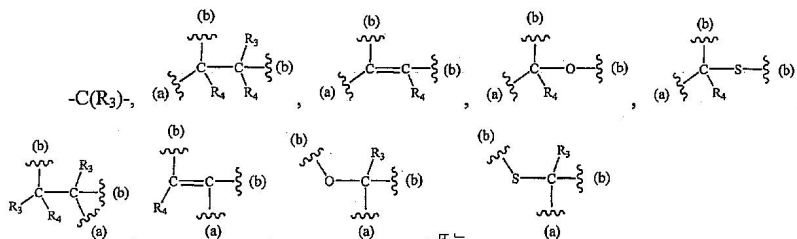
[0407] 또한, 하기 화학식 (XVII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0408]

[0409] 상기 식에서,

[0410] A는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 시클로알킬렌, 치환된 저급 시클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로시클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;



[0411] M은

이며,

[0412] 여기서, (a)는 A 기에 대한 결합을 나타내고, (b)는 각각의 카보닐기에 대한 결합을 나타내며, R3 및 R4는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R3과 R4, 또는 2개의 R3 기 또는 2개의 R4 기가 임의로 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬을 형성하고;

[0413] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이고;

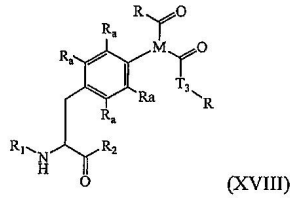
[0414] T3은 결합, C(R)(R), O 또는 S이고, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이

며;

[0415] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 이고;

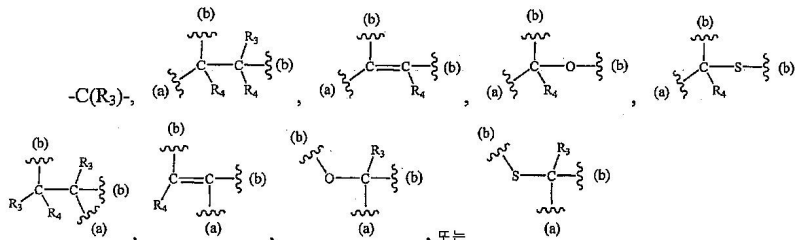
[0416] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이다.

[0417] 또한, 하기 화학식 (XVIII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0418]

[0419] 상기 식에서,



[0420]

이고,

[0421] 여기서, (a)는 A 기에 대한 결합을 나타내고, (b)는 각각의 카보닐기에 대한 결합을 나타내며, R_3 및 R_4 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R_3 과 R_4 , 또는 2개의 R_3 기 또는 2개의 R_4 기가 임의로 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬을 형성하고;

[0422] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

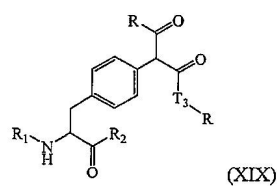
[0423] T_3 은 결합, $C(R)(R)$, O 또는 S이고, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이며;

[0424] R_1 은 임의적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 이고;

[0425] R_2 는 임의적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0426] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0427] 또한, 하기 화학식 (XIX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

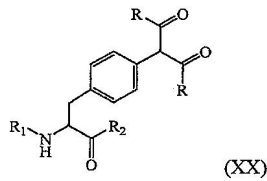


[0428]

[0429] 상기 식에서,

[0430] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이고; T₃은 O 또는 S이다.

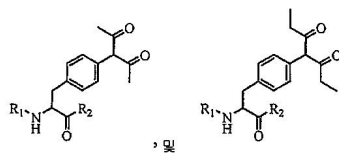
[0431] 또한, 하기 화학식 (XX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0432]

[0433] 상기 식에서, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 시클로알킬, 또는 치환된 시클로알킬이다.

[0434] 또한, 하기 화학식 (XXI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0435]

[0436] 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 반응성 카보닐 또는 디카보닐 작용기를 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 컨주게이션 반응에 유용한 알데히드 작용기는 인접 아미노 및 하이드록실기를 갖는 작용기로부터 생성될 수 있다. 상기 생물학적 활성 분자가 폴리펩티드일 경우, 예를 들어, N 말단 세린 또는 트레오닌(정량적으로 존재하거나 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이, 과요오드산염을 사용한 온화한 산화적 절단 조건하에 알데히드 작용기를 생성시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3:262-268 (1992)]; 문헌[Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; 문헌[Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)]을 참조할 수 있다. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩티드 또는 단백질의 N 말단의 아미노산에 국한된다.

[0437] 본 발명에 있어서, 인접 하이드록실 및 아미노 기를 갖는 비천연 아미노산이 "마스킹된" 알데히드 작용기로서 폴리펩티드 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시라이신은 엡실론 아민에 인접하게 하이드록실기를 보유한다. 상기 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 일반적으로 폴리펩티드 내의 다른 부위에서의 산화를 피하기 위해 온화한 조건하에 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩티드의 완충액에 약 1.5배 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가한 후, 약 10분 동안 암소에서 항온처리하는 것을 포함한다. 이에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제6,423,685호를 참조할 수 있다.

[0438] 상기 카보닐 또는 디카보닐 작용기는 수용액 중에서 온화한 조건하에 하이드록실아민 함유 반응제와 선택적으로 반응하여, 생리학적 조건하에 안정한 상응하는 옥심 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)]; 문헌[Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조할 수 있다. 또한, 상기 카보닐기 또는 디카보닐기는 그 특유의 반응성으로 인해 다른 아미노산 측쇄 존재하에서의 선택적인 변형이 가능하다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)]; 문헌[Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; 문헌[Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조할 수 있다.

[0439] **비천연 아미노산의 구조 및 합성: 하이드록실아민 함유 아미노산**

[0440] 미국 가특허 출원 제60/638,418호는 본 명세서에서 그 전체가 참고로 인용된다. 따라서, 미국 가특허 출원 제60/638,418호의 섹션 V(제목: "Non-natural Amino Acids"), 파트 B(제목: "Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids")에 제공된 개시내용은 본 명세서에 기재된 비천연 아미노산, 비천연 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비천연 아미노산 폴리펩티드를 제조하고, 정제하고, 특성 분석하고, 사용하는 방법, 조성물(화학식 I~XXXV를 포함함), 기법 및 전략법에, 그러한 개시내용이 본 명세서에 전부 제시된 것과 같은 정도로 전부가 적용된다. 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 제2006/0217532호 및 제2006/0217289호 및 WO 2006/069246(발명의 명칭: "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides")도 그 전체가 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0441] 비천연 아미노산의 화학적 합성

[0442] 본 발명에 사용하기에 적합한 비천연 아미노산 중 다수는 Sigma(USA) 또는 Aldrich(미국 위스콘신주 밀워키 소재)에서 시판된다. 시판되지 않는 것은 경우에 따라 본 명세서에 기재된 바와 같이 또는 다양한 간행물에 기재된 바와 같이 또는 당업자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 합성한다. 유기 합성 기법에 대해서는, 예를 들어 문헌[Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.)]; 문헌[Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]; 및 문헌[Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조할 수 있다. 비천연 아미노산의 합성에 관해 기술하는 그 밖의 간행물로는, 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]; 문헌[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]; 문헌[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]; 문헌[Craig, J.C. et al., (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinolin (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170]; 문헌[Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5]; 문헌[Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866]; 문헌[Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine]; 문헌[Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246]; 문헌[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 문헌[Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7]을 들 수 있다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 US 2004/0198637호(발명의 명칭: "Protein Arrays")도 참조할 수 있다.

[0443] A. 카보닐 반응기

[0444] 카보닐 반응기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 첨가 반응 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자(PEG 또는 다른 수용성 분자를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 연결하는 다양한 반응을 가능하게 한다.

[0445] 대표적인 카보닐 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0447] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이며; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이며; R₄는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, R₂는 단순 알킬(즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이고, 케톤 부분은 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, R₂는 단순 알킬(즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이고, 케톤 부분은 알킬 측쇄에 대해 메타 위치에 위치한다.

[0448] p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성에 대해서는, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Zhang, Z., et al., Biochemistry 42:6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카보닐 함유 아미노산도 당업자에 의해 유사하게 제조될 수 있다.

[0449] 일부 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 반응성 카보닐 작용기를 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 컨주게이션 반응에 유용한 알데히드 작용기는 인접 아미노 및 하이드록실기를 갖는 작용기로부터 생성될 수 있다. 상기 생물학적 활성 분자가 폴리펩티드일 경우, 예를 들어, N 말단 세린 또는 트레오닌(정상적으로 존재하거나 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이, 과요오드산염을

사용한 온화한 절단 조건하에 알데히드 작용기를 생성시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3:262-268 (1992)]; 문헌[Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; 문헌[Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)]을 참조할 수 있다. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩티드 또는 단백질의 N 말단의 아미노산에 국한된다.

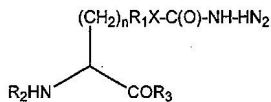
[0450] 본 발명에 있어서, 인접 하이드록실 및 아미노 기를 갖는 비천연적으로 코딩된 아미노산이 "마스킹된" 알데히드 작용기로서 폴리펩티드 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시라이신은 엡실론 아민에 인접하게 하이드록실기를 보유한다. 상기 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 일반적으로 폴리펩티드 내의 다른 부위에서의 산화를 피하기 위해 온화한 조건하에 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩티드의 완충액에 약 1.5배 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가한 후, 약 10분 동안 암소에서 항온처리하는 것을 포함한다. 이에 대해서는, 예를 들어, 본 명세서에서 참고로 인용하는 미국 특허 제6,423,685호를 참조할 수 있다.

[0451] 상기 카보닐 작용기는 수용액 중에서 온화한 조건하에 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민 또는 세미카바지드 함유 반응제와 선택적으로 반응하여, 생리학적 조건하에 안정한 상응하는 하이드라존, 옥심 또는 세미카바존 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)]; 문헌[Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조할 수 있다. 또한, 상기 카보닐기는 그 특유의 반응성으로 인해 다른 아미노산 측쇄 존재하에서의 선택적인 변형을 가능하게 한다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)]; 문헌[Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; 문헌[Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조할 수 있다.

[0452] B. 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드 반응기

[0453] 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드와 같은 친핵성 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다양한 친전자성 기와 반응하여 컨쥬게이트(PEG 또는 다른 수용성 중합체를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 형성할 수 있게 한다.

[0454] 대표적인 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카바지드 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0455] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, 또는 S이거나, 존재하지 않고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이며; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다.

[0457] 일부 실시형태에서, n은 4이고, R₁은 존재하지 않으며, X는 N이다. 일부 실시형태에서, n은 2이고, R₁은 존재하지 않으며, X도 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, 산소 원자는 아릴 고리 상의 지방족 기에 대해 para 위치에 위치한다.

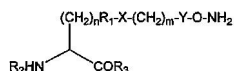
[0458] 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카바지드 함유 아미노산은 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, L-글루타메이트-γ-하이드라지드는 Sigma Chemical(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수할 수 있다. 상업적으로 입수할 수 없는 다른 아미노산은 당업자가 제조할 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제6,281,211호를 참조할 수 있으며, 이 특허 문헌은 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함한다.

[0459] 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카바지드 작용기를 보유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 작용기를 포함하는 다양한 분자와 효율적 및 선택적으로 반응할 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조할 수 있다. 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카바지드 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해 20종의 일반 아미노산에 존재하는 친핵성 기(세린 또는 트레오닌의 하이드록실기 또는 라이신 및 N 말단의 아미노기를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)에 비해 알데히드, 케톤 및 다른 친전자성 기에 대해 현저히 더 큰 반응성을 갖게 된다.

[0460] **C. 아미노옥시 함유 아미노산**

[0461] 아미노옥시(하이드록실아민이라고도 함) 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산은, 다양한 친전자성 기와의 반응에 의해 컨쥬게이트(PEG 또는 다른 수용성 중합체를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 형성할 수 있게 한다. 하이드라진, 하이드라지드 및 세미카바지드와 마찬가지로, 아미노옥시기의 증대된 친핵성은, 이것이 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 작용기를 포함하는 다양한 분자와 효율적이고 선택적으로 반응할 수 있게 한다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]; 문헌[H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34:727-736 (2001)]을 참조할 수 있다. 하이드라진 기와의 반응의 경과는 상응하는 하이드라존이지만, 아미노옥시기와 카보닐 함유 기(예컨대 케톤)의 반응으로부터 일반적으로 옥심이 생성된다.

[0462] 아미노옥시기를 포함하는 대표적인 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0463]

[0464] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나, 존재하지 않으며; m은 0~10이고; Y는 C(O)이거나 존재하지 않으며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시 형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, m은 1이며, Y는 존재한다. 일부 실시 형태에서, n은 2이고, R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이고, Y는 존재하지 않는다.

[0465] 아미노옥시 함유 아미노산은 용이하게 입수할 수 있는 아미노산 전구체(호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 제조될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68:8853-8858 (2003)]을 참조할 수 있다. 특정 아미노옥시 함유 아미노산, 예컨대 L-2-아미노-4-(아미노옥시)부티르산이 천연 공급원으로부터 분리되었다[Rosenthal, G., Life Sci. 60:1635-1641 (1997)]. 다른 아미노옥시 함유 아미노산은 당업자가 제조할 수 있다.

[0466] **D. 아지드 및 알킨 반응기**

[0467] 아지드 및 알킨 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해 폴리펩티드 및 다른 생물학적 분자의 선택적인 변형에 매우 유용하다. 유기 아지드, 특히 지방족 아지드 및 알킨은 일반적으로 통상적인 반응성 화학 조건에 대해 안정하다. 특히, 아지드 작용기와 알킨 작용기는 둘 다 자연 발생 폴리펩티드에 존재하는 20종의 일반 아미노산의 측쇄(즉, R 기)에 대해 비활성이다. 그러나, 아지드기와 알킨기가 가까이 접하게 될 경우, 이들 기의 "스프링 장착" 성질이 나타나서, 이들이 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 선택적이고 효율적으로 반응하여 상응하는 트리아졸을 형성한다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Chin J., et al., Science 301:964-7 (2003)]; 문헌[Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)]; 문헌[Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]을 참조할 수 있다.

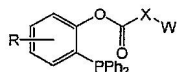
[0468] 상기 Huisgen 고리화첨가 반응은 친핵성 치환 반응이 아니라 선택적인 고리화첨가 반응을 수반하기 때문에[참고 문헌: Padwa, A., in COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176], 아지드 및 알킨 함유 측쇄를 보유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 도입이, 생성된 폴리펩티드가 비천연적으로 코딩된 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형될 수 있게 한다. 아지드 또는 알킨 함유 FGF-21 폴리펩티드를 관련시키는 고리화첨가 반응은, 계내에서 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키기 위한 환원제 존재하에 촉매량의 Cu(II)(촉매량의 CuSO₄의 형태를 포함하나, 이에 한정되지 않음)의 첨가에 의해 수성 조건하에 실온에서 수행될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)]; 문헌[Tornoe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002)]; 문헌[Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)]을 참조할 수 있다. 대표적인 환원제로는 아스코르베이트, 금속 구리, 퀴닌, 하이드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe²⁺, Co²⁺ 및 인가 전위를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0469] 일부 경우에 있어서, 아지드와 알킨 사이의 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응이 요망되는 경우, 상기 FGF-21 폴리

펩티드는 알킨 부분을 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하고, 아미노산에 부착되어질 수용성 중합체는 아지드 부분을 포함한다. 대안으로, 전환 반응(즉, 아미노산 상의 아지드 부분 및 수용성 중합체 상의 알킨 부분과의 반응) 역시 수행될 수 있다.

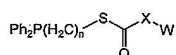
[0470] 상기 아지드 작용기는 또한 아릴 에스테르를 포함하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 아릴 포스핀 부분에 의해 적절히 작용기화되어 아미드 결합을 형성할 수 있다. 상기 아릴 포스핀기는 계내에서 아지드를 환원시키며, 그 후, 생성된 아민은 인접한 에스테르 결합과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)]을 참조할 수 있다. 상기 아지드 함유 아미노산은 알킬 아지드(2-아미노-6-아지도-1-헥산산을 포함하나, 이에 한정되지 않음) 또는 아릴 아지드(p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

[0471] 아릴 에스테르 및 포스핀 부분을 포함하는 대표적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:



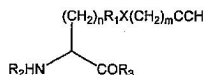
[0472] 상기 식에서, X는 O, N, S이거나 존재하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 중합체이고, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기이다. 예시적인 R 기로는 $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, -할로젠, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_3\text{R}''$, $-\text{CN}$ 및 $-\text{NO}_2$ 를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''은 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1~3개의 할로젠으로 치환된 아릴을 포함하나 이에 한정되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 나타낸다. 본 발명의 화합물이 1개보다 많은 R 기를 포함할 경우, 예를 들어, 각각의 R 기는 독립적으로 선택되며, R', R'', R''' 및 R'''' 기 역시 이들 기 중 하나 이상이 존재할 경우 독립적으로 선택된다. R'과 R''이 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 이 질소 원자와 결합하여 5원, 6원, 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-\text{NR}'\text{R}''$ 은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 치환기에 대한 진술한 설명으로부터, 당업자라면 "알킬"이란 용어가 수소가 아닌 다른 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예컨대 할로알킬($-\text{CF}_3$ 및 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 를 포함하나, 이들에 한정되지 않음) 및 아실($-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)을 포함하는 것으로 한다.

[0474] 상기 아지드 작용기는 또한 티오에스테르를 포함하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 경우에 따라 아릴 포스핀 부분으로 작용기화되어 아미드 결합을 생성할 수 있다. 상기 아릴 포스핀기는 계내에서 아지드를 환원시키고, 그 후, 생성된 아민은 티오에스테르 결합과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 티오에스테르 및 포스핀 부분을 포함하는 대표적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0475] 상기 식에서, n은 1~10이고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이다.

[0477] 대표적인 알킨 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:

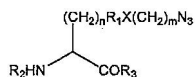


[0478] 상기 식에서, n은 0~10이고; R1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나, 존재하지 않고; m은 0~10이며; R2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R3은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R1은 페닐이며, X는 존재하지 않고, m은 0이며, 아세틸렌 부분은 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R1은 페닐이며, X는 0이고, m은 1이며, 프로파길옥시기는 알킬 측쇄(즉, 0-프로파길-타이로신)에 대하여 파라 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R1 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이다(즉, 프로파길글리신).

[0480] 알킨 함유 아미노산은 상업적으로 이용이 가능하다. 예를 들어, 프로파길글리신은 Peptech(미국 매사추세츠주

버링턴 소재)에서 시판된다. 대안으로, 알킨 함유 아미노산은 표준 방법에 따라 제조할 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 합성할 수 있으며, 4-알킬닐-L-페닐알라닌은 문헌[Kayser, B., et al., Tetrahedron 53(7):2475-2484 (1997)]에 기재된 바와 같이 합성할 수 있다. 다른 알킨 함유 아미노산은 당업자가 제조할 수 있다.

[0481] 대표적인 아지드 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0482]

[0483] 상기 식에서, n은 0~10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나 존재하지 않고; m은 0~10이며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카복시 말단 변형기이다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 존재하지 않고, m은 0이며, 아지드 부분은 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, n은 0~4이고, R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이다. 일부 실시형태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 0이고, m은 2이며, β-아지도에톡시 부분은 상기 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다.

[0484] 아지드 함유 아미노산은 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌은 Chem-Impex International, Inc.(미국 일리노이주 우드 데일 소재)로부터 입수할 수 있다. 상업적으로 입수할 수 없는 아지드 함유 아미노산의 경우, 적절한 이탈기(할라이드, 메실레이트, 토실레이트를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)의 치환 또는 적절히 보호된 락톤의 개환을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 비교적 용이하게 제조할 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조할 수 있다.

[0485] E. 아미노티올 반응기

[0486] 베타-치환 아미노티올 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해 폴리펩티드 및 알데히드기를 포함하는 다른 생물학적 분자의 티아졸리딘의 형성을 통한 선택적 변형에 매우 유용하다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899]을 참조할 수 있다. 일부 실시형태에서, 베타-치환 아미노티올 아미노산은 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 후, 알데히드 작용기를 포함하는 수용성 중합체와 반응할 수 있다. 일부 실시형태에서, 수용성 중합체, 약물 접합체 또는 다른 탐재물을 베타 치환 아미노티올 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드에 티아졸리딘의 형성을 통해 커플링할 수 있다.

[0487] F. 추가적인 반응기

[0488] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드로 도입될 수 있는 추가적인 반응기 및 비천연적으로 코딩된 아미노산에 대해서는 본 명세서에서 그 전체를 참고로 인용하는 하기 특허 출원들에 기재되어 있다: 미국 특허 출원 공개 제 2006/0194256호, 미국 특허 출원 공개 제 2006/0217532호, 미국 특허 출원 공개 제 2006/0217289호, 미국 가특허 출원 제 60/755,338호; 미국 가특허 출원 제 60/755,711호; 미국 가특허 출원 제 60/755,018호; 국제 특허 출원 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; 미국 가특허 출원 제 60/743,041호; 미국 가특허 출원 제 60/743,040호; 국제 특허 출원 PCT/US06/47822; 미국 가특허 출원 제 60/882,819호; 미국 가특허 출원 제 60/882,500호; 및 미국 가특허 출원 제 60/870,594호.

[0489] 비천연 아미노산의 세포내 흡수

[0490] 세포에 의한 비천연 아미노산 흡수는 비천연 아미노산을 단백질 내로 도입하기 위한 목적을 포함하나 이에 한정되지 않는 목적을 위해 비천연 아미노산을 디자인하고 선별할 때 일반적으로 고려되는 문제 중 하나이다. 예를 들어, α-아미노산의 높은 전하 밀도는 이러한 화합물들이 세포를 잘 투과하지 못할 수 있음을 시사한다. 천연 아미노산은 단백질에 기초한 수송 시스템의 집합체를 통해 진행 세포 내로 흡수된다. 비천연 아미노산이 존재할 경우, 어떤 비천연 아미노산이 세포에 의해 흡수되는지 평가하는 신속한 스크리닝을 수행할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 그 전체를 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제 2004/0198637호(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]에서의 독성 분석을 참조할 수 있다. 흡수는 다양한 분석법을 이용하여 용이하게 분석할 수 있지만, 세포내 흡수 경로에 알맞은 비천연 아미노산

을 디자인하는 것에 대한 대안은 생체내에서 아미노산을 생성하는 생합성 경로를 제공하는 것이다.

[0491] 비천연 아미노산의 생합성

[0492] 세포 내에는, 아미노산 및 다른 화합물을 제조하는 많은 생합성 경로들이 이미 존재한다. 특정 비천연 아미노산에 대한 생합성 방법이 자연계(세포를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 존재하지 않을 수도 있지만, 본 발명은 이러한 방법을 제공한다. 예를 들어, 비천연 아미노산의 생합성 경로는 숙주 세포 내에서 임의로 새로운 효소의 첨가 또는 기존의 숙주 세포 경로의 변경에 의해 형성된다. 추가적인 새로운 효소는 경우에 따라 천연 효소 또는 인위적 조작 효소이다. 예를 들어, p-아미노페닐알라닌의 생합성[WO 2002/085923호(발명의 명칭: "In vivo incorporation of unnatural amino acids")]에서 예로서 제시됨은 다른 유기체 유래의 공지된 효소의 조합물을 첨가하는 것에 의존한다. 이들 효소에 대한 유전자는 이 유전자를 포함하는 플라스미드로 세포를 형질전환시킴으로써 진핵 세포 내로 도입될 수 있다. 유전자가 세포 내에서 발현될 경우, 이것은 목적 화합물을 합성할 수 있는 효소 경로를 제공한다. 임의로 첨가되는 효소 종류의 예는 하기 실시예에 제공된다. 추가적인 효소 서열은, 예를 들어 진뱅크(GenBank)에서 찾을 수 있다. 인위적 조작 효소도 동일한 방식으로 세포 내로 첨가될 수 있다. 이러한 방식으로, 세포내 기관 및 세포내 자원을 조작하여 비천연 아미노산을 생산한다.

[0493] 생합성 경로에서의 사용 또는 기존 경로의 진화를 위해 새로운 효소를 제조하기 위한 다양한 방법들이 이용 가능하다. 예를 들어, Maxygen, Inc.(www.maxygen.com으로 접속 가능함)에 의해 개발된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 반복적 재조합법을 경우에 따라 이용하여 새로운 효소 및 경로를 개발한다. 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 참조할 수 있다. 유사하게, Genencor(www.genencor.com으로 접속 가능함)에 의해 개발된 DesignPath™는 경우에 따라 세포 내에서 O-메틸-L-타이로신을 생성하기 위한 경로를 조작하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 대사 경로 조작에 사용된다. 이러한 기법은 기능 유전체학 및 분자의 진화 및 디자인을 통해 확인된 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 신규 유전자의 조합을 사용하여 숙주 유기체 내에서 기존 경로를 재구성한다. 또한, Diversa Corporation(www.diversa.com으로 접속 가능함)도 유전자 및 유전자 경로의 라이브러리의 신속한 스크리닝을 위한 기법(새로운 경로를 형성하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 제공한다.

[0494] 일반적으로, 본 발명의 조작된 생합성 경로를 통해 제조된 비천연 아미노산은, 효율적인 단백질 생합성에 충분하지만, 다른 아미노산의 농도에 영향을 주거나 세포내 자원을 고갈시키는 정도까지는 아닌 농도(천연 세포내 함량을 포함하나 이에 한정되지 않음)로 제조된다. 이러한 방식으로 생체내에서 제조되는 전형적인 농도는 약 10 mM~약 0.05 mM이다. 특정 경로에 필요한 효소를 생성하는 데 이용되는 유전자를 포함하는 플라스미드로 세포를 형질전환시키고, 비천연 아미노산이 생성되면, 경우에 따라, 리보솜의 단백질 합성 및 세포 성장 양쪽에 대해 비천연 아미노산의 생산이 더 최적화되도록 생체내 선별을 이용한다.

[0495] 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩티드

[0496] 비천연 아미노산의 도입은 단백질 구조 및/또는 기능 변화의 조정(tailoring), 크기, 산도, 친핵성, 수소 결합, 소수성, 프로테아제 표적 부위의 접근 용이성의 변화, 일정 부분에 대한 표적화(단백질 어레이의 경우를 포함하나 이에 한정되지 않음)의 변화, 생물학적 활성 분자의 부가, 중합체의 부착, 방사선택종의 부착, 혈청 반감기의 조절, 조직 투과(예를 들어, 종양)의 조절, 능동 수송의 조절, 조직, 세포 또는 기관 특이성 또는 분포의 조절, 면역원성의 조절, 프로테아제 내성의 조절 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 목적을 위해 수행될 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은 증대된 또는 심지어 완전히 새로운 촉매 특성 또는 생물물리적 특성을 지닐 수 있다. 예를 들면, 경우에 따라, 비천연 아미노산을 단백질 내로 포함시킴으로써 하기 특성들을 변경한다: 독성, 생체내 분포, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매 능력, 반감기(혈청 반감기를 포함하나 이에 한정되지 않음), 공유결합 또는 비공유결합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 분자와 반응할 수 있는 능력 등. 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 포함하는 조성물은 신규한 치료제, 진단제, 촉매 효소, 산업용 효소, 결합 단백질(항체를 포함하나 이에 한정되지 않음), 및 단백질 구조 및 기능의 연구를 포함하나 이에 한정되지 않는 연구에 유용하나, 이에 한정되지 않는다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652]을 참조할 수 있다.

[0497] 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개, 또는 그 이상의 비천연 아미노산을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있으며, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개, 또는 그 이상의 상이한 비천연 아미노산을 포함하는 폴리펩티드 내에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개, 또는 그 이상의 상이한 부위가 존재할 수 있다. 또 다른 양태에서, 조성물은 단백질 내에 존재하는 1개 이상(그러나, 전체 아미노산보다 적은 수)의 특정 아미노산이 비천연 아미노산으로 치환된 단백질을 포함한다. 1개보다 많은 비천연 아미노산을 갖는 소정의 단백질의 경우, 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있다(예를 들어, 상기 단백질은 2개 이상의 상이한 종류의 비천연 아미노산을 포함할 수 있거나, 동일한 2개의 비천연 아미노산을 포함할 수 있음). 2개보다 많은 비천연 아미노산을 갖는 소정의 단백질의 경우, 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이하거나 동일한 종류의 비천연 아미노산 복수개와 1종 이상의 상이한 비천연 아미노산의 조합일 수 있다.

[0498] 하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드가 본 발명의 특징이다. 본 발명은 또한 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 제조한 하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 부형제(약학적으로 허용되는 부형제를 포함하나 이에 한정되지 않음) 역시 단백질 내에 존재할 수 있다.

[0499] 하나 이상의 비천연 아미노산을 갖는 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드를 진핵 세포에서 제조하는 것에 의하면, 단백질 또는 폴리펩티드는 일반적으로 진핵 세포에서의 번역 후 변형을 포함하게 된다. 일부 실시형태에서, 단백질은 하나 이상의 비천연 아미노산과, 진핵 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함하며, 이때 상기 번역 후 변형은 원핵 세포에 의해서는 만들어지지 않는 것이다. 예를 들어, 상기 번역 후 변형은 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질 결합 변형, 글리코실화 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 일 양태에서, 상기 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 결합에 의해 올리고사카라이드[(GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc를 포함하나 이에 한정되지 않음]를 아스파라긴에 부착시키는 것을 포함한다. 진핵 세포 단백질의 N 결합 올리고사카라이드의 몇 가지 예를 열거하는 하기 표 1을 참조할 수 있다(기재되지 않은 추가 잔기도 존재할 수 있음). 또 다른 양태에서, 상기 번역 후 변형은 GalNAc-세린 또는 GalNAc-트레오닌 결합, 또는 GlcNAc-세린 또는 GlcNAc-트레오닌 결합에 의해 올리고사카라이드(Gal-GlcNAc, Gal-GlcNAc 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 포함한다.

[0500] [표 1] GlcNAc 결합에 의한 올리고사카라이드의 예

유형	기본 구조
고만노스	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\alpha 1-3 \end{array} \rightarrow \text{Man}\alpha 1-6 \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$
하이브리드	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \rightarrow \text{Man}\alpha 1-3 \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$
복합체	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1-2 \rightarrow \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2 \rightarrow \text{Man}\alpha 1-3 \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$
크실로스	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1-6 \\ \text{Xyl}\beta 1-2 \end{array} \rightarrow \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$

[0501]

[0502] 또 다른 양태에서, 상기 번역 후 변형은 전구체[칼시토닌 전구체, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드 전구체, 전전구 부갑상선(preproparathyroid) 호르몬, 전전구 인슐린(preproinsulin), 전구 인슐린(proinsulin), 전전구 오피오멜라노코르틴(prepro-opiomelanocortin), 전구 오피오멜라노코르틴(pro-opiomelanocortin) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음]의 단백질 분해 처리, 다중 서브유닛(multisubunit) 단백질 또는 거대분자 조립체로의 조립, 세포 내 다른 부위로의 이동(소기관, 예를 들어 소포체, 골지체, 핵, 리소좀, 퍼옥시좀, 미토콘드리아, 엽록체, 액포 등으로의 이동 또는 분비 경로를 통한 이동을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단백질은 분비 또는 위치 지정 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함한다.

[0503] 비천연 아미노산의 장점 중 하나는 이것이 추가 분자를 부가하는 데 사용될 수 있는 추가적인 화학적 부분을 제공한다. 이러한 변형은 진핵 세포 또는 비진핵 세포의 생체내에서 또는 시험관내에서 이루어질 수 있

다. 따라서, 일부 실시형태에서, 상기 번역 후 변형은 비천연 아미노산을 통해 이루어진다. 예를 들어, 상기 번역 후 변형은 친핵성-친전자성 반응을 통해 이루어질 수 있다. 현재, 단백질의 선택적 변형에 사용되는 대부분의 반응은 α -할로케톤과 히스티딘 또는 시스테인 측쇄의 반응을 포함하나 이들에 한정되지 않는 친핵성 반응 파트너와 친전자성 반응 파트너 사이의 공유 결합 형성과 관련되어 있다. 이러한 경우, 선택성은 단백질 내의 친핵성 잔기의 수 및 접근 용이성에 의해 결정된다. 본 발명 단백질의 경우, 시험관내 및 생체내에서의 비천연 케토 아미노산과 하이드라지드 또는 아미노옥시 화합물과의 반응과 같은 다른 더 선택적인 반응들이 이용될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌[Cornish, et al., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151]; 문헌[Mahal, et al., (1997) Science, 276:1125-1128]; 문헌[Wang, et al., (2001) Science 292:498-500]; 문헌[Chin, et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027]; 문헌[Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024]; 문헌[Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61]; 문헌[Zhang, et al., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746]; 및 문헌[Chin, et al., (2003) Science, 301:964-7]에서 찾아볼 수 있으며, 이들 문헌은 모두 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함한다. 이는 형광단, 가교결합제, 사카라이드 유도체 및 세포 독성 분자를 비롯한 다수의 시약으로 사실상 어떠한 단백질도 선택적으로 표지할 수 있게 한다. 또한, 본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허 제6,927,042호(발명의 명칭: "Glycoprotein synthesis")도 참조할 수 있다. 또한, 아지도 아미노산을 통한 번역 후 변형을 포함하나 이에 한정되지 않는 번역 후 변형은 스타우딩어 결합(Staudinger ligation)(트리아릴포스핀 시약을 이용한 결합을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 통해 이루어질 수 있다. 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 참조할 수 있다.

[0504] 본 발명은, 셀렉터 코돈에 반응하여 아지도 또는 알킬닐 부분을 포함하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 비천연 아미노산을 단백질로 유전적으로 도입하는 것을 포함하는, 단백질의 선택적 변형을 위한 매우 효율적인 또 다른 방법을 제공한다. 그 후, 이러한 아미노산 측쇄를, 각각 알킬닐 또는 아지도 유도체(이를 포함하나 이에 한정되지 않음)와의 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응(이를 포함하나 이에 한정되지 않음)[참고 문헌: Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis. Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; and, Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176]에 의해 변형시킬 수 있다. 이 방법은 친핵성 치환이 아니라 고리화첨가 반응을 이용하기 때문에, 단백질은 매우 높은 선택성으로 변형될 수 있다. 이 반응은, 촉매량의 Cu(I) 염을 반응 혼합물에 첨가함으로써, 수성 조건하에 실온에서 우수한 위치선택성(1,4 > 1,5)으로 수행될 수 있다. 이에 대해서는, 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 참조할 수 있다. 이용될 수 있는 다른 방법으로는 테트라시스테인 모티프에 의한 비스비소(bisarsenic) 화합물 상의 리간드 교환이 있다. 예를 들어, 문헌[Griffin, et al., (1998) Science 281:269-272]을 참조할 수 있다.

[0505] [3+2] 고리화첨가 반응에 의해 본 발명의 단백질에 부가될 수 있는 분자는 아지도 또는 알킬닐 유도체를 갖는 실질적으로 어떠한 분자도 포함한다. 그러한 분자로는 염료, 형광단, 가교결합제, 사카라이드 유도체, 중합체(폴리에틸렌 글리콜의 유도체를 포함하나 이에 한정되지 않음), 광가교결합제, 세포독성 화합물, 친화성 표지, 바이오틴의 유도체, 수지, 비드, 제2 단백질 또는 폴리펩티드(또는 그 이상), 폴리뉴클레오티드(들)(DNA, RNA 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음), 금속 킬레이트제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 분자들은, 각각 알킬닐기를 갖는 비천연 아미노산(p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 아지도기를 갖는 비천연 아미노산(p-아지도-페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않음)에 부가될 수 있다.

[0506] V. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 생체내 제조

[0507] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 천연 시스템에서는 코딩되지 않는 아미노산을 부가하거나 이것으로 치환하기 위해 변형된 tRNA 및 tRNA 합성효소를 사용하여 생체내에서 제조할 수 있다.

[0508] 천연 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 사용하는 tRNA 및 tRNA 합성효소를 제조하는 방법은, 예를 들어 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 미국 특허 제7,083,970호에 기재되어 있다. 이러한 방법은 번역 시스템에 대해 내인성인 합성효소 및 tRNA에 독립적으로 기능하는(따라서, 때때로 "오르토고날"이라고도 지칭됨) 번역 기구를 제조하는 것을 포함한다. 일반적으로, 이 번역 시스템은 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함한다. 일반적으로, 상기 O-RS는 번역 시스템에서 O-tRNA를 하나 이상의 비천연 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화하고, 이 O-tRNA는 이 시스템에서 다른 tRNA에 의해 인식되지 않는 하나 이상의 셀렉터 코돈을 인식한다. 따라서, 이 번역 시스템은 코딩된 셀렉터 코

돈에 반응하여 비천연적으로 코딩된 아미노산을 상기 시스템에서 제조된 단백질 내에 삽입함으로써, 코딩된 폴리펩티드 내의 특정 위치로 아미노산을 "치환"시킨다.

- [0509] 특정한 합성 아미노산을 폴리펩티드 내로 삽입하기 위한 다중 다양한 오르토고날 tRNA 및 아미노아실 tRNA 합성효소가 알려져 있으며, 본 발명에 사용하기에 일반적으로 적합하다. 예를 들어, 케토 특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소가 문헌[Wang, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:56-61 (2003)] 및 문헌[Zhang, Z. et al., Biochem. 42 (22):6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 예시적 O-RS 또는 그 일부는, 각각 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되고 그 곳에 개시된 아미노산 서열을 포함한다. 또한, O-RS와 함께 사용되는 상응하는 O-tRNA 분자도 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 개시되어 있다. 또한, O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍의 추가적인 예가 WO 2005/007870, WO 2005/007624; 및 WO 2005/019415에 기재되어 있다.
- [0510] 아지도 특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 시스템의 일례가 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 서열로는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제7,083,970호에 개시된 서열 번호 14~16 및 29~32의 뉴클레오티드 서열과 서열 번호 46~48 및 61~64의 아미노산 서열을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 대표적인 O-tRNA 서열로는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제7,083,970호에 개시된 서열 번호 1~3의 뉴클레오티드 서열을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 비천연적으로 코딩되는 특정 아미노산에 특이적인 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍의 다른 예는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제7,045,337호에 기재되어 있다. 사카로마이세스 세레비시아(*S. cerevisiae*)에서 케토 함유 아미노산과 아지도 함유 아미노산을 둘 다 도입하는 O-RA 및 O-tRNA는 문헌[Chin, J. W., et al., Science 301:964-967 (2003)]에 기재되어 있다.
- [0511] 몇 종의 다른 오르토고날 쌍도 보고되었다. 에스. 세레비시아 tRNA 및 합성효소로부터 유래된 글루타밀[참고 문헌: Liu, D. R., and Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785], 아스파틸[참고 문헌: Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286] 및 타이로실[참고 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] 시스템이 이. 콜라이에서 비천연 아미노산을 도입할 수 있는 가능성이 있는 것으로 기재된 바 있다. 이. 콜라이 글루타밀[참고 문헌: Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273] 및 타이로실[참고 문헌: Edwards, H., and Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641] 합성효소는 에스 세레비시아에서 사용할 수 있는 것으로 기재되었다. 포유동물 세포에서의 생체 내 3-요오도-L-타이로신의 도입에 이. 콜라이 타이로실 시스템이 사용되었다. 이에 대해서는, 문헌[Sakamoto, K., et al., (2002) Nucleic Acids Res, 30:4692-4699]을 참조할 수 있다.
- [0512] O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소의 사용은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 코딩하는 특정한 코돈의 선택을 포함한다. 임의의 코돈이 사용될 수 있지만, 일반적으로는 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소가 발현되는 세포에서 거의 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 예시적인 코돈은 넌센스 코돈, 예컨대 정지 코돈(앰버, 오키 및 오팔), 4 또는 그 이상의 염기 코돈, 및 거의 또는 전혀 사용되지 않는 다른 천연 3 염기 코돈을 포함한다.
- [0513] 특정한 셀렉터 코돈(들)을, 당업계에 공지된 돌연변이 유발법(부위 특이적 돌연변이 유발법, 카세트 돌연변이 유발법, 제한 선택 돌연변이 유발법 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)을 이용하여 FGF-21 폴리뉴클레오티드 코딩 서열 내의 적절한 위치에 도입할 수 있다.
- [0514] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하는 데 사용될 수 있는 단백질 생합성 기구의 구성요소, 예를 들어 O-RS, O-tRNA, 및 오르토고날 O-tRNA/O-RS 쌍을 생성하는 방법은 문헌[Wang, L. et al., Science 292:498-500 (2001)]; 문헌[Chin, J. W. et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]; 문헌[Zhang, Z. et al., Biochemistry 42:6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 비천연적으로 코딩된 아미노산의 생체내 도입을 위한 방법 및 조성물은 본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허 제7,045,337호에 기재되어 있다. 또한, 유기체의 생체내 번역 시스템에서 사용하기 위한 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 선별하는 방법은 본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허 제7,045,337호 및 미국 특허 제7,083,970호에 기재되어 있다. 본 명세서에서 그 전체를 참고로 인용하는 PCT 공개 공보 WO 04/035743(발명의 명칭: "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins")에는 케토 아미노산의 도입을 위한 오르토고날 RS 및 tRNA 쌍이 기재되어 있다. 본 명세

서에 그 전체가 참고로 인용되는 PCT 공개 공보 WO 04/094593(발명의 명칭: "Expanding the Eukaryotic Genetic Code")에는 진핵 숙주 세포에서 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 오르토고날 RS와 tRNA 쌍이 기재되어 있다.

- [0515] 하나 이상의 재조합 오르토고날 아미노아실-tRNA 합성효소(O-RS)를 제조하는 방법은 (a) 원핵생물 유기체, 예를 들어 메타노코커스 잔나스키이, 메타노박테리움 씨모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리치아 콜라이, 에이. 폴기더스, 피. 푸리오서스, 피. 호리코쉬이, 에이. 페르닉스, 티. 씨모필러스 등, 또는 진핵생물 유기체를 포함하나 이에 한정되지 않는 제1 유기체로부터의 하나 이상의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)로부터 유도된 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 라이브러리를 생성하는 단계; (b) 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 오르토고날 tRNA(O-tRNA)를 아미노아실화는 구성원에 대해 RS(경우에 따라, 돌연변이체 RS)의 라이브러리를 선별(및/또는 스크리닝)함으로써, 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 풀을 제공하는 단계; 및/또는 (c) 비천연적으로 코딩된 아미노산의 부재하에 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 활성 RS(돌연변이체 RS를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 대해 상기 풀을 (경우에 따라, 음성 선별을 통해) 선별함으로써, O-tRNA를 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화하는 하나 이상의 재조합 O-RS를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0516] 일 실시형태에서, 상기 RS는 비활성 RS이다. 이러한 비활성 RS는 활성 RS를 돌연변이시켜 생성할 수 있다. 예를 들어, 상기 비활성 RS는 적어도 약 1개, 적어도 약 2개, 적어도 약 3개, 적어도 약 4개, 적어도 약 5개, 적어도 약 6개, 또는 적어도 약 10개, 또는 그 이상의 아미노산을 상이한 아미노산(알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않음)으로 돌연변이시킴으로써 생성할 수 있다.
- [0517] 돌연변이체 RS의 라이브러리는, 단백질의 3차원적 RS 구조에 기초한 합리적(rational) 디자인을 포함하나 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 다양한 기법, 또는 무작위적 또는 합리적 디자인 기법을 이용한 RS 뉴클레오티드의 돌연변이 유발을 이용하여 생성할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체 RS는 부위 특이적 돌연변이, 무작위 돌연변이, 다양성 발생 재조합 돌연변이, 키메라 구성체, 합리적 디자인, 및 본원에 기재되어 있거나 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0518] 일 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 오르토고날 tRNA(O-tRNA)를 아미노아실화하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는, 활성을 갖는 구성원에 대해 RS(경우에 따라, 돌연변이체 RS)의 라이브러리를 선별(및/또는 스크리닝)하는 과정은, 항생제 내성 유전자 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 양성 선별 또는 스크리닝 마커 및 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 라이브러리를 복수개의 세포 내로 도입하는 단계(여기서, 상기 양성 선별 및/또는 스크리닝 마커는 앰버 코돈, 오키 코돈 또는 오팔 코돈을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함함); 선별체의 존재하에 상기 복수개의 세포를 배양하는 단계; 양성 선별 또는 스크리닝 마커의 존재하에 하나 이상의 셀렉터 코돈을 억제하여 선별체 및/또는 스크리닝체의 존재하에 생존하는 (또는 특이적 반응을 나타내는) 세포를 확인함으로써 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 풀을 함유하는 양성적으로 선별된 세포의 부분집합을 제공하는 단계를 포함한다. 경우에 따라, 상기 선별체 및/또는 스크리닝체 농도는 변화시킬 수 있다.
- [0519] 일 양태에서, 상기 양성 선별 마커는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase; CAT) 유전자이고, 상기 셀렉터 코돈은 CAT 유전자 내의 앰버 정지 코돈이다. 경우에 따라, 상기 양성 선별 마커는 β -락타마제 유전자이고, 상기 셀렉터 코돈은 β -락타마제 유전자 내의 앰버 정지 코돈이다. 또 다른 양태에서, 상기 양성 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성에 기초한 스크리닝 마커(세포 표면 마커를 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 포함한다.
- [0520] 일 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 부재하에 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 활성 RS(경우에 따라, 돌연변이체)에 대해 풀을 음성적으로 선별하거나 스크리닝하는 과정은, 양성 선별 또는 스크리닝으로부터의 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 풀과 함께 음성 선별 또는 스크리닝 마커를 제2 유기체의 복수개의 세포 내로 도입하는 단계[여기서, 상기 음성 선별 또는 스크리닝 마커는 하나 이상의 셀렉터 코돈(클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않는 항생제 내성 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않음)을 포함함]; 및 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 스크리닝체 또는 선별체가 보충된 제1 배지에서 생존하거나 특이적인 스크리닝 반응을 나타내지만 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 선별체 또는 스크리닝체가 보충되지 않은 제2 배지에서는 생존하지 못하거나 특이적 반응을 나타내지 않는 세포를 확인하여 하나 이상의 재조합 O-RS를 갖는 생존 세포 또는 스크리닝된 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 예를 들어, CAT 확인 프로토콜은 경우에 따라, 적절한 O-RS 재조합체를 확인함에 있어서 양성 선별 및/또는 음성 스크리닝으로서 작용

한다. 예를 들어, 클론의 풀은 경우에 따라 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하거나 함유하지 않고 CAT(이는 하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함함)를 함유하는 배양 플레이트 상에서 복제된다. 따라서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 함유하는 플레이트 상에서만 성장하는 콜로니는 재조합 O-RS를 함유하는 콜로니로 간주된다. 일 양태에서, 선별제(및/또는 스크리닝제)의 농도를 변화시킨다. 일부 양태에서, 제1 유기체와 제2 유기체는 상이하다. 따라서, 제1 유기체 및/또는 제2 유기체는 경우에 따라 원핵생물, 진핵생물, 포유동물, 에스케리치아 콜라이, 진균류, 효모, 원시세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 스크리닝 마커는 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성에 기초한 스크리닝 마커를 포함한다.

[0521] 또 다른 실시형태에서, 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS에 대해 풀을 스크리닝 또는 선별(음성 선별을 포함하나 이에 한정되지 않음)하는 과정은, 양성 선별 단계 (b)로부터 활성 돌연변이체 RS의 풀을 분리하는 단계; 음성 선별 또는 스크리닝 마커를 도입하는 단계[여기서, 상기 음성 선별 또는 스크리닝 마커는 하나 이상의 셀렉터 코돈(하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함하는 리보뉴클레아제 바르나제(ribonuclease barnase) 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않는 독성 마커 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않음)을 포함함]; 및 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 풀을 제2 유기체의 복수개의 세포 내로 도입하는 단계; 및 비천연적으로 코딩된 아미노산이 보충되지 않은 제1 배지에서는 생존하거나 특이적인 스크리닝 반응을 나타내지만, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 보충된 제2 배지에서는 생존하지 못하거나 특이적인 스크리닝 반응을 나타내지 않는 세포를 확인함으로써 비천연적으로 코딩된 아미노산에 특이적인 하나 이상의 재조합 O-RS를 갖는 생존 세포 또는 스크리닝된 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 상기 하나 이상의 셀렉터 코돈은 약 2개 이상의 셀렉터 코돈을 포함한다. 경우에 따라, 이러한 실시형태는 하나 이상의 셀렉터 코돈이 2개 이상의 셀렉터 코돈을 포함하고, 제1 유기체와 제2 유기체가 상이한 경우(각각의 유기체는 경우에 따라, 원핵생물, 진핵생물, 포유동물, 에스케리치아 콜라이, 진균류, 효모, 원시세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 것이다)를 포함할 수 있다. 또한, 일부 양태는 음성 선별 마커가 리보뉴클레아제 바르나제 유전자(하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함함)를 포함하는 경우를 포함한다. 다른 양태는 스크리닝 마커가 경우에 따라 형광 또는 발광 스크리닝 마커 또는 친화성에 기초한 스크리닝 마커를 포함하는 경우를 포함한다. 본 발명의 실시형태에서, 상기 스크리닝 및/또는 선별은 경우에 따라 스크리닝 및/또는 선별 엄격도의 변경을 포함한다.

[0522] 일 실시형태에서, 하나 이상의 재조합 오르토고날 아미노아실-tRNA 합성효소(O-RS)를 제조하는 방법은 (d) 하나 이상의 재조합 O-RS를 분리하는 단계; (e) 하나 이상의 재조합 O-RS로부터 유도된 O-RS(경우에 따라, 돌연변이된)의 제2 세트를 생성하는 단계; 및 (f) O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 능력을 포함하는 돌연변이된 O-RS가 얻어질 때까지 단계 (b) 및 단계 (c)를 반복하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 경우에 따라, 단계 (d)~(f)를 약 2회 이상(이에 한정되지 않음) 반복한다. 일 양태에서, 하나 이상의 재조합 O-RS로부터 유도된 돌연변이된 O-RS의 제2 세트는 무작위 돌연변이 유발법, 부위 특이적 돌연변이 유발법, 재조합법 또는 이들의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 돌연변이 유발법에 의해 생성될 수 있다.

[0523] 진술한 방법들에서 양성 선별/스크리닝 단계(b), 음성 선별/스크리닝 단계(c) 또는 양성 및 음성 선별/스크리닝 단계 (b) 및 (c) 둘 다를 포함하나 이들에 한정되지 않는 선별/스크리닝 단계의 엄격도는, 경우에 따라 선별/스크리닝 엄격도를 변화시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 양성 선별/스크리닝 단계(b), 음성 선별/스크리닝 단계(c) 또는 양성 및 음성 선별/스크리닝 단계 (b) 및 (c) 둘 다는 리포터의 사용을 포함하며, 이때 상기 리포터는 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting; FACS)에 의해 검출되거나 또는 발광에 의해 검출된다. 경우에 따라, 상기 리포터는 세포 표면 상, 파지 디스플레이 상 등에서 나타나고, 비천연 아미노산 또는 유사체와 관련되는 친화성 또는 촉매 활성에 기초하여 선별된다. 일 실시형태에서, 돌연변이된 합성효소는 세포 표면 상, 파지 디스플레이 상 등에서 나타난다.

[0524] 재조합 오르토고날 tRNA(O-tRNA)를 제조하는 방법은 (a) 제1 유기체로부터 서프래서 tRNA를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 tRNA로부터 유도된 돌연변이체 tRNA의 라이브러리를 생성하는 단계; (b) 제1 유기체로부터의 RS의 부재하에 제2 유기체로부터의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)에 의해 아미노아실화되는 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA에 대해 상기 라이브러리를 선별(음성 선별을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 스크리닝하여 tRNA(경우에 따라, 돌연변이체)의 풀을 제공하는 단계; 및 (c) 도입된 오르토고날 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화되는 구성원에 대해 상기 tRNA(경우에 따라, 돌연변이체)의 풀을 선별 또는 스크리닝함으로써 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 재조합 O-tRNA는 셀렉터 코돈을 인식하고, 상기 제2 유기체로부터의 RS에 의해 효율적으로 인식되지 않으며, 상기 O-RS에 의해 우선적으로 아미노아실화됨)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 하나 이상의 tRNA는 서프래서 tRNA이고/이거나 천연 및/또는 비천연 염기로 된

특이한 3 염기 코돈을 포함하거나, 넌센스 코돈, 희귀 코돈, 비천연 코돈, 4개 이상의 염기를 포함하는 코돈, 앰버 코돈, 오키 코돈 또는 오판 정지 코돈이다. 일 실시형태에서, 상기 재조합 O-tRNA는 개선된 오르토고달성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 경우에 따라 O-tRNA를 변형시킬 필요없이 제2 유기체로부터 제1 유기체 내로 도입할 수 있음을 이해할 것이다. 다양한 실시형태에서, 제1 유기체와 제2 유기체는 동일하거나 상이하고, 경우에 따라 원핵생물(메타노코커스 잔나스키이, 메타노박테리움 세모모토트로피쿰, 에스케리치아 콜라이, 할로박테리움 등을 포함하나 이들에 한정되지 않음), 진핵생물, 포유동물, 진균류, 효모, 고세균, 진정세균, 식물, 곤충, 원생생물 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 것들로부터 선택된다. 또한, 재조합 tRNA는 경우에 따라 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 아미노아실화되며, 이때 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 천연적으로 또는 유전자 조작을 통해 생체내에서 생합성된다. 경우에 따라, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 적어도 제1 유기체 또는 제2 유기체에 대한 배양 배지에 첨가한다.

[0525] 일 양태에서, 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 아미노아실화되는 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA에 대해 라이브러리를 선별(음성 선별을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 스크리닝하는 단계[단계 (b)]는, 하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함하는 독성 마커 유전자(또는 독성 물질 또는 세포 성장 억제 물질을 생성하는 유전자 또는 유기체에 필수적인 유전자로서, 이러한 마커 유전자는 하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함함) 및 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA의 라이브러리를 제2 유기체 유래의 복수개의 세포 내로 도입하는 단계; 및 하나 이상의 오르토고달 tRNA 또는 비기능적 tRNA를 포함하는 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA의 풀을 함유하는 생존 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 생존 세포는 비교 비율 세포 밀도 분석을 이용함으로써 선별할 수 있다.

[0526] 또 다른 양태에서, 상기 독성 마커 유전자는 2개 이상의 셀렉터 코돈을 포함할 수 있다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 독성 마커 유전자는 리보뉴클레아제 바르나제 유전자이며, 이때 상기 리보뉴클레아제 바르나제 유전자는 하나 이상의 앰버 코돈을 포함한다. 경우에 따라, 상기 리보뉴클레아제 바르나제 유전자는 2개 이상의 앰버 코돈을 포함할 수 있다.

[0527] 일 실시형태에서, 도입된 오르토고달 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화되는 구성원에 대해 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA의 풀을 선별 또는 스크리닝하는 단계는, 양성 선별 또는 스크리닝 마커 유전자[여기서, 상기 양성 마커 유전자는 약물 내성 유전자(하나 이상의 앰버 정지 코돈과 같은 하나 이상의 셀렉터 코돈을 포함하는 β-락타마제 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 유기체에 필수적인 유전자, 또는 독성 물질을 해독시키는 유전자를 O-RS와 함께 포함함]; 및 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA의 풀을 제2 유기체 유래의 복수개의 세포 내로 도입하는 단계; 및 항생제를 포함하나 이에 한정되지 않는 선별제 또는 스크리닝제의 존재하에 성장한 생존 세포 또는 스크리닝된 세포를 확인함으로써 하나 이상의 재조합 tRNA를 갖는 세포의 풀을 제공하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 재조합 tRNA는 O-RS에 의해 아미노아실화되고, 하나 이상의 셀렉터 코돈에 반응하여 양성 마커 유전자에 의해 코딩되는 번역 생성물 내에 아미노산을 삽입함)를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 선별제 및/또는 스크리닝제의 농도를 변화시킨다.

[0528] 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍을 생성하는 방법이 제공된다. 이 방법은 (a) 제1 유기체로부터의 하나 이상의 tRNA로부터 유도된 돌연변이체 tRNA의 라이브러리를 생성하는 단계; (b) 제1 유기체로부터의 RS의 부재하에 제2 유기체로부터의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)에 의해 아미노아실화되는 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA에 대해 상기 라이브러리를 음성적으로 선별 또는 스크리닝함으로써 (경우에 따라, 돌연변이체) tRNA의 풀을 제공하는 단계; (c) 도입된 오르토고달 RS(O-RS)에 의해 아미노아실화되는 구성원에 대해 (경우에 따라, 돌연변이체) 상기 tRNA의 풀을 선별 또는 스크리닝함으로써 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 제공하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 재조합 O-tRNA는 셀렉터 코돈을 인식하고, 상기 제2 유기체로부터의 RS에 의해 효율적으로 인식되지 않으며, 상기 O-RS에 의해 우선적으로 아미노아실화된다. 또한, 이 방법은 (d) 제3 유기체로부터의 하나 이상의 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)로부터 유도된 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 라이브러리를 생성하는 단계; (e) 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산의 존재하에 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 구성원에 대해 상기 돌연변이체 RS의 라이브러리를 선별 또는 스크리닝하여 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS의 풀을 제공하는 단계; 및 (f) 비천연적으로 코딩된 아미노산의 부재하에 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하는 활성 (경우에 따라, 돌연변이체) RS에 대해 상기 풀을 음성적으로 선별 또는 스크리닝함으로써, 하나 이상의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍을 제공하는 단계(여기서, 상기 하나 이상의 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은 비천연적으로 코딩된 아미노산에 특이적인 하나 이상의 재조합 O-RS 및 하나 이상의 재조합 O-tRNA를 포함함)를 포함한다. 이 방법에 의해 생성된 특이적인 O-tRNA/O-RS 쌍은 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 상기 특이적 O-tRNA/O-RS 쌍은 mutRNATyr-mutTyrRS 쌍, 예컨대 mutRNATyr-SS12TyrRS 쌍, mutRNALeu-mutLeuRS 쌍, mutRNAThr-mutThrRS 쌍, mutRNAGlu-mutGluRS 쌍 등을 포함할 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 이러

한 방법은 제1 유기체와 제3 유기체가 동일한(메타노코커스 잔나스키이를 포함하나 이에 한정되지 않음) 경우를 포함한다.

[0529] 또한, 제2 유기체의 생체내 번역 시스템에 사용하기 위한 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 선별하는 방법도 본 발명에 포함된다. 이 방법은 마커 유전자, tRNA, 및 제1 유기체로부터 단리되거나 유도된 아미노아실-tRNA 합성효소(RS)를 제2 유기체 유래의 세포로 구성된 제1 세트 내로 도입하는 단계; 상기 마커 유전자 및 상기 tRNA를 제2 유기체 유래의 중복(duplicate) 세포 세트 내로 도입하는 단계; 및 상기 중복 세포 세트에서는 생존하지 못하지만 상기 제1 세트에서는 생존하는 세포를 선별하거나, 상기 중복 세포 세트에서는 제공하지 못하는 특이적인 스크리닝 반응을 나타내는 세포를 스크리닝하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 제1 세트와 상기 중복 세포 세트는 선별제 또는 스크리닝제의 존재하에 배양되고, 상기 생존 세포 또는 스크리닝된 세포는 제2 유기체의 생체내 번역 시스템에서 사용하기 위한 오르토고날 tRNA-tRNA 합성효소 쌍을 포함한다. 일 실시형태에서, 비교 및 선별 또는 스크리닝은 생체내 상보성 분석을 포함한다. 상기 선별제 또는 스크리닝제의 농도를 변화시킨다.

[0530] 본 발명의 유기체는 다양한 유기체와 다양한 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명 방법의 제1 유기체와 제2 유기체는 동일하거나 상이할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 유기체는 경우에 따라 메타노코커스 잔나스키이, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리치아 콜라이, 에이. 풀기더스, 피. 푸리오서스, 피. 호리코쉬이, 에이. 페르닉스, 티. 써모필러스 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 원핵생물 유기체이다. 대안으로, 상기 유기체는 식물(복합 식물, 예컨대 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물)을 포함하나 이에 한정되지 않음), 조류, 원생생물, 진균류(효모 등을 포함하나 이에 한정되지 않음), 동물(포유동물, 곤충, 절지동물 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음) 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 진핵생물 유기체이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 제2 유기체는 메타노코커스 잔나스키이, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰, 할로박테리움, 에스케리치아 콜라이, 에이. 풀기더스, 할로박테리움, 피. 푸리오서스, 피. 호리코쉬이, 에이. 페르닉스, 티. 써모필러스 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 원핵생물 유기체이다. 대안으로, 상기 제2 유기체는 효모, 동물 세포, 식물 세포, 진균류, 포유동물 세포 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 진핵생물 유기체일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 상기 제1 유기체와 제2 유기체는 상이하다.

[0531] VI. FGF-21 폴리펩티드 내의 비천연 아미노산의 위치

[0532] 본 발명은 하나 이상의 비천연 아미노산을 FGF-21 폴리펩티드로 도입하는 것을 포함한다. 하나 이상의 비천연 아미노산은 폴리펩티드의 활성을 파괴하지 않는 특정 위치에 도입될 수 있다. 이것은 소수성 아미노산을 소수성 아미노산으로, 부피가 큰(bulky) 아미노산을 부피가 큰 아미노산으로, 친수성 아미노산을 친수성 아미노산으로 치환하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 "보존적" 치환을 수행하고/하거나, 비천연 아미노산을 활성화에 필요하지 않은 위치에 삽입함으로써 수행할 수 있다.

[0533] 다양한 생화학적 및 구조적 방법을 이용하여, 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하고자 하는 FGF-21 폴리펩티드 내의 원하는 부위를 선별할 수 있다. 폴리펩티드 쇄의 어떠한 위치도 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 선별에 적합하고, 선별은 합리적 디자인에 기초하거나 또는 임의의 또는 불특정한 소정의 목적을 위한 무작위 선별로 행해질 수 있다는 것이 당업자에게 자명하다. 원하는 부위의 선별은 효현제, 슈퍼 효현제(super-agonist), 역 효현제, 길항제, 수용체 결합 조절제, 수용체 활성 조절제, 이량체 또는 다량체 형성, 본래의 분자와 비교해서 활성 또는 특성을 변화시키지 않는 것, 또는 폴리펩티드의 임의의 물리적 또는 화학적 특성, 예를 들어 용해도, 응집도, 또는 안정성을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 소정의 특성 또는 활성을 갖는 FGF-21 분자를 제조하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성화에 요구되는 폴리펩티드 내의 위치는 당업계에 공지된 포인트 돌연변이 분석, 알라닌 스캐닝, 포화 돌연변이 유발 및 생물학적 활성의 스크리닝, 또는 동족체 스캐닝 방법을 이용하여 확인할 수 있다. FGF-21 생물 활성화에 중요한 잔기, 약학적 안정성에 관여하는 잔기, 항체 에피토프 또는 수용체 또는 헤파린 결합 잔기를 돌연변이시킬 수 있다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,580,723호; 제5,834,250호; 제6,013,478호; 제6,428,954호 및 제6,451,561호는 표적 물질을 갖는 폴리펩티드의 활성화에 영향을 주는 활성 도메인을 확인함으로써 FGF-21과 같은 폴리펩티드의 구조 및 기능을 체계적으로 분석하는 방법을 기술한다. 알라닌 또는 동족체 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 생물학적 활성화에 있어서 중요한 것으로 확인된 잔기 이외의 잔기들은, 폴리펩티드로부터 얻고자 하는 원하는 활성화에 따라, 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하기 위한 우수한 후보가 될 수 있다. 대안으로, 생물학적 활성화에 중요한 것으로 확인된 부위도, 역시 폴리펩티드로부터 얻고자 하는 원하는 활성화에 따라 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 위한 우수한 후보가 될 수 있다. 또 다른 대안은 폴리펩티드 쇄상의 각각의 위치에서 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 단순히 연속적으로 치환하고, 폴리펩티드의 활성화에 대

한 영향을 관찰하는 것이다. 비천연 아미노산을 임의의 폴리펩티드 내로 치환하기 위한 위치를 선별하기 위한 임의의 수단, 기법 또는 방법이 본 발명에 사용하기에 적합하다는 것은 당업자에게 자명하다.

[0534] 본 출원에서 제시된 방법을 이용하여 이미 많은 데이터를 수집하였고, 본 명세서 뒷 부분에 제공되는 실시예에 기재된 바와 같이 잠재성 있고 유익한 돌연변이 부위를 확인하여 성공적 테스트를 마쳤다. 결실을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 돌연변이체의 구조 및 활성에 관한 추가적인 정보(심지어, 실시예에 구체적으로 기재하지 않은 제제화 및/또는 테스트에 관한 일부 상세사항을 포함하는 것)를 찾는 것 역시, 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 허용하기 쉬운 단백질의 영역을 결정하기 위해 조사될 수 있다. 유사한 방식으로, 프로테아제 분해 및 단일클론 항체를 사용하여, FGF-21 수용체의 결합에 관여하는 FGF-21의 영역을 확인할 수 있다. 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 허용하지 않을 것 같은 잔기가 일단 제거되면, 각각의 나머지 위치에서 제안된 치환의 영향을 조사할 수 있다. 다른 FGF 패밀리 구성원 및 FGF 수용체의 3차원 결정 구조로부터 모델을 생성할 수 있다. 단백질 데이터뱅크(Protein Data Bank)(PDB, www.rcsb.org에서 접속 가능함)는 큰 단백질 및 핵산 분자의 3차원 구조 데이터를 포함하는 중앙 집중형 데이터베이스(centralized database)이다. 3차원 구조 데이터를 이용할 수 없는 경우, 폴리펩티드의 2차 및 3차 구조를 조사하기 위한 모델을 만들 수 있다. 따라서, 당업자는 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환할 수 있는 아미노산 위치를 용이하게 확인할 수 있다.

[0535] 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 이 폴리펩티드의 구조를 파괴하지 않는 단백질 영역에 위치하는 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함한다.

[0536] 비천연적으로 코딩된 아미노산의 도입을 위한 예시적인 잔기는, 잠재적 수용체 결합 영역으로부터 배제된 잔기, 완전히 또는 부분적으로 용매에 노출되는 잔기, 인접 잔기와 최소한의 수소 결합 상호작용을 하거나 수소 결합 상호작용을 전혀 하지 않는 잔기, 인접 반응성 잔기에 최소한으로 노출되는 잔기, 하나 이상의 노출된 면 상에 있는 잔기, 제2의 FGF-21 또는 다른 분자 또는 그 단편에 병치되는 부위 또는 부위들, 수용체에 결합되거나 결합되지 않거나, 다른 생물학적 활성 분자에 커플링되거나 커플링되지 않은 FGF-21의 3차원적 2차, 3차 또는 4차 구조에 의해 예측할 때 높은 유연성을 갖거나 구조적으로 경직성이 있는 영역에 존재할 수 있는 잔기일 수 있거나, 완전한 구조의 유연성 또는 경직성을 원하는 대로 변경함으로써 FGF-21 그 자체 또는 하나 이상의 FGF-21을 포함하는 이량체 또는 다량체의 입체구조를 조절할 수 있다.

[0537] FGF 단백질의 패밀리는 결정학적 분석에 의해 확인되는 바와 같은 공통의 β -트레포일 또는 β -시트 구조를 갖는다[Harmer et al., Biochemistry 43:629-640 (2004)]. 당업자라면 FGF-21의 이러한 분석에 의해 어느 아미노산 잔기가 단백질의 3차 구조 내에 매립된 아미노산 잔기에 비해 표면에 노출되는지를 결정할 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시형태는 표면에 노출된 잔기인 아미노산을 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하는 것이다.

[0538] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 임의의 위치에, 즉, 서열 번호 1의 1~181번 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 77, 117, 126, 131 및 162번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 87, 77, 83, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번

위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다.

[0539] 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 91번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 131번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 87번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 86번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 126번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 83번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 146번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 135번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 96번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다. 일 실시형태에서, 상기 비천연 아미노산은 FGF-21의 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에 존재한다.

[0540] 또 다른 실시형태에서, 91번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 31번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치와 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치와 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 87번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 86번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 126번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 83번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재한다.

[0541] 또 다른 실시형태에서, 91번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재한다.

[0542] 또 다른 실시형태에서, 131번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다.

[0543] 또 다른 실시형태에서, 108번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 2개 이상에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 108번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 2개 이상에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재한다.

[0544] 또 다른 실시형태에서, 77번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 77번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열

번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재한다.

[0545]

FGF-21 또는 FGF 패밀리 구성원(들)의 결정 구조 및 FGF 수용체와의 그 상호작용을 관찰하면, 어떤 아미노산 잔기가 용매에 완전히 또는 부분적으로 접근 가능한 측쇄를 갖는지를 알 수 있다. 이들 위치에서의 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄는 단백질 표면으로부터 용매쪽으로 향할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)를 포함하는 위치 중 하나에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치 중 2개 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)를 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 87, 77, 83, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시형태에서, 비천연 아미노산은 하기 위치, 즉, 91, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상의 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 비천연 아미노산이 91번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)의 아미노산에 존재하는 경우, 상기 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다.

[0546]

또 다른 실시형태에서, 91번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 91번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 91번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 91번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치, 즉, 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에서 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 2개 이상의 위치에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 91번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 2개 이상의 위치에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산).

[0547]

또 다른 실시형태에서, 131번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나의 다른 비천연 아미노산은 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실

시형태에서, 131번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 131번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 131번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치, 즉, 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에서 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치 중 2개 이상에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 131번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치 중 2개 이상에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산).

[0548]

또 다른 실시형태에서, 108번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 108번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 108번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 108번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치, 즉, 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산)에서 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 108번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치 중 2개 이상의 위치에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 108번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치 중 2개 이상의 위치에 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 131, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산).

[0549]

또 다른 실시형태에서, 77번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하기 위치 중 하나에 하나의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 77번 위치에 비천연 아미노산이 존재하고, 하기 위치 중 하나에 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 77번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 하나에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 77번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 하나 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치, 즉, 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하

는 아미노산)에서 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 77번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 2개 이상에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산). 또 다른 실시형태에서, 77번 위치의 비천연 아미노산이 수용성 중합체에 연결되고, 2개 이상의 다른 비천연 아미노산이 하기 위치 중 2개 이상에 존재하며, 이들 비천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다: 91, 131, 108, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 및 36번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산).

[0550] 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 131번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이들 위치 중 하나 이상은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이들 위치 중 하나 이상은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치와 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이들 위치 중 하나 이상은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치와 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이들 위치 중 하나 이상은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치와 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이들 위치 중 하나 이상은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 91번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 131번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 108번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 77번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 87번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 86번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 126번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 83번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)에 비천연 아미노산이 존재하고, 이것은 수용성 중합체에 연결된다.

[0551] 다중 다양한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 FGF-21 폴리펩티드의 특정 위치로 치환하거나 도입할 수 있다. 일반적으로, FGF-21 폴리펩티드 또는 다른 FGF 패밀리 구성원과 그 수용체와의 회합 형태의 3차원 결정 구조의 조사, 보존적 치환의 선호도(즉, Phe, Tyr 또는 Trp을 아릴에 기초한 비천연적으로 코딩된 아미노산, 예컨대 p-아세틸페닐알라닌 또는 O-프로파길타이로신으로 치환함) 및 FGF-21 폴리펩티드로 도입하길 원하는 특정한 잔류기 이션 화학 반응(예를 들어, 알킨 부분을 보유하는 수용성 중합체와의 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응 또는 아릴 에스테르를 보유하는(이것은 다시 포스포인 부분을 도입함) 수용성 중합체와의 아미드 결합 형성이 일어나게 하길 원한다면 4-아지도페닐알라닌의 도입)에 기초하여 비천연적으로 코딩된 특정 아미노산을 도입을 위해 선택한다.

[0552] 일 실시형태에서, 상기 방법은 또한 단백질에 제1 반응기를 포함하는 비천연 아미노산을 도입하는 단계; 및 상기 단백질을 제2 반응기를 포함하는 분자(표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리메틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합제, 방사성핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화성 표지, 광친화성 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이트제, 보조 인자, 지방산, 탄

수화물, 폴리뉴클레오티드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 사카라이드, 수용성 덴드리머, 시클로텍스트린, 억제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 부분, 방사성 부분, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이징된 부분, 화학선에 의해 여기 가능한 부분, 광이성질체화 가능한 부분, 바이오틴, 바이오틴 유사체, 중원자를 도입하는 부분, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 부분, 동위원소 표지 부분, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅 기, 발색단, 에너지 전달제, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오티드, 래디오트랜스미터, 중성자 포획제, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 상기 제1 반응기는 제2 반응기와 반응하여, [3+2] 고리화 첨가 반응을 통해 비천연 아미노산에 분자를 부착시킨다. 일 실시형태에서, 상기 제1 반응기는 알킬닐 또는 아지도 부분이고, 상기 제2 반응기는 아지도 또는 알킬닐 부분이다. 예를 들어, 상기 제1 반응기는 알킬닐 부분(비천연 아미노산 p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하나 이에 한정되지 않음)이고, 상기 제2 반응기는 아지도 부분이다. 다른 예로서, 상기 제1 반응기는 아지도 부분(비천연 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌을 포함하나, 이에 한정되지 않음)이고, 상기 제2 반응기는 알킬닐 부분이다.

[0553] 일부 경우, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산 치환(들)은 FGF-21 폴리펩티드 내의 다른 부가, 치환 또는 결실과 조합되어 FGF-21의 다른 생물학적 특성에 영향을 줄 것이다. 일부 경우, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21 폴리펩티드의 안정성(단백질 분해에 대한 내성을 포함하나, 이에 한정되지 않음)을 증가시키거나 그의 수용체에 대한 FGF-21 폴리펩티드의 친화성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21 폴리펩티드의 약학적 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 FGF-21 폴리펩티드의 용해도(이. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현되는 경우를 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 부가, 치환 또는 결실은 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현된 후 폴리펩티드의 용해도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현된 후 폴리펩티드의 용해도를 증가시키는 비천연 아미노산을 도입하기 위한 또 다른 부위 이외에 천연적으로 코딩된 또는 비천연 아미노산으로의 치환을 위한 부위를 선택한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 FGF-21 폴리펩티드 수용체, 결합 단백질, 또는 회합된 리간드에 대한 친화성을 친화성을 조절하거나, FGF-21 수용체에 결합된 후의 신호 전달을 조절하거나, 순환 반감기를 조절하거나, 방출 또는 생체 이용률을 조절하거나, 정제를 용이하게 하거나, 또는 특정한 투여 경로를 개선하거나 변경하는 또 다른 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 FGF-21 변이체의 그 수용체에 대한 친화력을 증가시키는 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 유사하게, FGF-21 폴리펩티드는 검출(GFP를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 정제, 조직 또는 세포 막을 통한 수송, 전구약물 방출 또는 활성화, FGF-21 크기 축소, 또는 이 폴리펩티드의 다른 특징을 개선하는 화학적 또는 효소 절단 서열, 프로테아제 절단 서열, 반응기, 항체 결합 도메인(FLAG 또는 폴리-His를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 또는 친화성에 기초한 다른 서열(FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음) 또는 연결된 분자(바이오틴을 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 포함할 수 있다.

[0554] 일부 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 치환은 FGF-21 길항제를 생성한다. 일부 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용체 결합에 관여하는 영역에서 치환 또는 부가된다. 일부 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 해파린 결합에 관여하는 영역에서 치환 또는 부가된다. 일부 실시형태에서, FGF-21 길항제는 FGF-21이 길항제로서 작용하도록 하는 하나 이상의 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 길항제는 FGF-21 분자의 수용체 결합 영역에 존재하는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0555] 일부 경우에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 아미노산이 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 치환된다. 일부 경우에 있어서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는, 천연 아미노산의, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 또는 그 이상의 치환을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, FGF-21 내의 하나 이상의 잔기는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 일부 경우에 있어서, 상기 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 잔기는 하나 이상의 저분자량 선형 또는 분지형 PEG에 연결되고, 이로써 단일의 고분자량 PEG에 부착된 종에 비해 증대된 결합 친화력과 유사한 혈청 반감기를 나타내게 된다.

[0556] 일부 실시형태에서, FGF-21의 하기 잔기 중 최대 2개가 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다.

[0557] VII. 비진핵생물 및 진핵생물에서의 발현

[0558] 클로닝된 FGF-21 폴리뉴클레오티드의 발현 수준을 높이기 위해, 일반적으로, 본 발명의 FGF-21을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 전사를 지시하는 강력한 프로모터, 전사/번역 종결 서열과, 핵산이 단백질을 코딩할 경우, 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위를 포함하는 발현 벡터로 서브클로닝한다. 적절한 박테리아 프로모터는 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., and Ausubel et al.]에 기재되어 있다.

[0559] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 발현시키기 위한 박테리아 발현 시스템은, 이. 콜라이, 바실러스 종, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 애루기노사, 슈도모나스 푸티다 및 살모넬라(이들을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)에서 이용이 가능하다[Palva et al., Gene 22:229-235 (1983); Mosbach et al., Nature 302:543-545 (1983)]. 이러한 발현 시스템을 위한 키트는 상업적으로 입수가 가능하다. 포유동물 세포, 효모 및 곤충 세포를 위한 진핵생물 발현 시스템은 당업자에게 공지되어 있으며 또한 상업적으로 입수가 가능하다. (상기에 기재된) 오르토고날 tRNAs 및 아미노아실 tRNA 합성효소가 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용될 경우, 발현용 숙주 세포는 오르토고날 구성요소를 사용할 수 있는 능력에 기초하여 선택된다. 대표적인 숙주 세포로는 그램 양성 박테리아(비. 브레비스, 비. 서브틸리스 또는 스트렙토마이세스를 포함하나 이들에 한정되지 않음) 및 그램 음성 박테리아(이. 콜라이, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 애루기노사, 슈도모나스 푸티다)뿐만 아니라, 효모 및 다른 진핵 세포를 들 수 있다. O-tRNA/O-RS 쌍을 포함하는 세포도 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0560] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비진핵 숙주 세포는 비천연 아미노산을 유용한 다량으로 포함하는 단백질을 합성할 수 있는 능력을 제공한다. 일 양태에서, 조성물은 경우에 따라 10 μ g 이상, 50 μ g 이상, 75 μ g 이상, 100 μ g 이상, 200 μ g 이상, 250 μ g 이상, 500 μ g 이상, 1 mg 이상, 10 mg 이상, 100 mg, 1 g 이상, 또는 그 이상의 비천연 아미노산 함유 단백질, 또는 생체내 단백질 제조 방법(제조합 단백질 제조 및 정제에 대한 상세한 설명은 본 명세서에 제공되어 있음)에 의해 얻을 수 있는 양의 비천연 아미노산 함유 단백질을 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 단백질은 경우에 따라, 세포 용해물, 완충액, 약학적 완충액 또는 다른 액체 현탁액을 포함하나 이들에 한정되지 않는 액체(약 1 nL~약 100 L 또는 그 이상의 임의의 부피를 포함하나 이에 한정되지 않는 부피를 가짐) 1 L당 10 μ g 이상, 50 μ g 이상, 75 μ g 이상, 100 μ g 이상, 200 μ g 이상, 250 μ g 이상, 500 μ g 이상, 1 mg 이상 또는 10 mg 이상, 또는 그 이상의 단백질 농도(이에 한정되지 않음)로 조성물 중에 존재한다. 진핵 세포에서 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 다량(시험관내 번역을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 방법을 이용하여 얻을 수 있는 전형적인 양보다 많은 양을 포함하나 이에 한정되지 않음) 제조하는 것은 본 발명의 한 특징이다.

[0561] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비진핵 숙주 세포는 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 유용한 다량으로 생합성하는 능력을 제공한다. 예를 들어, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은, 세포 추출물, 세포 용해물, 배양 배지, 완충액 등 중 10 μ g/L 이상, 50 μ g/L 이상, 75 μ g/L 이상, 100 μ g/L 이상, 200 μ g/L 이상, 250 μ g/L 이상, 또는 500 μ g/L 이상, 1 mg/L 이상, 2 mg/L 이상, 3 mg/L 이상, 4 mg/L 이상, 5 mg/L 이상, 6 mg/L 이상, 7 mg/L 이상, 8 mg/L 이상, 9 mg/L 이상, 10 mg/L 이상, 적어도 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L, 60 mg/L, 70 mg/L, 80 mg/L, 90 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L, 700 mg/L, 800 mg/L, 900 mg/L, 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L 또는 그 이상의 단백질 농도(이에 한정되지 않음)로 제조될 수 있다.

[0562] I. 발현 시스템, 배양 및 단리

[0563] FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 효모, 곤충 세포, 포유동물 세포 및 박테리아를 비롯한 다수의 적절한 발현 시스템에서 발현시킬 수 있다. 대표적인 발현 시스템을 이하에 제시한다.

[0564] 효모

[0565] 본 명세서에서 사용되는 "효모"란 용어는 FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 발현시킬 수 있는 임의의 다양한 효모를 포함한다. 이러한 효모로는, 자낭균 효모류(*Endomycetales*), 담자균 효모류 및 불완전균 효모류(*Blastomycetes*)에 속하는 효모를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 자낭균 효모류는 2개의 패밀리를, 즉, 스퍼모프토라세아(*Spermothoraceae*) 및 사카로마이세타세아(*Saccharomycetaceae*)로 분류된다. 후자는 4개의 서브패밀리, 즉, 스킴조사카로마이코이데아(*Schizosaccharomycoideae*)[예를 들어, 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)속], 나드소니오이데아(*Nadsonioideae*), 리포마이코이데아(*Lipomycoideae*) 및 사카로마이코이데아(*Saccharomycoideae*)[예를 들어, 피키아(*Pichia*)속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*)속 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속]으로 이루어진다. 담자균 효모류는 류코스포르리둠(*Leucosporidium*)속, 로도스

포리둠(*Rhodosporidium*) 속, 스포리디오볼러스(*Sporidiobolus*) 속, 필로바시둠(*Filobasidium*) 속 및 필로바시디엘라(*Filobasidiella*) 속을 포함한다. 불완전균 효모류(*Blastomycetes*)에 속하는 효모는 2개의 패밀리, 즉, 스포로볼로마이세타세아(*Sporobolomycetaceae*)[예를 들어, 스포로볼로마이세스(*Sporobolomyces*) 속 및 볼레라(*Bullera*) 속] 및 크립토크카세아(*Cryptococcaceae*)[예를 들어, 칸디다(*Candida*) 속]으로 분류된다.

[0566] 본 발명에 사용하기에 특히 유용한 것은 피키아 속, 클루이베로마이세스 속, 사카로마이세스 속, 스킨조사카로마이세스 속, 한세놀라(*Hansenula*) 속, 토룰롭시스(*Torulopsis*) 속 및 칸디다 속[피. 파스토리스(*P. pastoris*), 피. 구일러리몬디이(*P. guillerimondii*), 에스. 세레비시아(*S. cerevisiae*), 에스. 칼스베르겐시스(*S. carlsbergensis*), 에스. 디아스타티쿠스(*S. diastaticus*), 에스. 더글라시이(*S. douglasii*), 에스. 클루이베리(*S. kluyveri*), 에스. 노르벤시스(*S. norbensis*), 에스. 오비포르미스(*S. oviformis*), 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*), 씨. 알비칸스(*C. albicans*), 씨. 말토사(*C. maltosa*) 및 에이치. 폴리몰파(*H. polymorpha*)를 포함하나, 이들에 한정되지 않음]에 속하는 종이다.

[0567] FGF-21 폴리펩티드의 발현을 위한 적절한 효모의 선택은 당업자의 기술 범위 내이다. 발현을 위한 효모 숙주를 선택함에 있어서, 적절한 숙주는, 예를 들어, 우수한 분비 성능, 낮은 단백질 분해 활성, 우수한 분비 성능, 우수한 가용성 단백질 생산 및 전반적인 견실성을 나타내는 것들을 포함할 수 있다. 효모는 일반적으로 캘리포니아 대학(미국 캘리포니아주 버클리 소재)의 생물물리학 및 의학물리학과의 효모 유전자 보존 센터(Yeast Genetic Stock Center)와, 미국 표준 균주 보존 기관(American Type Culture Collection: "ATCC")(미국 버지니아주 매너사스 소재)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 공급업체로부터 입수가 가능하다.

[0568] "효모 숙주" 또는 "효모 숙주 세포"란 용어는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용된 효모를 포함한다. 이 용어는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA를 수용한 본래의 효모 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모세포의 자손은 우연한 또는 의도된 돌연변이로 인하여 본래의 어버이와 형태에 있어서, 또는 게놈 DNA 또는 전체 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 모세포와 충분히 유사한 모세포의 자손은 이 정의가 의도하는 자손에 포함된다.

[0569] 다수의 효모 숙주로의 형질전환을 위한 염색체의 레플리콘 또는 통합 벡터를 비롯한 발현 및 형질전환 벡터가 개발되었다. 예를 들어, 에스. 세레비시아[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]; 씨. 알비칸스[Kurtz et al., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142]; 씨. 말토사[Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141]; 에이치. 폴리몰파[Gleeson et al., J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al., MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302]; 케이. 프라길리스[Das et al., J. BACTERIOL. (1984) 158:1165]; 케이. 락티스[De Louvencourt et al., J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg et al., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135]; 피. 구일러리몬디이[Kunze et al., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141]; 피. 파스토리스[미국 특허 제5,324,639호; 제4,929,555호; 및 제4,837,148호; Cregg et al., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376]; 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)[Beach et al., NATURE (1982) 300:706]; 및 와이. 리폴리티카(*Y. lipolytica*); 에이. 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]; 에에. 나이거(*A. niger*)[Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479]; 티. 레시아(*T. reesia*)(EP 0 244 234); 및 필라멘트형 진균류, 예를 들어, 뉴로스포라, 페닐실름, 툴리포클라둠(WO 91/00357)을 위한 발현 벡터가 개발되었으며, 이들은 각각 본 명세서에서 참고로 포함한다.

[0570] 효모 벡터를 위한 조절 서열은 당업자에게 알려져 있으며, 알코올 데하이드로게나제(ADH)(EP 0 284 044); 에놀라제; 글루코키나제; 글루코스-6-포스페이트 이소머라제; 글리세르알데히드-3-포스페이트-데하이드로게나제(GAP 또는 GAPDH); 헥소키나제; 포스포프럭토키나제; 3-포스포글리세레이트 뮤타제; 및 피루베이트 키나제(PyK)(EP 0 329 203)와 같은 유전자 유래의 프로모터 영역을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 산 포스파타제를 코딩하는 효모 PHO5 유전자 또한 유용한 프로모터 서열을 제공할 수 있다[Miyano-hara et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1]. 효모 숙주에 사용하기 위한 다른 적절한 프로모터로는 3-포스포글리세레이트 키나제[Hitzeman et al., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073]; 및 다른 당 분해 효소, 예컨대 피루베이트 데카복실라제, 트리오세포스페이트 이소머라제 및 포스포글루코스 이소머라제[Holland et al., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess et al., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149]에 대한 프로모터를 들 수 있다. 증식 조건에 의해 제어되는 추가적인 전사 이점을 갖는 유도성 효모 프로모터로는 알코올 데하이드로게나제 2; 이소사이토크롬 C; 산 포스파타제; 메탈로티오네인; 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제; 질소 대사와 관련된 분해

효소; 및 말토스 및 갈락토스 이용에 관여하는 효소에 대한 프로모터 영역을 들 수 있다. 효모 발현에 이용하기 위한 적절한 벡터 및 프로모터에 대해서는 EP 0 073 657에 추가로 기재되어 있다.

[0571] 효모 인핸서 역시 효모 프로모터와 함께 사용될 수 있다. 또한, 합성 프로모터 역시 효모 프로모터로서 기능할 수 있다. 예를 들어, 효모 프로모터의 상류의 활성화 서열(UAS)은 다른 효모 프로모터의 전사 활성화 영역에 연결되어, 합성 하이브리드 프로모터를 형성할 수 있다. 이러한 하이브리드 프로모터의 예로는 GAP 전사 활성화 영역에 연결된 ADH 조절 서열을 들 수 있다. 이에 대해서는, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제4,880,734호 및 제4,876,197호를 참조할 수 있다. 하이브리드 프로모터의 다른 예로는 GAP 또는 PyK와 같은 당 분해 효소 유전자의 전사 활성화 영역에 결합된 ADH2, GAL4, GAL10 또는 PHO5 유전자의 조절 서열로 구성되는 프로모터를 들 수 있다. 이에 대해서는, EP 0 164 556을 참조할 수 있다. 또한, 효모 프로모터는 효모 RNA 폴리머라제에 결합하여 전사를 개시시키는 능력을 갖는 비효모 기원의 자연 발생 프로모터를 포함할 수 있다.

[0572] 효모 발현 벡터의 일부를 구성할 수 있는 다른 조절 요소로는, 예를 들어 GAPDH 또는 에놀라제 유전자의 종결 서열을 들 수 있다[Holland et al., J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385]. 또한, 2 μ 플라스미드 기원의 복제 기점이 효모에 적합하다. 효모에 사용하기 위한 적절한 선별 유전자는 효모 플라스미드에 존재하는 trp1 유전자이다. 이에 대해서는, 문헌[Tschumper et al., GENE (1980) 10:157]; 및 문헌[Kingsman et al., GENE (1979) 7:141]을 참조할 수 있다. 상기 trp1 유전자는 트립토판 존재하에 증식 능력이 없는 돌연변이 효모 균주를 위한 선별 마커를 제공한다. 유사하게, Leu2 결함 효모 균주(ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 보유하는 공지의 플라스미드에 의해 보완된다.

[0573] 외인성 DNA를 효모 숙주로 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 일반적으로, 알칼리 양이온으로 처리된 온전한 효모 숙주 세포 또는 스펙로플라스트의 형질전환을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 예를 들어, 효모의 형질전환은 문헌[Hsiao et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829] 및 문헌[Van Solingen et al., J. BACT. (1977) 130:946]에 기재된 방법에 따라 수행할 수 있다. 그러나, 핵 주입, 전기천공 또는 원형질체 융합과 같은 방법에 의해 세포로 DNA를 주입하는 다른 방법 역시 문헌[SAMBROOK ET AL., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001)]에 개괄적으로 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 그 후, 효모 숙주 세포를 당업자에게 공지된 표준 기법을 이용하여 배양할 수 있다.

[0574] 효모 숙주 세포에서 이종성 단백질을 발현시키는 다른 방법도 당업계에 공지되어 있다. 이에 대해서는, 일반적으로, 미국 특허 출원 공개 제2002/0055169호, 미국 특허 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 RE37,343호 및 RE35,749호; PCT 공개 특허 출원 WO 99/07862; WO 98/37208; 및 WO 98/26080; 유럽 특허 출원 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 556을 참조할 수 있다. 또한, 문헌[Gellissen et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93]; 문헌[Romanos et al., YEAST (1992) 8(6):423-488]; 문헌[Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7]도 참조할 수 있으며, 이들 문헌은 각각 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함된다.

[0575] 효모 숙주 균주는 증폭 단계에서 당업자에게 공지된 표준 반회분식 발효 방법을 이용하여 발효기에서 증식시킬 수 있다. 발효 방법은 특정 효모 숙주의 탄소 이용 경로 또는 발현 제어 모드에 있어서의 차이를 고려하도록 적합화시킬 수 있다. 예를 들어, 사카로마이세스 효모 숙주의 발효는 단일 글루코스 공급원, 복합 질소 공급원(예를 들어, 카세인 가수분해물) 및 멀티 비타민 보충물을 필요로 할 수 있다. 이와는 대조적으로, 메틸 영양 요구성 효모 피. 파스토리스는 글리세롤, 메탄올 및 미량의 미네랄 공급원을 필요로 할 수 있으나, 최적의 증식 및 발현에는 단순한 암모늄(질소) 염만을 필요로 한다. 이에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제5,324,639호; 문헌[Elliott et al., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95]; 및 문헌[Fieschko et al., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113]을 참조할 수 있으며, 이들은 본 명세서에서 참고로 인용한다.

[0576] 그러나, 이러한 발효 방법은 이용된 효모 숙주 균주에 독립적으로 특정한 공통의 특징을 가질 수 있다. 예를 들어, 증식을 최대로 하기 위해, 증식 제한 영양소(일반적으로 탄소)를 증폭 단계 중에 발효기에 첨가할 수 있다. 또한, 발효 방법은 일반적으로 적정량의 탄소, 질소, 기본 염, 인 및 기타 미량 영양소(비타민, 미량 미네랄 및 염 등)를 함유하도록 디자인된 발효 배지를 이용한다. 피키아에 사용하기에 적합한 발효 배지의 예는 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 미국 특허 제5,324,639호 및 제5,231,178호에 기재되어 있다. 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 WO 2005/091944는 효모에서의 FGF-21의 발현에 관해 기재한다.

[0577] 배콜로바이러스 감염 곤충 세포

- [0578] "곤충 숙주" 또는 "곤충 숙주 세포"란 용어는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용된 곤충을 말한다. 이 용어는 형질감염된 본래의 곤충 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모세포의 자손은 우연한 또는 의도된 돌연변이로 인하여 본래의 어버이와 형태에 있어서, 또는 게놈 DNA 또는 전체 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 모세포와 충분히 유사한 모세포의 자손은 이 정의가 의도하는 자손에 포함된다.
- [0579] FGF-21 폴리펩티드의 발현을 위한 적절한 곤충 세포의 선택은 당업자에게 알려져 있다. 아에테스 아에집티(*Aedes aegypti*), 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 드로소필라 멜라노게스터(*Drosophila melanogaster*), 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 및 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)를 비롯한 몇 종의 곤충 종이 당업계에 잘 알려져 있으며 상업적으로 입수가 가능하다. 발현을 위한 곤충 숙주를 선택함에 있어서, 적절한 숙주는 특히, 우수한 분비 성능, 낮은 단백질 분해 활성 및 전반적인 건실성을 갖는 것으로 확인된 것들을 포함할 수 있다. 곤충은 일반적으로 캘리포니아 대학(미국 캘리포니아주 버클리 소재)의 생물물리학 및 의학물리학과 곤충 유전자 보존 센터(Insect Genetic Stock Center)와, 미국 표준 균주 보존 기관(American Type Culture Collection: "ATCC")(미국 버지니아주 매너사스 소재)을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 공급업체로부터 입수가 가능하다.
- [0580] 일반적으로, 배큘로바이러스 감염 곤충 발현 시스템의 성분은 배큘로바이러스 게놈의 단편과 발현시키고자 하는 이종성 유전자의 삽입을 위한 편리한 제한 부위를 둘 다 포함하는 운반 벡터(통상적으로 박테리아 플라스미드); 운반 벡터 내의 배큘로바이러스 특이적 단편에 상동성인 서열을 갖는 야생형 배큘로바이러스(이것은 배큘로바이러스 게놈으로의 이종성 유전자의 상동성 재조합을 가능하게 함); 및 적절한 곤충 숙주 세포 및 배양 배지를 포함한다. 벡터를 구성하고 세포를 형질감염시키고 플라크를 픽킹하고 배양물에서 세포를 배양하는 것 등에 사용되는 재료, 방법 및 기법은 당업계에 공지되어 있고, 이러한 기법을 기재한 매뉴얼이 이용 가능하다.
- [0581] 운반 벡터에 이종성 유전자를 삽입한 후, 상기 벡터 및 야생형 바이러스 게놈을 곤충 숙주 세포로 형질감염시키며, 여기에서 상기 벡터와 바이러스 게놈이 재조합된다. 패키징된 재조합 바이러스를 발현시키고 재조합 플라크를 확인하여 정제한다. 배큘로바이러스/곤충 발현 시스템에 대한 재료 및 방법은, 예를 들어 Invitrogen Corp. (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)으로부터 키트 형태로 시판된다. 이러한 기법들은 일반적으로 당업자에게 알려져 있으며, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함하는 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)]; 문헌[AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994)]; 문헌[KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992)]; 및 문헌[O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]도 참조할 수 있다.
- [0582] 실제로, 배큘로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 이용한 각종 이종성 단백질의 생산은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 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 참조할 수 있으며, 이들 특허 문헌들은 본 명세서에서 참고로 인용한다.
- [0583] 배큘로바이러스/곤충 세포 발현 시스템에 유용한 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 배큘로바이러스 오토그래파칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다면체 바이러스(AcNPV)(헬퍼 비의존적인 바이러스 발현 벡터임) 유래의 곤충 발현 및 운반 벡터를 포함한다. 이 시스템 유래의 바이러스 발현 벡터는 통상적으로 이종성 유전자의 발현을 유도하기 위해 강력한 바이러스 폴리헤드린 유전자 프로모터를 이용한다. 일반적으로, 문헌[O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)]을 참조할 수 있다.
- [0584] 외래 유전자를 배큘로바이러스 게놈에 삽입하기 전에, 프로모터, 리더(필요에 따라), 관심있는 코딩 서열 및 전사 종결 서열을 포함하는 전술한 성분들을 일반적으로 중간 전환 구성체(운반 벡터)로 조립한다. 중간 전환 구

성체는 대개 박테리아 등의 숙주에서 안정하게 유지될 수 있는 염색체의 요소(예를 들어, 플라스미드)와 같은 레플리콘으로 유지된다. 이 레플리콘은 복제 시스템을 가지며, 따라서 이것은 클로닝 및 증폭을 위한 적합한 숙주에서 유지될 수 있다. 더 상세하게는, 상기 플라스미드는, 이. 콜라이에서의 선별 및 증폭을 위해, 폴리헤드린 폴리아데닐화 신호[Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177] 및 원핵생물 암피실린 내성(amp) 유전자 및 복제 기점을 포함할 수 있다.

[0585] 외래 유전자를 AcNPV로 도입하기 위해 통상적으로 사용되는 운반 벡터는 pAc373이다. 폴리헤드린 출발 코돈을 ATG에서 ATT로 변경하고 ATT 하류에 BamHI 클로닝 부위 32 염기쌍을 도입하는 pVL985를 비롯한 당업자에게 공지된 많은 다른 벡터들도 디자인되었다. 이에 대해서는, 문헌[Luckow and Summers, VIROLOGY 170:31 (1989)]을 참조할 수 있다. 시판되는 다른 벡터로는, 예를 들어, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen Corp.)를 들 수 있다.

[0586] 이중성 유전자를 삽입한 후, 운반 벡터와 야생형 배콜로바이러스 계통을 곤충 세포 숙주에 동시에 형질감염시킨다. 이중성 DNA를 배콜로바이러스의 원하는 부위에 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이에 대해서는, 문헌[SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)]; 문헌[Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156]; 문헌[Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 170:31]을 참조할 수 있다. 예를 들어, 삽입은 상동성 이중 교차 재조합에 의해 폴리헤드린 유전자 등의 유전자로 행해질 수 있고; 삽입은 또한 원하는 배콜로바이러스 유전자 내로 조작된 제한 효소 부위로 행해질 수 있다[참고 문헌: Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91].

[0587] 형질감염은 전기천공에 의해 행할 수 있다[참고 문헌: TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501]. 대안으로, 재조합 발현 벡터와 배콜로바이러스로 곤충 세포를 형질감염시키기 위해 리포솜을 사용할 수 있다[참고 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]. 상업적으로 이용이 가능한 리포솜으로는, 예를 들어, Cellfectin[®] 및 Lipofectin[®] (캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen, Corp.)을 들 수 있다. 또한, 인산칼슘 형질감염을 이용할 수 있다[참고 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].

[0588] 배콜로바이러스 발현 벡터는 일반적으로 배콜로바이러스 프로모터를 포함한다. 배콜로바이러스 프로모터는 배콜로바이러스 RNA 폴리머라제에 결합하여 코딩 서열(예를 들어, 구조 유전자)의 mRNA로의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 말단 가까이에 위치하는 전사 개시 영역을 갖는다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 폴리머라제 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 배콜로바이러스 프로모터는 또한, 존재할 경우 일반적으로 구조 유전자에서 멀리 떨어진 인핸서라 불리는 제2의 도메인을 가질 수 있다. 또한, 발현은 조절성일 수도 있고 항상성일 수도 있다.

[0589] 감염 주기에서 후기에 많이 전사되는 구조 유전자가 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 예로는 바이러스 폴리헤드린 단백질을 코딩하는 유전자[FRIESEN ET AL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839 및 0 155 476] 유래의 서열 및 p10 단백질을 코딩하는 유전자[Vlak et al., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765] 유래의 서열을 들 수 있다.

[0590] 새로 형성된 배콜로바이러스 발현 벡터를 감염성 재조합 배콜로바이러스로 패키징하고, 그 후 성장된 플라크를 당업자에게 공지된 기법에 의해 정제할 수 있다[참고 문헌: Miller et al., BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)].

[0591] 몇 종의 곤충 세포로 감염시키기 위한 재조합 배콜로바이러스 발현 벡터가 개발되었다. 예를 들어, 재조합 배콜로바이러스는, 특히, 아에테스 아에집티(ATCC 번호 CCL-125), 봄빅스 모리(ATCC 번호 CRL-8910), 드로소필라 멜라노게스터(ATCC 번호 1963), 스포둡테라 프루기페르다 및 트리코플루시아 니를 위한 재조합 배콜로바이러스가

개발되었다[참고 문헌: Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell et al., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156]. 일반적으로, 문헌[Fraser et al., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225]을 참조할 수도 있다. 더 구체적으로, 배콜로바이러스 발현 벡터 시스템에 사용되는 세포주는 통상적으로, Sf9(스포도테라 프루기페르다)(ATCC 번호 CRL-1711), Sf21(스포도테라 프루기페르다)[Invitrogen Corp., 카탈로그 번호 11497-013(미국 캘리포니아주 칼사배드 소재)], Tri-368(트리코폴시아 니) 및 High-Five™ BTI-TN-5B1-4(트리코폴시아 니)를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0592] 배콜로바이러스 발현 시스템에서의 이중성 폴리펩티드의 직접 및 융합 발현을 위한 세포 및 배양 배지는 상업적으로 입수가 가능하며, 세포 배양 기술은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다.

[0593] 이. 콜라이, 슈도모나스 종 및 다른 원핵생물

[0594] 박테리아 발현 기법은 당업자에게 공지되어 있다. 다종 다양한 벡터가 박테리아 숙주에 이용될 수 있다. 벡터는 단일 카피 또는 카피수가 적거나 많은 다중 카피 벡터일 수 있다. 벡터는 클로닝 및/또는 발현에 이용될 수 있다. 벡터에 관한 다수의 문헌, 많은 벡터의 상업적 입수 용이성과, 벡터와 그 제한 맵 및 특성을 기술한 매뉴얼을 감안할 때, 본원에서는 종합적인 설명이 필요하지 않다. 잘 알려져 있는 바와 같이, 벡터는 일반적으로 선별을 가능하게 하는 마커, 세포독성제 내성을 제공할 수 있는 마커, 자가영양성 또는 면역원성을 제공할 수 있는 마커를 포함한다. 대체로, 상이한 특성을 제공하는 복수의 마커가 존재한다.

[0595] 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 폴리머라제에 결합하여 코딩 서열(예를 들어, 구조 유전자)의 mRNA로의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 말단 가까이에 위치하는 전사 개시 영역을 갖는다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 폴리머라제 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 박테리아 프로모터는 또한 RNA 합성이 시작되는 인접 RNA 폴리머라제 결합 부위와 중첩될 수 있는 오퍼레이터라 불리는 제2의 도메인을 가질 수 있다. 이 오퍼레이터는 유전자 리프레서 단백질이 이 오퍼레이터에 결합함에 따라 음으로 조절되는(유도성) 전사를 허용하여, 특정 유전자의 전사를 억제한다. 오퍼레이터 등의 음성 조절 요소가 없어도 항상성 발현은 일어날 수 있다. 또한, 존재할 경우 일반적으로 RNA 폴리머라제 결합 서열 가까이에(5') 위치하는 유전자 액티베이터 단백질 결합 서열에 의해 양성 조절이 일어날 수 있다. 유전자 액티베이터 단백질의 일례로는 이화물질 액티베이터 단백질(CAP)이 있으며, 이것은 에스케리치아 콜라이(이. 콜라이)에서 lac 오페론의 전사 개시를 돕는다[Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. 따라서, 조절된 발현은 양성일 수도 있고 음성일 수 있기 때문에, 전사를 증대 또는 감소시킬 수 있다.

[0596] 대사 경로 효소를 코딩하는 서열이 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 예로는 갈락토스, 락토스(lac)[Chang et al., NATURE (1977) 198:1056] 및 말토스와 같은 당 대사 효소 유래의 프로모터 서열을 포함한다. 추가적인 예로는 트립토판(trp)과 같은 생합성 효소로부터 유래된 프로모터 서열을 들 수 있다[Goeddel et al., NUC. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton et al., NUC. ACIDS RES. (1981) 9:731; 미국 특허 제 4,738,921호; EP 공개 제036 776호 및 제121 775호, 이 문헌들은 본원에서 참고로 인용함]. 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 명세서에서 참고로 인용하는 미국 특허 제4,689,406호] 프로모터 시스템 역시 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법은 FGF-21 폴리펩티드를 높은 수준으로 유도하기 위해 T7 프로모터와 같은 강력한 프로모터를 이용한다. 이러한 벡터의 예는 당업자에게 공지되어 있으며, Novagen의 pET29 시리즈 및 본 명세서에서 참고로 인용하는 WO 99/05297에 기재된 pPOP 벡터를 들 수 있다. 이러한 발현 시스템은 숙주 세포 생존력 또는 성장 파라미터에 불리한 영향을 미치지 않고서 FGF-21 폴리펩티드를 높은 수준으로 생산한다. pET19(Novagen)는 당업계에 공지된 또 다른 벡터이다.

[0597] 또한, 자연에 존재하지 않는 합성 프로모터도 박테리아 프로모터로서 기능한다. 예를 들어, 한 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 전사 활성화 서열을 다른 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 오페론 서열과 연결하여, 합성 하이브리드 프로모터를 형성할 수 있다[본 명세서에서 참고로 인용하는 미국 특허 제4,551,433호]. 예를 들어, 상기 tac 프로모터는 lac 리프레서에 의해 조절되는 lac 오페론 서열과 trp 프로모터 양자로 이루어진 하이브리드 trp-lac 프로모터이다[Amann et al., GENE (1983) 25:167; de Boer et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. 또한, 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 폴리머라제에 결합하여 전사를 개시시키는 능력을 갖는 비박테리아 기원의 자연 발생 프로모터를 포함할 수 있다. 비박테리아 기원의 자연 발생 프로모터 역시 상용성 RNA 폴리머라제와 커플링되어, 원핵생물에서 몇 개 유전자를 높은 수준으로 발현시킬 수 있다. 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제/프로모터 시스템이 커플링된 프로모터 시스템의 한 예이다[Studier et al., J. MOL.

BIOL. (1986) 189:113; Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. 또한, 하이브리드 프로모터는 또한 박테리오파지 프로모터와 이. 콜라이 오퍼레이터 영역으로 이루어질 수 있다(EP 공개 제267 851호).

[0598] 기능성 프로모터 서열 이외에도, 효율적인 리보솜 결합 부위 역시 원핵생물에서 외래 유전자의 발현에 유용하다. 이. 콜라이의 경우, 리보솜 결합 부위가 샤인-달가노(SD) 서열이라 불리며, 개시 코돈(ATG) 및 이 개시 코돈의 3~11 뉴클레오티드 상류에 위치하는 3~9 뉴클레오티드 길이의 서열을 포함한다[Shine et al., NATURE (1975) 254:34]. 이 SD 서열이 SD 서열과 이. 콜라이 16S rRNA의 3' 사이의 염기쌍 형성에 의해 mRNA의 리보솜에의 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 진핵생물 유전자 및 원핵생물 유전자를 발현시키는 것에 대해서는 문헌 [Sambrook et al., "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]을 참조할 수 있다.

[0599] "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"란 용어는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용된 박테리아를 말한다. 이 용어는 형질감염된 본래의 박테리아 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모세포의 자손은 우연한 또는 의도된 돌연변이로 인하여 본래의 어버이와 형태에 있어서, 또는 게놈 DNA 또는 전체 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. FGF-21 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 모세포와 충분히 유사한 모세포의 자손은 이 정의가 의도하는 자손에 포함된다.

[0600] FGF-21 폴리펩티드의 발현을 위한 적절한 숙주 박테리아의 선택은 당업자에게 공지되어 있다. 발현용 박테리아 숙주를 선택함에 있어서, 적절한 숙주는, 특히, 우수한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질 분해 활성 및 종합적인 견실성을 갖는 것으로 확인된 것들을 포함할 수 있다. 박테리아 숙주는 일반적으로 캘리포니아 대학(미국 캘리포니아주 버클리 소재)의 생물물리학 및 의학물리학과의 박테리아 유전자 보존 센터(Bacterial Genetic Stock Center)와, 미국 표준 균주 보존 기관(American Type Culture Collection: "ATCC")(미국 버지니아주 매너사스 소재)을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 공급업체로부터 입수가 가능하다. 산업적/약학적 발효는 일반적으로 K 균주(예를 들어, W3110)로부터 유래된 박테리아 또는 B 균주(예를 들어, BL21)로부터 유래된 박테리아를 사용한다. 이들 균주는 그 성장 파라미터가 매우 잘 알려져 있고 견실성이 있기 때문에 특히 유용하다. 또한, 이들 균주는 비병원성이며, 이는 안전성 및 환경적 이유로 상업상 중요하다. 적절한 이. 콜라이 숙주의 다른 예로는 BL21 균주, DH10B 균주, 또는 이들의 유도체를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 이. 콜라이 숙주는 OMP- 및 LON-를 포함하나 이들에 한정되지 않는 프로테아제가 없는 균주이다. 숙주 세포 균주는 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 에루기노사 및 슈도모나스 푸티다를 포함하나 이들에 한정되지 않는 슈도모나스 종일 수 있다. MB101 균주로 명명되는 슈도모나스 플루오레센스 비오바 1(*Pseudomonas fluorescens biovar 1*)이 재조합 생산에 유용한 것으로 알려져 있으며, 치료용 단백질의 생산 공정에 이용 가능하다. 슈도모나스 발현 시스템의 예는 The Dow Chemical Company로부터 입수 가능한 시스템을 숙주 균주로서 포함한다[미국 마이애미주 미들랜드 소재, www.dow.com으로 접속 가능함].

[0601] 일단 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면(즉, 발현 구성체가 숙주 세포에 도입되고 적절한 발현 구성체를 갖는 숙주 세포가 단리되면), 그 재조합 숙주 세포 균주를 FGF-21 폴리펩티드의 제조에 적합한 조건하에 배양한다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 재조합 숙주 세포 균주의 배양 방법은 이용된 발현 구성체의 성질과 숙주 세포의 실체에 따라 달라진다. 재조합 숙주 균주는 일반적으로 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 배양한다. 재조합 숙주 세포는 일반적으로 탄소, 질소 및 무기염의 동화 가능한 공급원을 함유하고 경우에 따라 비타민, 아미노산, 성장 인자 및 기타 당업자에게 공지된 단백질성 배양 보충물을 함유하는 액체 배지에서 배양한다. 숙주 세포 배양을 위한 액체 배지는 경우에 따라 바람직하지 않은 미생물의 증식을 방지하기 위한 항생제 또는 항진균제와 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선별하기 위한 항생제(이에 한정되지 않음)를 비롯한 화합물을 함유할 수 있다.

[0602] 재조합 숙주 세포는, 회분식 또는 연속식으로 세포를 회수하거나(FGF-21 폴리펩티드가 세포 내에 축적되는 경우), 또는 배양 상청액을 회수하면서, 회분식 또는 연속식으로 배양할 수 있다. 진핵 숙주 세포에서의 생산을 위해서는, 회분식 배양 및 세포 회수가 바람직하다.

[0603] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 일반적으로 재조합 시스템에서 발현시킨 후 정제한다. 상기 FGF-21 폴리펩티드는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 박테리아 숙주 세포에서 생산되는 FGF-21 폴리펩티드는 난용성 또는 불용성(봉입체의 형태)일 수 있다. 본 발명의 일

실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법 및 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조합적으로 제조된 단백질의 용해도를 증가시키기 위한 목적으로 선택된 아미노산 치환을 FGF-21 폴리펩티드 내로 용이하게 도입할 수 있다. 불용성 단백질의 경우, 이 단백질을 원심분리에 의해 숙주 세포 용해물로부터 수거한 후 추가로 세포의 균질화를 실시할 수 있다. 난용성 폴리펩티드의 경우, 폴리에틸렌 이민(PEI)을 포함하나 이에 한정되지 않는 화합물을 첨가하여 부분 용해성 단백질의 침전을 유도할 수 있다. 그 후, 침전된 단백질을 원심분리에 의해 편리하게 수거할 수 있다. 제조합 숙주 세포를 파괴하거나 균질화하여, 당업자에게 공지된 다양한 방법을 이용하여 세포 내로부터 용입체를 방출시킬 수 있다. 숙주 세포 파괴 또는 균질화는 효소에 의한 세포 파괴, 초음파 처리, 다운스(dounce) 균질화 또는 고압 방출 파괴를 포함하나 이들에 한정되지 않는 잘 알려진 기법을 이용하여 수행할 수 있다. 본 발명 방법의 일 실시형태에서, 고압 방출 기법을 이용하여 이. 콜라이 숙주 세포를 파괴하여 FGF-21 폴리펩티드의 용입체를 방출시킬 수 있다. FGF-21 폴리펩티드의 용입체를 취급하는 경우, 가용화, 기계적 전단 또는 단백질 분해와 같은 요인으로 인한 손실없이 용입체의 수율을 최대화하기 위해, 반복 수행시 균질화 시간을 최소화하는 것이 유리할 수 있다.

[0604] 그 후, 당업계에 공지된 다수의 적절한 가용화제 중 임의의 것을 사용하여 불용성의 또는 침전된 FGF-21 폴리펩티드를 가용화할 수 있다. FGF-21 폴리펩티드는 요소 또는 구아니딘 염산염으로 가용화할 수 있다. 취급이 편리한 회분 크기를 이용하여 대형 회분을 생산할 수 있도록, 가용화된 FGF-21 폴리펩티드의 부피를 최소화해야 한다. 이 요인은 제조합 숙주가 부피가 수천 리터인 회분으로 배양될 수 있는 대규모 상업적 셋팅에 있어서 중요할 수 있다. 또한, 특히 인간을 대상으로 한 의약 용도에 있어서는, 대규모 상업적 셋팅으로 FGF-21 폴리펩티드를 제조하는 경우, 기계류 및 용기, 또는 단백질 생성물 자체에 손상을 줄 수 있는 독한 화학물질은 가능한 한 피해야 한다. 보다 독한 변성제인 구아니딘 염산염 대신에 더 순한 변성제인 요소를 사용하여 FGF-21 폴리펩티드 용입체를 가용화할 수 있다는 점이 본 발명의 방법에서 확인되었다. 요소의 사용은 FGF-21 폴리펩티드 용입체를 효율적으로 가용화하면서 FGF-21 폴리펩티드의 제조 및 정제 공정에서 사용되는 스테인레스 스틸 장치에 대한 손상 위험을 현저하게 감소시킨다.

[0605] 가용성 FGF-21 단백질의 경우, FGF-21은 주변세포질 공간 또는 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 또한, FGF-21은, 서열 번호 39~44에 기재된 것들을 비롯한 8개의 상이한 리더 서열을 포함하는 플라스미드 코딩 구성체를 사용하여, 이들을 W3110-B2 세포로 형질전환시킨 후, OD 약 0.8(이 시점에 0.01% 아라비노스로 발현을 유도함)에 도달할 때까지 37°C에서 세포를 배양하는 것에 의해, W3110-B2 세포의 주변세포질 공간으로 분비된다. 5시간 후, 배양물로부터 주변세포질 방출 시료를 조제하여 겔에서 전개하였으며(도 33), 이는 전체 발현(총 용해물) 및 주변세포질 분비(가용성 분획)를 나타내었다.

[0606] 또한, 가용성 FGF-21은 숙주 세포의 세포질 내에 존재할 수 있다. 가용성 FGF-21은 정제 단계 수행 전에 농축시키는 것이 필요할 수 있다. 당업자에게 공지된 표준 기법을 이용하여, 예를 들어 세포 용해물 또는 배양 배지로부터 가용성 FGF-21을 농축시킬 수 있다. 또한, 당업자에게 공지된 표준 기법을 이용해서 숙주 세포를 파괴하여, 숙주 세포의 세포질 또는 주변세포질 공간으로부터 가용성 FGF-21을 방출시킬 수 있다.

[0607] FGF-21 폴리펩티드가 융합 단백질로서 생산되는 경우, 융합 서열을 제거해도 좋다. 융합 서열의 제거는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 수행할 수 있다. 융합 서열의 효소적 제거는 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 융합 서열의 제거를 위한 효소의 선택은 융합의 종류에 의해 결정되게 되며, 반응 조건은 당업자가 알고 있는 바와 같이 효소의 선택에 의해 구체적으로 결정된다. 화학적 절단은 시아노겐 브로마이드, TEV 프로테아제 및 다른 시약을 포함하나 이들에 한정되지 않는 시약을 사용하여 수행할 수 있다. 절단된 FGF-21 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 방법에 의해 절단된 융합 서열로부터 정제될 수 있다. 이러한 방법은 당업자가 알고 있는 바와 같이 융합 서열 및 FGF-21 폴리펩티드의 본질 및 특성에 의해 결정될 것이다. 정제 방법은 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 투석, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0608] 또한, FGF-21 폴리펩티드를, 단백질 용액으로부터 DNA를 제거하기 위해 정제할 수 있다. DNA는, 침전 또는 이온 교환 크로마토그래피와 같은 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 제거할 수 있으나, 프로타민 설페이트를 포함하나 이에 한정되지 않는 핵산 침전제를 사용한 침전에 의해 제거해도 좋다. FGF-21 폴리펩티드는 원심분리 또는 여과를 포함하나 이들에 한정되지 않는 잘 알려진 표준 방법을 이용하여 침전된 DNA로부터 분리할 수 있다. 숙주 핵산 분자의 제거는 FGF-21 폴리펩티드가 인간을 치료하는 데 사용되는 셋팅에서 중요한 인자이며, 본 발명의 방법은 숙주 세포 DNA를 약학적으로 허용되는 수준까지 감소시킨다.

[0609] 또한, 발효기, 진탕 플라스크, 유동층 생물반응기(bioreactor), 중공 섬유 생물반응기, 롤러 보틀(roller

bottle) 배양 시스템 및 교반 탱크 생물반응기 시스템을 포함하나 이들에 한정되지 않는 소규모 또는 대규모 발효 방법을 단백질 발현에 이용할 수 있다. 이러한 방법들 각각은 회분식, 반회분식 또는 연속식 공정으로 수행될 수 있다.

[0610] 본 발명의 인간 FGF-21 폴리펩티드는 일반적으로 당업계의 표준 방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예를 들어, 배양 배지 또는 세포 용해물을 원심분리하거나 여과하여 세포 잔해물을 제거할 수 있다. 상청액을 원하는 부피로 농축 또는 희석하거나, 추가 정제를 위해 제제를 컨디셔닝하기 위해 적절한 완충액으로 정용여과할 수 있다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 추가 정제는 온전한 형태로부터 FGF-21 폴리펩티드 변이체의 탈아미드화 형태 및 절단된 형태를 분리하는 단계를 포함한다.

[0611] 하기의 예시적인 공정 중 임의의 것이 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 정제에 이용될 수 있다: 친화성 크로마토그래피, 음이온 교환 또는 양이온 교환 크로마토그래피(DEAE SEPHAROSE를 사용하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음); 실리카 크로마토그래피; 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC); 역상 HPLC; 겔 여과(SEPHADEX G-75를 사용하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기 배제 크로마토그래피; 금속-킬레이트 크로마토그래피; 한외여과/정용여과; 에탄올 침전; 황산암모늄 침전; 크로마토포키싱; 치환 크로마토그래피; 전기영동법(분취용 등전 포커싱을 포함하나 이에 한정되지 않음); 차등 용해도법(황산암모늄 침전을 포함하나 이에 한정되지 않음); SDS-PAGE; 또는 추출.

[0612] 비천연 아미노산을 포함하는 단백질, 비천연 아미노산을 포함하는 펩티드, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 항체, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질에 대한 결합 파트너 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 본 발명의 단백질은, 당업자에게 알려져 있고 이용되는 표준 절차에 따라 부분적으로 균질하게 또는 실질적으로 균질하게 정제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 또는 염기 추출, 컬럼 크로마토그래피, 친화성 컬럼 크로마토그래피, 음이온 교환 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 렉틴 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업자에게 공지된 다수의 임의의 방법에 의해 회수 및 정제될 수 있다. 정확히 폴딩된 성숙 단백질을 형성하기 위해 필요에 따라 단백질 리폴딩 단계가 이용될 수 있다. 고순도가 요구되는 경우 최종 정제 단계에 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 친화성 크로마토그래피 또는 다른 적절한 방법을 이용할 수 있다. 일 실시형태에서, 비천연 아미노산(또는 비천연 아미노산을 포함하는 단백질 또는 펩티드)에 대해 생성된 항체는 하나 이상의 비천연 아미노산(들)을 포함하는 단백질 또는 펩티드의 친화성에 기초한 정제(이것을 포함하나 이것에 한정되지 않음)를 위한 정제 시약으로서 사용된다. 일단 폴리펩티드가 필요에 따라 부분적으로 또는 균질한 정도로 정제되면, 이 폴리펩티드는 경우에 따라 분석 성분, 치료제, 예방제, 진단제, 연구 시약 및/또는 항체 제조용 면역원을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다종 다양한 용도에 사용된다. 본 발명의 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 폴리펩티드 또는 에피토프 보유 단편, 또는 세포를 동물, 바람직하게는 인간이 아닌 동물에게 통상의 프로토콜을 이용하여 투여함으로써 얻을 수 있다. 당업자라면 다양한 공지의 기법을 이용하여 항체를 생성할 수 있다. 또한, 유전자이식 마우스, 또는 다른 포유동물을 비롯한 다른 유기체를 인간화 항체를 발현시키는 데 이용할 수 있다. 전술한 항체는, 폴리펩티드를 발현하는 클론을 단리 또는 확인하거나 폴리펩티드를 정제하는 데 이용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체는 질병을 치료하는 데에도 이용될 수 있다.

[0613] 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 또한 백신으로도 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물에게, 항체 및/또는 T 세포 면역 반응을 유발하기에 적합한(예를 들어, 사이토카인 생산 T 세포 또는 세포독성 T 세포를 포함함) 본 발명의 폴리펩티드를 집중하여 상기 동물을 질병(이 질병이 개체에 이미 확립되었거나 그렇지 않거나 관계없이)으로부터 보호하는 것을 포함하는 포유동물에서 면역 반응을 유발하는 방법에 관한 것이다. 포유동물에서의 면역 반응은, 본 발명의 폴리펩티드를, 이 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 생체내 발현을 지시하는 벡터를 통해 전달함으로써, 본 발명의 질병으로부터 상기 동물을 보호할 수 있도록 항체를 생산하는 면역 반응을 유발하는 것을 포함하는 방법에 의해 유발될 수도 있다. 벡터의 투여 방법 중 하나는 벡터를 입자 상의 코팅으로서 목적 세포로 추진시키는 등의 방법이다. 이러한 핵산 벡터는 DNA, RNA, 변형된 핵산, 또는 DNA/RNA 하이브리드를 포함할 수 있다. 백신으로서 사용하기 위해서는, 폴리펩티드 또는 핵산 벡터는 일반적으로 백신 제제(조성물)로서 제공된다. 이 제제는 적절한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 위에서 분해될 수 있기 때문에, 이것은 비경구(예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 피내 주사) 투여될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충액, 정균제 및 제제가 해당 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액, 및 현탁제 또는 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 백신 제제는 또한, 당업자에게 알려져 있는, 이 제제의 면역원성을 증

대시킴을 위한 보조제 시스템을 포함할 수 있다. 투여량은 백신의 비활성에 따라 달라지며 통상적인 실험에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0614] 본 명세서에서 언급된 다른 참고 문헌에 더하여, 다양한 정제/단백질 폴딩 방법이 당업자에게 공지되어 있으며, 그 예로는 문헌[R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)]; 문헌[Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)]; 문헌[Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.]; 문헌[Bollag et al., (1996) Protein Methods. 2nd Edition Wiley-Liss, NY]; 문헌[Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ]; 문헌[Harris and Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England]; 문헌[Harris and Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England]; 문헌[Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY]; 문헌[Janson and Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY]; 및 문헌[Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ]; 및 이 문헌들에 이용된 참고 문헌들에 기재된 것들을 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0615] 진핵 숙주 세포 또는 비진핵 숙주 세포에서 비천연 아미노산을 갖는 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드를 제조하는 것의 한 가지 장점은, 일반적으로 그 단백질 또는 폴리펩티드가 그 본래의 입체구조로 폴딩된다는 점이다. 그러나, 본 발명의 특정 실시형태에서, 당업자라면 합성, 발현 및/또는 정제 후, 단백질 또는 펩티드는 관련 폴리펩티드의 원하는 입체구조와는 상이한 입체구조를 가질 수 있다는 것을 알 것이다. 본 발명의 일 양태에서, 발현된 단백질 또는 폴리펩티드를 경우에 따라 변형시킨 후 재생시킨다. 이는, 샤페로닌(chaperonin)을 관심있는 단백질 또는 폴리펩티드에 첨가하는 방법, 단백질을 카오트로픽제(chaotropic agent)(예컨대, 구아니딘 HCl) 중에서 가용화하는 방법 및 단백질 디설파이드 이소머라제를 사용하는 방법 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행한다.
- [0616] 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변형시키고 환원시킨 후, 폴리펩티드를 바람직한 입체구조로 리폴딩하는 것이 종종 바람직하다. 예를 들어, 구아니딘, 요소, DTT, DTE 및/또는 샤페로닌을 관심있는 번역 생성물에 첨가할 수 있다. 단백질의 환원, 변형 및 재생 방법은 당업자에게 공지되어 있다(상기 참고 문헌 및 문헌[Debinski, et al., (1993) J. Biol. Chem., 268:14065-14070]; 문헌[Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4:581-585]; 및 문헌[Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205:263-270] 참조). 예를 들어, Debinski 등의 문헌은 구아니딘-DTE 중에서의 봉입체 단백질의 변형 및 환원에 관해 개시한다. 이 단백질은 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 포함하나 이들에 한정되지 않는 산화환원 완충액 중에서 리폴딩될 수 있다. 리폴딩 시약은 유동하거나 다른 방식으로 이동하여 하나 이상의 폴리펩티드 또는 다른 발현 생성물과 접촉할 수 있고, 반대로 하나 이상의 폴리펩티드 또는 다른 발현 생성물이 유동하거나 다른 방식으로 이동하여 리폴딩 시약과 접촉할 수 있다.
- [0617] FGF-21 폴리펩티드를 원핵생물에서 제조하는 경우, 그렇게 제조된 FGF-21 폴리펩티드는 미스폴딩되어 생물학적 활성을 갖지 않거나 감소된 생물학적 활성을 가질 수 있다. 이 단백질의 생물학적 활성은 "리폴딩"에 의해 회복될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 하나 이상의 카오트로픽제(예를 들어, 요소 및/또는 구아니딘), 및 디설파이드 결합을 환원시킬 수 있는 환원제[예를 들어, 디티오프레이톨(DTT) 또는 2-머캅토에탄올(2-ME)]를 사용하여 폴리펩티드 쇄를 가용화하고(이때, FGF-21 폴리펩티드 또한 불용성임), 언폴딩하고, 환원시킴으로써 리폴딩한다. 그 후, 중간 정도의 무질서 상태에서, 디설파이드 결합을 재형성시키는 산화제(예를 들어, 산소, 시스틴 또는 시스타민)를 첨가한다. FGF-21 폴리펩티드는 당업계에 공지된 표준 방법, 예컨대 본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허 제4,511,502호, 제4,511,503호 및 제4,512,922호에 기재된 방법을 이용하여 리폴딩할 수 있다. 또한, FGF-21 폴리펩티드를 다른 단백질과 코폴딩하여 이중이량체 또는 이중다량체를 형성할 수 있다.
- [0618] 리폴딩 후, FGF-21를 추가로 정제할 수 있다. FGF-21의 정제는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등 또는 이들의 임의의 조합을 비롯한 당업자에게 공지된 다양한 기법을 이용하여 수행할 수 있다. 추가적인 정제는 또한 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 포함할 수 있다.
- [0619] 정제 후, FGF-21을 상이한 완충액으로 교환하고/하거나, 정용여과 및 투석을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업계에 공지된 다양한 임의의 방법으로 농축시킬 수 있다. 단일 정제 단백질로서 제공되는 FGF-21은 응집시키고

침전시킬 수 있다.

- [0620] 상기 정제된 FGF-21의 순도는 [역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 또는 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 측정시] 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 그 이상일 수 있다. FGF-21의 순도의 정확한 수치값과 관계없이, 상기 FGF-21의 순도는 약학 제품으로서 사용하거나 PEG와 같은 수용성 중합체와의 접합을 포함하나 이에 한정되지 않은 추가 공정에 사용하기에 충분하다.
- [0621] 특정 FGF-21 분자는 (부형제, 담체 및 안정화제, 혈청 알부민 등 외에) 다른 활성 성분 또는 단백질 없이도 치료제로서 사용될 수 있거나, 또는 상기 분자는 다른 단백질 또는 중합체와 착물을 형성할 수 있다.
- [0622] 일반적 정제 방법
- [0623] FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 세포 용해물, 추출물, 배양 배지, 봉입체, 숙주 세포의 주변세포질 공간, 숙주 세포의 세포질, 또는 다른 물질에 대해, 또는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC"), 역상-HPLC("RP-HPLC"), 유동상 흡착, 또는 이들의 임의의 조합 및/또는 임의의 적절한 순서로의 반복을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 단리 단계로부터 얻은 임의의 FGF-21 폴리펩티드 혼합물에 대해, 각종 단리 단계 중 어느 하나를 수행할 수 있다.
- [0624] 본 명세서에 기재된 기법을 수행하는 데 이용되는 장치 및 다른 필요한 재료는 상업적으로 이용이 가능하다. 펌프, 분획 수집기, 모니터, 기록기 및 전체 시스템은, 예를 들어 Applied Biosystems(미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재), Bio-Rad Laboratories, Inc.(미국 캘리포니아주 허큘리스 소재) 및 Amersham Biosciences, Inc.(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)로부터 입수가 가능하다. 교환 매트릭스 재료, 매질 및 완충액을 포함하나 이들에 한정되지 않는 크로마토그래피 재료 역시 이같은 회사로부터 입수할 수 있다.
- [0625] 세척 및 용리와 같은 본 명세서에 기재된 컬럼 크로마토그래피 공정에 있어서의 평형 및 기타 단계는, 펌프와 같은 특수화된 장치를 이용하여 보다 신속하게 수행할 수 있다. 상업적으로 이용이 가능한 펌프로는 HILOAD[®] 펌프 P-50, 연동 펌프 P-1, 펌프 P-901 및 펌프 P-903(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0626] 분획 수집기의 예로는 RediFrac 분획 수집기, FRAC-100 및 FRAC-200 분획 수집기 및 SUPERFRAC[®] 분획 수집기(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)를 들 수 있다. pH 및 선형 농도 구배를 형성하기 위한 혼합기 역시 입수가 가능하다. 상업적으로 입수가 가능한 혼합기로는 구배 혼합기(Gradient Mixer) GM-1 및 인라인 혼합기(In-Line Mixer)(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)를 들 수 있다.
- [0627] 크로마토그래피 공정은 임의의 시판되는 모니터를 이용하여 모니터링할 수 있다. 이러한 모니터는 UV, pH 및 전도율과 같은 정보를 수집하는 데 이용될 수 있다. 검출기의 예로는 모니터 UV-1, UVICORD[®] S II, 모니터 UV-M II, 모니터 UV-900, 모니터 UPC-900, 모니터 pH/C-900 및 전도율 모니터(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)를 들 수 있다. 실제로, Amersham Biosciences(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)로부터의 다양한 AKTA[®] 시스템을 포함하는 전체 시스템이 상업적으로 이용 가능하다.
- [0628] 본 발명의 일 실시형태에서, 예를 들어, 상기 FGF-21 폴리펩티드는, 먼저, 얻어진 정제된 FGF-21 폴리펩티드를 요소에서 변성시킨 후, 적절한 pH에서 환원제(예컨대, DTT)를 함유하는 TRIS 완충액으로 희석함으로써 환원시키고 변성시킬 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 약 2 M~약 9 M 농도 범위의 요소에서 변성시킨 후, pH 범위가 약 5.0~약 8.0인 TRIS 완충액에 희석하여 변성시킨다. 그 후, 이 실시형태의 리폴딩 혼합물을 항온처리할 수 있다. 일 실시형태에서, 리폴딩 혼합물을 실온에서 4~24시간 동안 항온처리한다. 그 후, 환원 및 변성된 FGF-21 폴리펩티드 혼합물을 추가로 단리 또는 정제할 수 있다.
- [0629] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 제1 FGF-21 폴리펩티드 혼합물을, 임의의 후속 단리 단계를 수행하기 전에 조정할 수 있다. 또한, 상기 제1 FGF-21 폴리펩티드 혼합물 또는 이것의 임의의 후속 혼합물을 당업계에 공지된 기법을 이용하여 농축시킬 수 있다. 또한, 상기 제1 FGF-21 폴리펩티드 혼합물 또는 이것의 임의의 후속 혼합물을 포함하는 용리 완충액을, 당업자에게 공지된 기법을 이용하여 후속 단리 단계에 적합한 완충액으로 교환할 수 있다.

[0630] 이온 교환 크로마토그래피

[0631] 일 실시형태에서 임의적인 추가 단계로서, 제1 FGF-21 폴리펩티드 혼합물에 대해 이온 교환 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 이에 대해서는, 일반적으로 문헌[ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (카탈로그 번호 18-1114-21, Amersham Biosciences (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재))]를 참조할 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 이온 교환 컬럼으로는 HITRAP[®], HIPREP[®] 및 HILOAD[®] 컬럼(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)을 들 수 있다. 이러한 컬럼은 강음이온 교환 물질, 예컨대 Q SEPHAROSE[®] Fast Flow, Q SEPHAROSE[®] High Performance 및 Q SEPHAROSE[®] XL; 강양이온 교환 물질, 예컨대 SP SEPHAROSE[®] High Performance, SP SEPHAROSE[®] Fast Flow 및 SP SEPHAROSE[®] XL; 약음이온 교환 물질, 예컨대 DEAE SEPHAROSE[®] Fast Flow; 및 약양이온 교환 물질, 예컨대 CM SEPHAROSE[®] Fast Flow(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)를 이용한다. 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드를 분리하기 위해 정제 과정의 임의의 단계에서 FGF-21 폴리펩티드에 대해 음이온 또는 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 임의의 적절한 양이온 교환 매트릭스를 사용하여 수행할 수 있다. 유용한 양이온 교환 매트릭스로는 섬유상, 다공성, 비다공성, 미세과립형, 비드형 또는 가교결합된 양이온 교환 매트릭스 재료를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 양이온 교환 매트릭스 재료는 셀룰로스, 아가로스, 텍스트란, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐, 폴리스티렌, 실리카, 폴리에테르, 또는 이들의 임의의 복합체를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0632] 양이온 교환 매트릭스는 강양이온 교환 물질 및 약양이온 교환 물질을 비롯한 임의의 적절한 양이온 교환 물질일 수 있다. 강양이온 교환 물질은 넓은 pH 범위에 걸쳐서 이온화 상태로 남을 수 있기 때문에, 넓은 pH 범위에 걸쳐 FGF-21에 결합할 수 있다. 그러나, 약양이온 교환 물질은 pH에 따라서 이온화 상태를 상실할 수 있다. 예를 들어, 약양이온 교환 물질은 pH가 약 pH 4 또는 pH 5로 떨어질 때 전하를 상실할 수 있다. 적절한 강양이온 교환 물질로는 설포프로필(SP), 메틸 설포네이트(S), 또는 설포에틸(SE)과 같은 하전된 작용기를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 상기 양이온 교환 매트릭스는, 바람직하게는 FGF-21 결합 pH 범위가 약 2.5~약 6.0인 강양이온 교환 물질일 수 있다. 대안으로, 상기 강양이온 교환 물질은, 바람직하게는 FGF-21 결합 pH 범위가 약 pH 2.5~약 pH 5.5일 수 있다. 상기 양이온 교환 매트릭스는 FGF-21 결합 pH가 약 3.0인 강양이온 교환 물질일 수 있다. 대안으로, 상기 양이온 교환 매트릭스는, 바람직하게는 FGF-21 결합 pH 범위가 약 6.0~약 8.0인 강양이온 교환 물질일 수 있다. 상기 양이온 교환 매트릭스는, 바람직하게는 FGF-21 결합 pH 범위가 약 8.0~약 12.5인 강양이온 교환 물질일 수 있다. 대안으로, 상기 강양이온 교환 물질은 FGF-21 결합 pH 범위가 약 pH 8.0~약 pH 12.0일 수 있다.

[0633] FGF-21을 로딩하기 전에, 상기 양이온 교환 매트릭스를, 예를 들어 몇배 컬럼 부피의 묽은 약산을 사용하여, 예를 들어, 4배 컬럼 부피의 20 mM 아세트산(pH 3)을 사용하여 평형화시킬 수 있다. 평형화 후, FGF-21을 첨가하고, 컬럼을 1 내지 수회 세척한 후, 역시 약 아세트산 또는 인산 용액 등의 약산 용액을 사용하여 실질적으로 정제된 FGF-21을 용리시킨다. 예를 들어, 약 2~4배 컬럼 부피의 20 mM 아세트산(pH 3)을 컬럼 세척에 사용할 수 있다. 또한, 예를 들어, 2~4배 컬럼 부피의 0.05 M 아세트산나트륨(pH 5.5) 또는 0.1 M 염화나트륨과 혼합된 0.05 M 아세트산나트륨(pH 5.5)을 사용한 추가적인 세척을 이용할 수 있다. 대안으로, 당업계에 공지된 방법을 이용하여, 상기 양이온 교환 매트릭스를 몇배 컬럼 부피의 묽은 염기를 사용하여 평형화시킬 수 있다.

[0634] 대안으로, 상기 양이온 교환 매트릭스를 충분히 낮은 pH 또는 이온 강도를 갖는 완충액과 접촉시켜 상기 매트릭스로부터 FGF-21을 용리시킴으로써 실질적으로 정제된 FGF-21을 용리시킬 수 있다. 용리 완충액의 pH는 약 pH 2.5~약 pH 6.0일 수 있다. 더 구체적으로, 상기 용리 완충액의 pH는 약 pH 2.5~약 pH 5.5, 약 pH 2.5~약 pH 5.0일 수 있다. 상기 용리 완충액은 pH 약 3.0일 수 있다. 또한, 상기 용리 완충액의 양은 크게 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 2배~약 10배 컬럼 부피일 수 있다.

[0635] 상기 FGF-21 폴리펩티드를 양이온 교환 매트릭스에 흡착시킨 후, 상기 매트릭스를 충분히 높은 pH 또는 이온 강도를 갖는 완충액과 접촉시켜 상기 매트릭스로부터 FGF-21을 용리시킴으로써 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드를 용리시킬 수 있다. 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드의 고 pH 용리에 사용하기 위한 적합한 완충액으로는 적어도 약 5 mM 내지 적어도 약 100 mM 농도 범위의 시트레이트, 포스페이트, 포르메이트, 아세테이트, HEPES 및 MES 완충액을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0636] 역상 크로마토그래피

- [0637] 당업자에게 알려진 적절한 프로토콜에 따라 단백질을 정제하기 위해 RP-HPLC를 수행할 수 있다[참고 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]. FGF-21 폴리펩티드에 대해 RP-HPLC를 수행함으로써, 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드를 분리할 수 있다. 이와 관련하여, 적어도 약 C₃ 내지 적어도 약 C₃₀, 적어도 약 C₃ 내지 적어도 약 C₂₀, 또는 적어도 약 C₃ 내지 적어도 약 C₁₈ 수지를 포함하나 이들에 한정되지 않는 매우 다양한 길이의 알킬 작용기를 갖는 실리카 유도체화 수지를 사용할 수 있다. 대안으로, 중합체 수지를 사용할 수 있다. 예를 들어, 스티렌 중합체 수지인 TosoHaas Amberchrome CG1000sd 수지를 사용할 수 있다. 매우 다양한 길이의 알킬쇄를 갖는 중합체 또는 시아노 수지를 사용할 수도 있다. 또한, 상기 RP-HPLC 컬럼은 에탄올과 같은 용매로 세척할 수 있다. Source RP 컬럼이 RP-HPLC 컬럼의 또 다른 예이다.
- [0638] 이온쌍 형성제 및 유기 변형제, 예컨대 메탄올, 이소프로판올, 테트라히드로푸란, 아세토니트릴 또는 에탄올을 함유하는 적절한 용리 완충액을 RP-HPLC 컬럼으로부터 FGF-21 폴리펩티드를 용리시키는 데 사용할 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 이온쌍 형성제로는 아세트산, 포름산, 과염소산, 인산, 트리플루오로아세트산, 헵타플루오로부티르산, 트리에틸아민, 테트라메틸암모늄, 테트라부틸암모늄 및 트리에틸암모늄 아세테이트를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 용리는 하나 이상의 구배 또는 등용매 조건을 이용하여 수행할 수 있으며, 분리 시간을 줄이고 피크 폭을 감소시키는 구배 조건이 바람직하다. 또 다른 방법은 상이한 용매 농도 범위를 갖는 2개의 구배를 이용하는 것을 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 용리 완충액의 예로는 암모늄 아세테이트 및 아세토니트릴 용액을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0639] 소수성 상호작용 크로마토그래피 정제 기법
- [0640] FGF-21 폴리펩티드에 대해 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 수행할 수 있다. 이에 대해서는, 일반적으로 문헌[HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (카탈로그 번호 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ))]을 참조할 수 있으며, 이것은 본 명세서에서 참고로 인용한다. 적절한 HIC 매트릭스로는 아가로스, 가교결합된 아가로스, 세파로스, 셀룰로스, 실리카, 텍스트란, 폴리스티렌, 폴리(메타크릴레이트) 매트릭스를 비롯한 알킬 또는 아릴 치환 매트릭스, 예컨대 부틸, 헥실, 옥틸 또는 페닐 치환 매트릭스 및 폴리에틸렌아민 수지 또는 부틸 또는 페닐 치환된 폴리(메타크릴레이트) 매트릭스를 비롯한 혼합 모드 수지를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피의 상업적으로 입수 가능한 공급원은 HITRAP[®], HIPREP[®] 및 HILO AD[®] 컬럼(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences 제품)을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0641] 요약하면, 로딩 전에, HIC 컬럼을 당업자에게 공지된 표준 완충액, 예컨대 아세트산/염화나트륨 용액 또는 암모늄 설페이트 함유 HEPES를 사용하여 평형화시킬 수 있다. 암모늄 설페이트는 HIC 컬럼을 로딩하기 위한 완충액으로서 사용될 수 있다. FGF-21 폴리펩티드를 로딩한 후, 컬럼을 표준 완충액 및 원치않은 물질은 제거되 FGF-21 폴리펩티드를 HIC 컬럼 상에 유지하는 조건을 이용하여 세척할 수 있다. 상기 FGF-21 폴리펩티드는 약 3배~약 10배 컬럼 부피의 표준 완충액, 예컨대, 특히, EDTA 및 평형화 완충액보다 낮은 농도의 암모늄 설페이트를 함유하는 HEPES, 또는 아세트산/염화나트륨 완충액을 사용하여 용리시킬 수 있다. 예를 들어, 인산칼륨 구배를 이용한 감소하는 선형 염 구배 또한 FGF-21 분자를 용리시키는 데 사용될 수 있다. 그 후, 용리액을, 예를 들어, 여과(예컨대, 정용여과 또는 한외여과)에 의해 농축시킬 수 있다. 정용여과는 FGF-21 폴리펩티드를 용리시키는 데 사용되는 염을 제거하는 데 이용될 수 있다.
- [0642] 다른 정제 기법
- [0643] 예를 들어, 겔 여과[GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (카탈로그 번호 18-1022-18, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Amersham Biosciences), 본 명세서에서 참고로 포함함], 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(적절한 매트릭스로는 HA-Ultrogel, High Resolution(Calbiochem), CHT 세라믹 하이드록시아파타이트(BioRad), Bio-Gel HTP 하이드록시아파타이트(BioRad)를 포함하나, 이들에 한정되지 않음), HPLC, 유동상 흡착, 한외여과, 정용여과, 동결건조 등을 이용한 또 다른 분리 단계를 제1 FGF-21 폴리펩티드 혼합물 또는 이것의 임의의 후속 혼합물에 대해 수행하여, 임의의 과잉 염을 제거하고, 완충액을, 최종 약물 제품의 후속 분리 단계 또는 제제화를 위한 적절한 완충액으로 교환할 수 있다.
- [0644] 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드를 비롯한 FGF-21 폴리펩티드의 수율은 당업자에게 공지된 기법을 이용하여 본 명세서에 기재된 각 단계에서 모니터링할 수 있다. 이러한 기법은 마지막 분리 단계 후에 실질적으로 정제된 FGF-21 폴리펩티드의 수율을 평가하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, FGF-21 폴리펩티드의 수율은 다양

한 알킬쇄 길이를 갖는 몇 개의 역상 고압 액체 크로마토그래피 컬럼, 예컨대 시아노 RP-HPLC, C₁₈RP-HPLC; 및 양이온 교환 HPLC 및 겔 투과 HPLC 중 임의의 것을 이용하여 모니터링할 수 있다.

[0645] 본 발명의 특정 실시형태에서, 각각의 정제 단계 후의 FGF-21의 수율은 각각의 정제 단계를 위한 출발 물질 중의 FGF-21의 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.9% 이상, 또는 약 99.99% 이상일 수 있다.

[0646] 순도는 SDS-PAGE와 같은 표준 기법을 이용하거나, 웨스턴 블롯 및 ELISA 분석을 이용하여 FGF-21 폴리펩티드를 측정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 음성 대조군 효모 발효 및 양이온 교환 회수로부터 분리된 단백질에 대해 다클론 항체를 생성할 수 있다. 이 항체는 또한 혼재된 숙주 세포 단백질의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0647] RP-HPLC 재료 Vydac C4(Vydac)는 실리카 겔 입자로 구성되며, 그 표면은 C₄-알킬쇄를 보유한다. 단백질성 불순물로부터 FGF-21 폴리펩티드를 분리하는 것은 소수성 상호작용의 강도에 있어서의 차이에 기초한다. 용리는 묽은 트리플루오로아세트산 중의 아세트니트릴 구배를 이용하여 수행한다. 분취용 HPLC는 스테인레스 스틸 컬럼 (2.8~3.2 L의 Vydac C4 실리카 겔이 충전됨)을 이용하여 수행한다. 상기 하이드록시아파타이트 Ultrogel 용리액은 트리플루오로아세트산을 첨가하여 산성화하여, Vydac C4 컬럼에 로딩한다. 세척 및 용리를 위해, 묽은 트리플루오로아세트산 중의 아세트니트릴 구배를 이용한다. 분획을 수집하고 즉시 인산염 완충액으로 중화한다. IPC 단계 내에 있는 FGF-21 폴리펩티드 분획을 풀링(pooling)한다.

[0648] DEAE 세파로스(Pharmacia) 재료는 세파로스 비드 표면에 공유 결합된 디에틸아미노에틸(DEAE) 기로 구성된다. FGF-21 폴리펩티드의 DEAE 기에 대한 결합은 이온성 상호작용에 의해 매개된다. 아세트니트릴 및 트리플루오로아세트산은 컬럼에 보유되지 않고 컬럼을 통과한다. 이들 물질을 세척한 후, 저 pH의 아세테이트 완충액으로 컬럼을 세척하여 미량의 불순물을 제거한다. 그 후, 컬럼을 중성 인산염 완충액으로 세척하고, FGF-21 폴리펩티드를 이온 농도가 높은 완충액으로 용리시킨다. 이 컬럼에 DEAE 세파로스 패스트 플로우를 패키징한다. 컬럼 부피는 FGF-21 폴리펩티드 로딩량이 겔 1 ml당 FGF-21 폴리펩티드 3~10 mg이 되도록 조정한다. 이 컬럼을 물 및 평형화 완충액(인산나트륨/인산칼륨)으로 세척한다. HPLC 용리액의 풀링된 분획을 로딩하고 컬럼을 평형화 완충액으로 세척한다. 그 후, 이 컬럼을 세척 완충액(아세트산나트륨 완충액)으로 세척한 후 평형화 완충액으로 세척한다. 그 후, FGF-21 폴리펩티드를 용리 완충액(염화나트륨, 인산나트륨/인산칼륨)을 사용하여 컬럼으로부터 용리시키고 마스터 용리 프로필에 따라 단일 분획으로 수집한다. DEAE 세파로스 컬럼의 용리액을 특정 전도율로 조정한다. 얻어진 약물을 멸균 여과하여 테플론 병에 넣어 -70℃에서 저장한다.

[0649] 이용될 수 있는 추가적인 방법은 내독소를 제거하기 위한 단계를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 내독소는 그램 음성 숙주 세포(예를 들어, 에세리키아 콜라이)의 외막에 위치하는 리포폴리사카라이드(LPS)이다. 내독소 수준을 감소시키는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 실리카 지지체, 유리 분말 또는 하이드록시아파타이트를 이용하는 정제 기법, 역상, 친화성, 크기 배제, 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이들 방법의 조합 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 관심있는 폴리펩티드로부터 동시 이동하는 단백질과 같은 오염물을 제거하기 위해 변형법 또는 추가적인 방법이 필요할 수 있다. 내독소 수준을 측정하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, LAL(Limulus Amebocyte Lysate) 분석을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. Endosafe™-PTS 분석은 소형 분광광도계와 함께 LAL 시약, 색원체 기질 및 대조군 표준 내독소가 사전 설치되어 있는 카트리지를 이용하는 색 측정 단일 튜브 시스템이다. 대안의 방법으로는 혼탁도를 측정하고 96웰 포맷을 이용하는 Kinetic LAL 방법을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0650] 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 단백질의 수율 및 순도를 평가하기 위해 다종 다양한 방법 및 절차가 이용될 수 있으며, 그 예로는 Bradford 분석, SDS-PAGE, 은 염색 SDS-PAGE, 쿠마시 염색 SDS-PAGE, 질량 분광분석법(MALDI-TOF를 포함하나 이에 한정되지 않음) 및 당업자에게 공지된 다른 단백질 특성 분석 방법을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0651] 추가적인 방법으로는 단백질 염색 방법과 결합된 SDS-PAGE, 면역블로팅, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분광분석법(MALDI-MS), 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법, 등전 포커싱, 분석용 음이온 교환, 크로마토 포커싱 및 원편광 이색성 분광 측정법을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0652] VIII. 대안적 시스템에서의 발현

- [0653] 비재조합 숙주 세포, 돌연변이된 숙주 세포, 또는 세포 비함유 시스템에서 비천연 아미노산을 단백질로 도입하기 위해 몇 가지 방법이 이용되고 있다. 이러한 시스템은 또한 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 제조에 사용하기에 적합하다. Lys, Cys 및 Tyr과 같은 반응성 측쇄로 아미노산을 유도체화하는 것은 라이신에서 N^2 -아세틸-라이신으로의 전환을 유도하였다. 화학적 합성 또한 비천연 아미노산의 도입을 위한 간편한 방법이 된다. 최근 펩티드 단편의 효소적 결합 및 네이티브 화학적 결합이 개발됨으로써, 더 큰 단백질을 제조하는 것이 가능하다[참고 문헌: P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000)]. 화학적 펩티드 결합 및 네이티브 화학적 결합에 대해서는 미국 특허 제6,184,344호, 미국 특허 출원 공개 제2004/0138412호, 미국 특허 출원 공개 제2003/0208046호, WO 02/098902 및 WO 03/042235에 기재되어 있으며, 이 문헌들은 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함한다. 원하는 비천연 아미노산에 의해 화학적으로 아실화된 서프래서 tRNA를, 단백질 생합성을 보조할 수 있는 시험관내 추출물에 첨가하는 일반적인 시험관내 생합성 방법은 실질적으로 임의의 크기의 다양한 단백질로 100개 이상의 비천연 아미노산을 부위 특이적으로 도입하는 데 이용되었다[참고 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. Dimala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989)]. 단백질 안정성, 단백질 폴딩, 효소 메커니즘 및 신호 전달의 연구를 위해 단백질에 매우 다양한 작용기가 도입되었다.
- [0654] 야생형 합성효소의 비특이성(promiscuity)을 활용하기 위해 선택적 압력 도입법이라 불리는 생체내 방법이 개발되었다[참고 문헌: N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999)]. 특정 천연 아미노산을 세포에 공급하는 당 분해 대사 경로를 차단한 영양 요구성 균주를, 표적 유전자의 전사가 억제되도록 하면서, 제한된 농도의 천연 아미노산을 함유하는 최소 배지에서 배양한다. 정제 성장기가 개시되면, 천연 아미노산은 고갈되고 비천연 아미노산 유사체로 대체된다. 재조합 단백질의 발현 유도는 비천연 유사체를 함유하는 단백질의 축적으로 이어진다. 예를 들어, 이러한 방법을 이용하여, o-플루오로페닐알라닌, m-플루오로페닐알라닌 및 p-플루오로페닐알라닌이 단백질로 도입되었고, 이들을 쉽게 확인할 수 있는 UV 스펙트럼에 2개의 특징적인 숄더(shoulder)를 나타내며[참고 문헌: C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000)]; ^{19}F NMR에 의한 키토올리고사카라이드 리간드와의 상호작용을 연구하기 위해 박테리오파지 T4 라이소자임에서 트리플루오로메티오닌이 메티오닌을 대체하는 데 이용되었으며[참고 문헌: H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997)]; 트리플루오로루신이 루신 대신에 도입되어 루신-지퍼 단백질의 열 안정성 및 화학적 안정성을 증가시켰다[참고 문헌: Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001)]. 또한, 셀레노메티오닌 및 텔루로메티오닌을 다양한 재조합 단백질로 도입하여 X 선 결정학적 분석에서 상의 해석을 용이하게 하였다[참고 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. Eckerskorn, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); 및 N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997)]. 알켄 또는 알킨 작용기를 갖는 메티오닌 유사체 또한 효율적으로 도입되어, 화학적 수단에 의해 단백질에 의한 추가적인 변형을 가능하게 하였다[참고 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 특허 출원 공개 제2002/0042097호, 이들 문헌은 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함함].
- [0655] 이 방법의 성공 여부는 아미노아실-tRNA 합성효소에 의한 비천연 아미노산 유사체의 인식에 달려 있으며, 이는 일반적으로, 단백질 번역의 충실도를 담보하기 위해 고선택성을 요한다. 이 방법의 범위를 확장시키는 방법 중 하나는 아미노아실-tRNA 합성효소의 기질 특이성을 완화시키는 것으로, 이는 제한된 수의 경우에 달성되었다. 예를 들어, 에스케리치아 콜라이 페닐알라닌-tRNA(PheRS)에서 Ala²⁹⁴를 Gly으로 치환하는 것은 기질 결합 포켓의 크기를 증가시키고 p-Cl-페닐알라닌(p-Cl-Phe)에 의한 tRNA^{Phe}의 아실화를 초래한다[참고 문헌: M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994)]. 이 돌연변이 PheRS를 보유하는 에스케리치아 콜라이 균주는 페닐알라닌 대신에 p-Cl-페닐알라닌 또는 p-Br-페닐알라닌의 도입을 가능하게 한다[참고 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)]. 유사하게, 에스케리치아 콜라이 타이로실-tRNA 합성효소의 아미노산 결합 부위 부근의 점 돌연변이 Phe130Ser은 아자타이로신이 타이로신보다 더 효율적으로 도입될 수 있게 하는 것으로 확인되었다 [참고 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)].

[0656]

생체내에서 비천연 아미노산을 단백질로 도입하기 위한 또 다른 전략법은 교정(proofreading) 메커니즘을 갖는 합성효소를 변형시키는 것이다. 이러한 합성효소는 동족 천연 아미노산과 구조적으로 유사한 아미노산을 구별하여 활성화시킬 수 없다. 이러한 오류는 별도의 부위에서 교정되며, 이는 단백질 번역의 충실도를 유지하도록, tRNA로부터 잘못 충전된 아미노산을 탈아실화한다. 합성효소의 교정 활성화에 장애가 발생할 경우, 잘못 활성화된 구조적 유사체가 편집 기능을 벗어나 도입될 수 있다. 이러한 접근법은 최근 발릴-tRNA 합성효소(ValRS)를 사용하여 입증된 바 있다[참고 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)]. ValRS는 tRNA Val을 Cys, Thr 또는 아미노부티레이트(Abu)로 잘못 아실화할 수 있으며; 그 후, 이들 비동족 아미노산은 편집 도메인에 의해 가수분해된다. 에스케리치아 콜라이 염색체의 무작위 돌연변이 유발 후, ValRS의 편집 부위에 돌연변이가 있는 돌연변이 에스케리치아 콜라이 균주를 선별하였다. 편집 결합 ValRS는 tRNAVal에 Cys를 충전한다. Abu는 Cys와 입체적 배치가 유사하기 때문에(Cys의 -SH 기가 Abu의 -CH₃로 치환됨), 이 돌연변이 에스케리치아 콜라이 균주가 Abu 존재하에 증식될 경우, 돌연변이 ValRS는 또한 Abu를 단백질로 도입한다. 질량 분광분석에 의하면, 발린의 약 24%가 본래 단백질의 각각의 발린 위치에서 Abu로 대체되는 것으로 확인된다.

[0657]

고체상 합성법 및 반합성법으로도 신규 아미노산을 포함하는 다수의 단백질을 합성할 수 있다. 예를 들어, 하기 간행물 및 여기에 인용된 참고 문헌을 참조할 수 있다: 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 S-peptide fragment, J. Am Chem, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, Ace 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).

[0658]

보조 인자, 스핀 표지 및 올리고뉴클레오티드를 비롯한 다양한 비천연 측쇄를 시험관내에서 단백질에 도입하는 데 화학적 변형법이 이용되어 왔다[참고 문헌: Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of 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 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)].

[0659]

대안으로, 화학적으로 변형된 아미노아실-tRNA를 이용하는 생합성 방법이 시험관내에서 합성된 단백질로 몇 종의 생물물리적 프로브를 도입하는 데 이용되었다. 하기 간행물 및 여기에 인용된 참고 문헌을 참조할 수 있다: 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).

[0660]

종래에, 화학적으로 아미노아실화된 서프레서 tRNA를 원하는 앰버 넌센스 돌연변이를 포함하는 유전자로 프로그

래밍된 단백질 합성 반응에 첨가함으로써, 시험관내에서 비천연 아미노산을 단백질에 부위 특이적으로 도입할 수 있음이 확인되었다. 이러한 접근법을 이용하면, 특정 아미노산에 영양 요구성인 균주를 사용하여, 다수의 일반 아미노산 20종을 구조적으로 가까운 동족체로 치환할 수 있는데, 예를 들어 페닐알라닌을 플루오로페닐알라닌으로 치환할 수 있다[참고 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., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995)].

[0661] 예를 들어, 정지 코돈 UAG를 인식하고 비천연 아미노산에 의해 화학적으로 아미노아실화된 서프레스 tRNA를 제조하였다. 단백질 유전자의 관심있는 부위에 정지 코돈 UAG을 도입하기 위해 통상적인 부위 지정 돌연변이 유발을 이용하였다[참고 문헌: Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Res*, 16(3):791-802 (1988)]. 아실화된 서프레스 tRNA 및 돌연변이 유전자가 시험관내 전사/번역 시스템에서 조합될 경우, 비천연 아미노산은 UAG 코돈에 반응하여 도입되어, 특정 위치에 아미노산을 포함하는 단백질을 생성하였다. [³H]-Phe를 사용한 실험과 α-하이드록시산을 사용한 실험을 통해, 원하는 아미노산만이 UAG 코돈에 의해 지정된 위치에 도입되며, 이 아미노산은 단백질 내의 임의의 다른 위치에는 도입되지 않는다는 것이 입증되었다[참고 문헌: Noren, et al., supra; 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)].

[0662] 화학적 또는 효소적 아미노아실화를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 방법 또는 기법을 이용하여 tRNA를 원하는 아미노산으로 아미노아실화할 수 있다.

[0663] 아미노아실화는 아미노아실 tRNA 합성효소 또는 다른 효소 분자(리보자임을 포함하나 이에 한정되지 않음)를 사용하여 수행할 수 있다. "리보자임"이란 용어는 "촉매 RNA"와 상호 교환하여 사용될 수 있다. 문헌[Cech et al., 1987, *Science*, 236:1532-1539]; 문헌[McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226]은 촉매로서 작용할 수 있는 자연 발생 RNA(리보자임)의 존재를 입증하였다. 그러나, 이러한 천연 RNA 촉매는 절단 및 스플라이싱을 위해 단지 리보핵산 기질에 작용하는 것으로 나타났음에도 불구하고, 리보자임의 인위적 진화에 대한 최근의 발전은 촉매 작용 레퍼토리를 다양한 화학 반응으로 확장시켰다. 연구에 의해, 자신의 (2')3' 말단에 있는 아미노아실-RNA 결합을 촉진할 수 있는 RNA 분자[Illangakekare et al., 1995 *Science* 267:643-647], 한 RNA 분자로부터 다른 분자로 아미노산을 전달할 수 있는 RNA 분자가 확인되었다[Lohse et al., 1996, *Nature* 381:442-444].

[0664] 본 명세서에서 참고로 인용되는 미국 특허출원 공개 제2003/0228593호는, 리보자임을 구성하는 방법과, 천연적으로 코딩되는 아미노산과 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 tRNA를 아미노아실화하는 데 있어서의 그 용도에 관해 기재한다. 리보자임을 포함하나 이에 한정되지 않는, tRNA를 아미노아실화할 수 있는 효소 분자의 기질 비고정화 형태는 아미노아실화된 생성물의 효율적인 진화성 정제를 가능하게 할 수 있다. 적절한 기질의 예로는 아가로스, 세파로스 및 자성 비드를 들 수 있다. 아미노아실화를 위한 리보자임의 기질 비고정화 형태의 제조 및 사용에 대해서는 문헌[*Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084] 및 미국 특허출원 공개 제2003/0228593호에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에서 참고로 포함한다.

[0665] 아미노아실화에서 합성효소의 사용을 피한 화학적 아미노아실화 방법은 Hecht 및 그 동료에 의해 도입된 것[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 등에 의해 도입된 것[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; Hoshida, T. et al., J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34]을 포함하나 이들에 한정되지 않으며, 상기 문헌들은 본 명세서에서 참고로 포함된다. 이러한 방법들 및 다른 화학적 아미노아실화 방법을 tRNA 분자를 아미노아실화하는 데 이용할 수 있다.

[0666] 촉매 RNA를 생성하는 방법은 무작위화된 리보자임 서열의 별개의 풀을 생성하는 단계, 상기 풀에 대해 방향성 진화를 수행하는 단계, 바람직한 아미노아실화 활성에 대해 상기 풀을 스크리닝하는 단계 및 원하는 아미노아실화 활성을 나타내는 리보자임의 서열을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0667] 리보자임은 아실화 활성을 촉진하는 모티프 및/또는 영역, 예컨대 GGU 모티프 및 U 풍부 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, U 풍부 영역은 아미노산 기질의 인식을 촉진할 수 있고 GGU 모티프는 tRNA의 3' 말단과 염기 쌍을 형성할 수 있는 것으로 보고되었다. 상기 GGU 모티프와 U 풍부 영역은 공동으로 아미노산과 tRNA의 동시 인식을 동시에 촉진함으로써, tRNA의 3' 말단의 아미노아실화를 촉진한다.

[0668] 리보자임은, tRNA^{Asn}_{cccg}와 접합된 부분적으로 무작위화된 r24mini를 사용한 시험관내 선별, 이에 이은 활성 클론에서 발견되는 공통 서열의 체계적인 조작에 의해 생성할 수 있다. 이 방법으로 얻은 대표적인 리보자임이 "Fx3 리보자임"이라 불리며, 본 명세서에서 참고로 인용하는 미국 출원 공개 제2003/0228593호에, 동족 비천연 아미노산이 충전된 다양한 아미노아실-tRNA의 합성을 위한 다목적 촉매로서 작용한다고 기재되어 있다.

[0669] 기재 상으로의 고정화를 이용하여, 아미노아실화 tRNA의 효율적인 친화성 정제를 수행할 수 있다. 적절한 기재의 예로는 아가로스, 세파로스 및 자성 비드를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 리보자임은 RNA의 화학적 구조를 이용하여 수지 상에 고정화시킬 수 있는데, 예컨대 RNA의 리보스 상의 3'-시스-디올을 과요오드산염으로 산화시켜 상응하는 디알데히드를 생성함으로써, 수지 상의 RNA의 고정화를 촉진할 수 있다. 환원적 아민화가 비가역적 결합으로 수지와 리보자임 사이에 상호작용을 형성하는 저가의 하이드라지드 수지를 비롯하여 다양한 종류의 수지가 사용될 수 있다. 아미노아실-tRNA의 합성은 이러한 온컬럼 아미노아실화 기법에 의해 현저히 촉진될 수 있다. 문헌[Kourouklis et al., Methods 2005; 36:239-4]은 컬럼에 기초한 아미노아실화 시스템에 관해 기재한다.

[0670] 아미노아실화 tRNA의 단리는 다양한 방법으로 수행할 수 있다. 적절한 방법 중 하나는 10 mM EDTA를 함유하는 아세트산나트륨 용액, 50 mM N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(3-프로판설폰산), 12.5 mM KCl(pH 7.0), 10 mM EDTA를 함유하는 완충액 또는 단순히 EDTA로 완충시킨 물(pH 7.0) 등의 완충액을 사용하여 컬럼으로부터 아미노아실화 tRNA를 용리시키는 것이다.

[0671] 상기 아미노아실화 tRNA를 번역 반응에 첨가하여, 번역 반응에 의해 제조된 폴리펩티드의 선택된 위치에, tRNA를 아미노아실화하는 아미노산을 도입할 수 있다. 본 발명의 아미노아실화 tRNA가 사용될 수 있는 번역 시스템의 예로는 세포 용해물을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 세포 용해물은 투입 mRNA로부터의 폴리펩티드의 시험관내 번역에 필요한 반응 성분들을 제공한다. 이러한 반응 성분들의 예로는 리보솜 단백질, rRNA, 아미노산, tRNA, GTP, ATP, 번역 개시 및 연장 인자 및 번역에 관련된 추가의 인자들을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 번역 시스템은 배치 번역 또는 구획된 번역일 수 있다. 배치 번역 시스템은 반응 성분들을 단일 구획에서 통합하는 한편, 구획 번역 시스템은 번역 반응 성분들을 번역 효율을 억제할 수 있는 반응 생성물로부터 격리시킨다. 이러한 번역 시스템은 상업적으로 입수가 가능하다.

[0672] 또한, 커플링된 전사/번역 시스템이 이용될 수 있다. 커플링된 전사/번역 시스템에 의하면, 투입 DNA가 상응하는 mRNA로 전사되고, 이 mRNA는 반응 성분들에 의해 번역될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 커플링된 전사/번역의 일례로 Rapid Translation System(RTS, Roche Inc.)이 있다. 이 시스템은 리보솜 및 번역 인자와 같은 번역 성분을 제공하는 이. 콜라이 용해물 함유 혼합물을 포함한다. 또한, 번역에 사용하기 위한 mRNA 주형으로 투입 DNA를 전사시키기 위한 RNA 폴리머라제가 포함된다. RTS는 공급/폐기 구획 및 전사/번역 구획을 비롯한 반응 구획들 간에 배치된 막에 의한 반응 성분들의 구획화를 이용할 수 있다.

[0673] tRNA의 아미노아실화는 트랜스퍼라제, 폴리머라제, 촉매 항체, 다기능성 단백질 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다른 제제를 사용하여 수행할 수 있다.

[0674] 문헌[Stephan in Scientist 2005 Oct 10]의 30~33면은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 단백질로 도입하는 추

가적인 방법을 개시한다. 문헌[Lu et al., in Mol Cell. 2001 Oct;8(4):759-69]은 비천연 아미노산을 포함하는 합성 펩티드에 단백질을 화학적으로 결합시키는(발현 단백질 결합) 방법에 관해 기재한다.

[0675] 비천연 아미노산을 단백질로 도입하기 위해 미세주입 기법도 이용되고 있다[참고 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)]. 제노푸스 난모세포에 시험관내에서 제조된 2종의 RNA, 즉, 관심있는 위치에서 UAG 정지 코돈을 갖는 표적 단백질을 코딩하는 mRNA 및 원하는 비천연 아미노산에 의해 아미노아실화된 앰버 서프레스 tRNA를 동시에 주입한다. 그 후, 난모세포의 번역 기구는 UAG에 의해 지정된 위치에 비천연 아미노산을 삽입한다. 이 방법에 의해, 시험관내 발현 시스템에 일반적으로 이용될 수 없는 내재성 막 단백질의 생체내 구조-기능 연구가 가능하였다. 예로는 형광 공명 에너지 전달에 의해 거리를 측정하기 위해 타키닌 뉴로킨-2 수용체로 형광 아미노산을 도입하는 것[참고 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)]; 이온 채널에서 표면에 노출된 잔기를 확인하기 위해 바이오틴화된 아미노산을 도입하는 것[참고 문헌: J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997)]; 실시간으로 이온 채널의 입체구조 변화를 모니터링하기 위해 케이지된 타이로신 유사체를 사용하는 것[참고 문헌: J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998)]; 및 게이팅 메커니즘을 조사하기 위해서 이온 채널 골격을 변화시키기 위해 알파 하이드록시 아미노산을 사용하는 것[참고 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 들 수 있다.

[0676] 생체내에서 비천연 아미노산을 단백질로 직접 도입하는 능력은 돌연변이 단백질의 고수율, 기술상의 용이성, 세포 또는 경우에 따라 살아있는 유기체에서의 돌연변이 단백질의 연구 가능성 및 치료적 처치 및 진단 용도에 있어서의 이들 돌연변이 단백질의 사용을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다종 다양한 이점을 제공한다. 다양한 크기, 산도, 친핵성, 소수성 및 다른 특성을 갖는 비천연 아미노산을 단백질에 포함시키는 능력은, 단백질 기능을 조사하고 새로운 특성을 갖는 새로운 단백질 또는 유기체를 생성하기 위해, 단백질의 구조를 합리적이고 체계적으로 조작할 수 있는 능력을 크게 확장시킬 수 있다.

[0677] 파라-F-Phe를 부위 특이적으로 도입하기 위한 한 시도에 있어서, p-F-Phe 내성 Phe 영양 요구성 에스케리치아 콜라이 균주에서 효모 앰버 서프레스 tRNA^{Phe}CUA/페닐알라닌-tRNA 합성효소 쌍을 이용하였다[참고 문헌: R. Furter, Protein Sci., 7:419 (1998)].

[0678] 세포 비함유(시험관내) 번역 시스템을 이용하여 본 발명의 FGF-21 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것도 가능할 수 있다. 번역 시스템은 세포 번역 시스템 또는 세포 비함유 번역 시스템일 수 있으며, 원핵 또는 진핵 시스템일 수 있다. 세포 번역 시스템으로는, 원하는 핵산 서열이 mRNA로 전사되고 mRNA가 번역될 수 있는 투과성으로 만든 세포 또는 세포 배양물과 같은 전체 세포 조제물을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 세포 비함유 번역 시스템은 상업적으로 이용이 가능하며, 수많은 다양한 유형 및 시스템이 잘 알려져 있다. 세포 비함유 시스템의 예로는 진핵 세포 용해물, 예컨대 에스케리치아 콜라이 용해물 및 원핵 세포 용해물, 예컨대 맥아 추출물, 곤충 세포 용해물, 토끼 망상적혈구 용해물, 토끼 난모세포 용해물 및 인간 세포 용해물을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 진핵 세포 추출물 또는 용해물은, 생성된 단백질이 글리코실화되거나 인산화되거나 다른 방식으로 변형될 경우 바람직할 수 있는데, 왜냐하면 이러한 변형 중 다수가 진핵 세포 시스템에서만 가능하기 때문이다. 이러한 추출물 및 용해물 중 일부는 상업적으로 입수가 가능하다[미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Promega; 미국 캘리포니아주 라 호야 소재의 Stratagene; 미국 일리노이주 알링턴 하이츠 소재의 Amersham; 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 GIBCO/BRL]. 분비 단백질의 번역에 유용한 마이크로솜 막을 포함하는 게 체장 추출물과 같은 막 추출물 역시 입수가 가능하다. (시험관내 번역에서) 주형으로서 mRNA를 포함하거나 (통합 시험관내 전사 및 번역) 주형으로서 DNA를 포함할 수 있는 이러한 시스템에서, 상기 시험관내 합성은 리보솜에 의해 지시된다. 세포 비함유 단백질 발현 시스템의 개발에 많은 노력이 기울여졌다[참고 문헌: Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74:309-316 (2001); Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M. and J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); 및 Patnaik, R. and J.R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); 미국 특허 제6,337,191호; 미국 특허 출원 공개 제2002/0081660호; WO 00/55353; WO 90/05785, 이들은 본 명세서에서 참고로 포함함]. 비천연적으로 코딩

된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 발현에 적용될 수 있는 또 다른 접근법으로는 mRNA-펩티드 융합 기법을 들 수 있다[참고 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)]. 이러한 접근법에서, 퓨로마이신에 연결된 mRNA 주형이 리보솜 상에서 펩티드로 번역된다. 하나 이상의 tRNA 분자가 변형되면, 비천연 아미노산 역시 펩티드로 혼입될 수 있다. 마지막 mRNA 코돈이 관독된 후, 퓨로마이신은 펩티드의 C 말단을 포획한다. 형성된 mRNA-펩티드 접합체가 시험관내 분석에서 관심있는 특성을 갖고 있는 것으로 확인될 경우, 그 mRNA 서열로부터 그 실체를 쉽게 확인할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 특성을 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 보다 최근에는, 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된 펩티드의 합성을 가능하게 하는 정제된 성분을 사용한 시험관내 리보솜 번역이 보고되었다[참고 문헌: A. Forster et al., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003)].

[0679] 재구성된 번역 시스템을 사용할 수도 있다. 정제된 번역 인자의 혼합물뿐만 아니라, 개시 인자-1(IF-1), IF-2, IF-3 (α 또는 β), 연장 인자 T(EF-Tu), 또는 종결 인자와 같은 정제된 번역 인자가 보충된 용해물 또는 용해물들의 조합도 역시 mRNA를 단백질로 번역하는 데 성공적으로 사용되었다. 세포 비함유 시스템은 또한 커플링된 전사/번역 시스템일 수 있으며, 이때 DNA는 시스템으로 도입되어 mRNA로 전사되고, 그 mRNA는 본 명세서에서 구체적으로 참고 문헌으로 포함하는 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., editors, Wiley Interscience, 1993)]에 기재된 바와 같이 번역된다. 진핵 세포 전사 시스템에서 전사된 RNA는 이중핵 RNA(hnRNA) 또는 5' 말단 캡(7-메틸 구아노신) 및 3' 말단 폴리 A 테일 성숙 mRNA의 형태일 수 있으며, 이것은 특정 번역 시스템에서 유익할 수 있다. 예를 들어, 캡핑된 mRNA는 망상적형구 용해물 시스템에서 고효율로 번역된다.

[0680] IX. FGF-21 폴리펩티드에 커플링된 거대분자 중합체

[0681] 본 명세서에 기재된 비천연 아미노산 폴리펩티드에 대한 다양한 변형은 본 명세서에 기재된 조성물, 방법, 기법 및 전략법을 이용하여 수행할 수 있다. 이러한 변형은 표지; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광가교결합체; 방사성핵종; 세포 독성 화합물; 약물; 친화성 표지; 광친화성 표지; 반응성 화합물; 수지; 제2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이트제; 보조 인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 덴드리머; 시클로텍스트린; 억제성 리보핵산; 생물학적 물질; 나노입자; 스핀 표지; 형광단; 금속 함유 부분; 방사성 부분; 신규 작용기; 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기; 광케이지된 부분; 화학선에 의해 여기 가능한 부분; 광이성질체화 가능한 부분; 바이오틴; 바이오틴 유사체; 중원자를 도입하는 부분; 화학적으로 절단 가능한 기; 광절단 가능한 기; 연장된 측쇄; 탄소 결합된 당; 산화환원 활성 물질; 아미노 티오산; 독성 부분; 동위원소 표지 부분; 생물물리적 프로브; 인광성 기; 화학발광성 기; 전자 밀집 기; 자성 기; 인터칼레이팅 기; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적 활성 물질; 검출 가능한 표지; 소분자; 양자점; 나노트랜스미터; 방사성 뉴클레오티드; 래디오트랜스미터; 중성자 포획제; 또는 상기의, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 추가 작용기를 폴리펩티드의 비천연 아미노산 성분에 도입하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물, 방법, 기법 및 전략법의 예시적인 비한정적인 예로서, 하기 설명은, 여기에 기재된 조성물, 방법, 기법 및 전략법이 또한 전술한 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 작용기를 부가하기 위해 적용될 수 있다는 전제하에(필요에 따라, 당업자가 본 명세서의 개시내용으로 실시할 수 있는, 적절한 변형이 가해짐), 비천연 아미노산 폴리펩티드에 거대분자 중합체를 부가하는 것에 초점을 맞출 것이다.

[0682] 다종 다양한 거대분자 중합체 및 기타 분자를 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 연결하여, FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 특성을 조절하고/하거나 FGF-21 분자에 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이러한 거대분자 중합체는 천연적으로 코딩된 아미노산, 비천연적으로 코딩된 아미노산, 또는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 기능성 치환기, 또는 천연 또는 비천연 아미노산에 부가된 임의의 치환기 또는 작용기를 통해 FGF-21 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da~약 100,000 Da 또는 그 이상의 범위를 포함하는 다양한 범위일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 중합체의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da를 포함하나 이들에 한정되지 않는 약 100 Da~약 100,000 Da일 수

있다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da~약 50,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 1,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 5,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 10,000 Da~약 40,000 Da이다.

[0683] 본 발명은 실질적으로 균질한 중합체:단백질 접합체 제제를 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 균질한"이란 중합체:단백질 접합체가 전체 단백질의 절반보다 더 많은 것으로 관찰된다는 것을 의미한다. 상기 중합체:단백질 접합체는 생물학적 활성을 가지며, 본 발명에서 제공되는 "실질적으로 균질한" PEG화 FGF-21 폴리펩티드 제제는 균질한 제제의 이점, 예를 들어, 로트 대 로트 약력학의 예측성에 있어서의 임상적 적용의 용이성을 나타내기에 충분히 균질한 것이다.

[0684] 또한, 중합체:단백질 접합체 분자의 혼합물의 제조를 선택할 수 있고, 본 발명에서 제공되는 이점은 혼합물 중에 포함시키기 위한 단독중합체:단백질 접합체의 비율을 선택할 수 있다는 것이다. 따라서, 필요에 따라, 다양한 단백질과 다양한 수의 부착된 중합체 부분(즉, 디-, 트리-, 테트라- 등)과의 혼합물을 제조하고, 상기 접합체를 본 발명의 방법을 이용하여 제조한 단독중합체:단백질 접합체와 조합하고, 특정 비율의 단독중합체:단백질 접합체를 갖는 혼합물을 얻을 수 있다.

[0685] 선택된 중합체는, 이것이 부착된 단백질이 수성 환경(예컨대 생리학적 환경)에서 침전되지 않도록 수용성일 수 있다. 상기 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 최종 생성물 제제의 치료 용도를 위해서는, 상기 중합체는 약학적으로 허용 가능한 것이다.

[0686] 중합체의 예로는 폴리알킬 에테르 및 이의 알콕시 캡핑된 유사체(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌/프로필렌 글리콜, 및 이의 메톡시 또는 에톡시 캡핑된 유사체, 특히 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG로도 알려진 폴리옥시에틸렌 글리콜); 폴리비닐피롤리돈; 폴리비닐알킬 에테르; 폴리옥사졸린, 폴리알킬 옥사졸린 및 폴리하이드록시알킬 옥사졸린; 폴리아크릴아미드, 폴리알킬 아크릴아미드, 및 폴리하이드록시알킬 아크릴아미드(예를 들어, 폴리하이드록시프로필메타크릴아미드 및 이의 유도체); 폴리하이드록시알킬 아크릴레이트; 폴리시알산 및 이의 유사체; 친수성 펩티드 서열; 폴리스카라이드 및 이의 유도체(텍스트란 및 텍스트란 유도체, 예를 들어 카복시메틸텍스트란, 텍스트란 셀페이트, 아미노텍스트란을 포함함); 셀룰로스 및 이의 유도체, 예를 들어, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시알킬 셀룰로스; 키틴 및 이의 유도체, 예를 들어, 키토산, 숙시닐 키토산, 카복시메틸키틴, 카복시메틸키토산; 히알루론산 및 이의 유도체; 전분; 알기네이트; 콘드로이틴 셀페이트; 알부민; 폴루란 및 카복시메틸 폴루란; 폴리아미노산 및 이의 유도체, 예를 들어 폴리글루탐산, 폴리라이신, 폴리아스파르트산, 폴리아스파르트아미드; 말레산 무수물 공중합체, 예컨대 스티렌 말레산 무수물 공중합체, 디비닐에틸 에테르 말레산 무수물 공중합체; 폴리비닐 알코올; 이의 공중합체; 이의 삼원 공중합체; 이의 혼합물; 및 이들의 유도체를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0687] 단백질 분자에 대한 폴리에틸렌 글리콜 분자의 비율은 반응 혼합물 중 그 농도에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, (최소한의 과잉 미반응 단백질 또는 중합체가 존재한다는 점에서 반응 효율에 비추어) 최적 비는 선택된 폴리에틸렌 글리콜의 분자량 및 이용 가능한 반응기의 수에 의해 결정될 수 있다. 분자량의 경우, 일반적으로 중합체의 분자량이 클수록, 단백질에 부착될 수 있는 중합체 분자의 수가 적다. 유사하게, 이들 파라미터를 최적화할 때 중합체의 분지화를 고려해야 한다. 일반적으로, 분자량이 클수록 (또는 분지가 많을수록) 중합체:단백질 비가 크다.

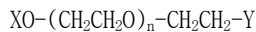
[0688] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, PEG:FGF-21 폴리펩티드 접합체를 고려할 경우, "치료적 유효량"이란 표현은 환자에게 원하는 이익을 제공하는 양을 말한다. 이 양은 개체마다 다르고, 환자의 전체적인 신체 조건 및 치료하고자 하는 병증의 기본 원인을 비롯한 다수의 요인에 따라 달라진다. 치료에 사용되는 FGF-21 폴리펩티드의 양은 허용 가능한 변화율을 제공하고 원하는 반응을 유익한 수준으로 유지한다. 본 발명 조성물의 치료적 유효량은 공개적으로 입수가 가능한 자료 및 절차를 이용하여 당업자가 용이하게 확인할 수 있다.

[0689] 상기 수용성 중합체는 선형, 갈래형(forked) 또는 분지형을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 구조 형태일 수 있다. 일반적으로, 상기 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)이나, 다른 수용성 중합체도 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG가 본 발명의 특정 실시형태를 설명하기 위해 사용된다.

[0690] PEG는 상업적으로 입수할 수 있거나 당업자에게 공지된 방법에 따라 에틸렌 글리콜의 개환 중합에 의해 제조할 수 있는 잘 알려진 수용성 중합체이다[Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, 138-161면]. "PEG"란 용어는 PEG의 크기 또는 말단 변형에 관계없이 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함

하는 것으로 넓은 의미로 사용되며, 하기 식에 의해 FGF-21 폴리펩티드에 연결된 것으로 나타낼 수 있다:

[0691]



[0692]

(상기 식에서, n은 2~10,000이고, X는 H, 또는 C₁₋₄ 알킬, 보호기, 또는 말단 작용기를 포함하나 이들에 한정되지 않는 말단 변형기임).

[0693]

일부 경우, 본 발명에서 사용되는 PEG는 한쪽 말단에 하이드록시 또는 메톡시(즉, X는 H 또는 CH₃임)("메톡시 PEG")를 갖도록 종결된다. 대안으로, PEG는 반응기를 갖도록 종결되어 이작용성 중합체를 형성할 수 있다. 전형적인 반응기는 20종의 일반 아미노산에 존재하는 작용기와 반응하는 데 통상적으로 사용되는 반응기[말레이미드기, 활성화된 카보네이트(p-니트로페닐 에스테르를 포함하나 이에 한정되지 않음), 활성화된 에스테르(N-하이드록시숙신이미드, p-니트로페닐 에스테르 및 알데히드를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)를 포함하나 이들에 한정되지 않음]뿐만 아니라, 20종의 일반 아미노산에 대해 비활성이지만 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 상보적 작용기(아지드기 및 알킨기를 포함하나 이에 한정되지 않음)와 특이적으로 반응하는 작용기를 포함할 수 있다. 상기 화학식에서 Y로 표시되는 PEG의 다른 쪽 말단이 비천연 아미노산 또는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 FGF-21 폴리펩티드에 직접 또는 간접적으로 부착된다는 것을 인식해야 한다. 예를 들어, Y는 폴리펩티드의 아민기(라이신의 엡실론 아민 또는 N 말단을 포함하나 이에 한정되지 않음)에 대한 아마이드, 카바메이트 또는 요소 결합일 수 있다. 대안으로, Y는 티올기(시스테인의 티올기를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 대한 말레이미드 결합일 수 있다. 대안으로, Y는 20종의 일반 아미노산을 통해서는 일반적으로 얻을 수 없는 잔기에 대한 결합일 수 있다. 예를 들어, PEG 상의 아지드기는 FGF-21 폴리펩티드 상의 알킨기와 반응하여, Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응 생성물을 형성할 수 있다. 대안으로, PEG 상의 알킨기가 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 아지드기와 반응하여 유사한 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 강한 친핵체(하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민, 세마카바지드를 포함하나 이들에 한정되지 않음)를 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 알데히드 또는 케톤 기와 반응시켜 경우에 따라 하이드라존, 옥심 또는 세미카바존을 형성할 수 있으며, 이것은 일부 경우 적절한 환원제를 사용한 처리로 추가로 환원시킬 수 있다. 대안으로, 강한 친핵체를 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 FGF-21 폴리펩티드로 도입하여, 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데히드 기와 우선적으로 반응시키는 데 사용할 수 있다.

[0694]

약 100 달톤(Da)~100,000 Da 또는 그 이상(때때로 0.1~50 kDa 또는 10~40 kDa을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 포함하나 이에 한정되지 않는 PEG의 임의의 분자량이 실제 필요에 따라 사용될 수 있다. PEG의 분자량은 약 100 Da~약 100,000 Da 또는 그 이상을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 범위일 수 있다. PEG는 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da을 포함하나 이들에 한정되지 않는 약 100 Da~약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 100 Da~약 50,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 100 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 1,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 5,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 10,000 Da~약 40,000 Da이다. 각각의 분자량이 1~100 kDa(1~50 kDa 또는 5~20 kDa을 포함하나 이들에 한정되지 않음)인 PEG 분자를 포함하나 이에 한정되지 않는 분지쇄 PEG 또한 사용될 수 있다. 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 약 1,000 Da~약 100,000 Da 또는 그 이상을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da 및 1,000 Da을 포함하나 이들에 한정되지 않는 약 1,000 Da~약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 약 1,000 Da~약 50,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 약 1,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 약 5,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 쇄의 분자량은 약 5,000 Da~약 20,000 Da이다. 다양한 PEG 분자가 본 명세서에서 참고로 포함하는 Shearwater Polymers, Inc. 카탈로그, Nektar Therapeutics 카탈로그에 기재되어 있으나 이들에 한정되지 않는다.

[0695]

일반적으로, 상기 PEG 분자의 하나 이상의 말단은 비천연적으로 코딩된 아미노산과의 반응에 이용될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 측쇄와의 반응을 위한 알킨 및 아지드 부분을 보유하는 PEG 유도체를 사용하여, PEG를 본

명세서에 기재된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착시킬 수 있다. 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 아지드를 포함할 경우, PEG는 일반적으로 [3+2] 고리화첨가 반응 생성물을 형성할 수 있도록 알킨 부분을 포함하거나 아미드 결합을 형성할 수 있도록 포스포기를 포함하는 활성화된 PEG 종(즉, 에스테르, 카보네이트)을 포함한다. 대안으로, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 알킨을 포함할 경우, PEG는 일반적으로 [3+2] Huisgen 고리화첨가 반응 생성물을 형성할 수 있도록 아지드 부분을 포함한다. 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카보닐기를 포함할 경우, PEG는 일반적으로 각각 상응하는 하이드라존, 옥심 및 세미카바존 결합을 형성할 수 있도록 강한 친핵체(하이드라지드, 하이드라진, 하이드록실아민, 또는 세미카바지드 작용기를 포함하나 이들에 한정되지 않음)를 포함한다. 대안으로, 전술한 반응기 방향의 역방향이 이용될 수 있으며, 즉, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 아지드 부분을 알킨을 포함하는 PEG 유도체와 반응시킬 수 있다.

[0696] 일부 실시형태에서, PEG 유도체를 갖는 FGF-21 폴리펩티드 변이체는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 화학적 작용기에 반응성인 화학적 작용기를 포함한다.

[0697] 본 발명은 일부 실시형태에서 평균 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격을 포함하는 아지드 및 아세틸렌 함유 중합체 유도체를 제공한다. 상기 수용성 중합체의 중합체 골격은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 폴리(텍스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)를 비롯한 폴리(에틸렌)글리콜 및 다른 관련 중합체를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다중 다양한 수용성 중합체도 본 발명의 실시예 사용하기에 적합하며, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)이란 명칭의 사용은 그러한 분자를 모두 포함하고 포괄하는 것임이 이해되어야 한다. PEG란 용어는 이작용성 PEG, 멀티아암형 PEG, 유도체화 PEG, 갈래형 PEG, 분지형 PEG, 현수형(pendent) PEG(즉, 중합체 골격에 현수된 하나 이상의 작용기를 갖는 PEG 또는 관련 중합체), 또는 내부에 분해 가능한 결합을 갖는 PEG를 비롯하여 임의의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0698] PEG는 일반적으로 투명하고, 무색 무취이며, 수용성이고, 열에 안정하고, 많은 화학 물질에 대해 비활성이며, 가수분해 또는 열화되지 않고, 일반적으로 비독성이다. 폴리(에틸렌 글리콜)은 생체적합성 물질로서 간주된다. 즉, PEG는 생조직 또는 생유기체에 손상을 주지 않고 공존할 수 있다. 더욱 구체적으로, PEG는 실질적으로 비면역원성이다. 즉, PEG는 체내에서 면역 반응을 일으키지 않는 경향이 있다. PEG가 체내에서 일정한 바람직한 기능을 갖는 분자, 예컨대 생물학적 활성 물질에 부착될 경우, PEG는 상기 물질을 마스킹하는 경향이 있어서 유기체가 상기 물질의 존재를 허용할 수 있도록 임의의 면역 반응을 저감 또는 제거할 수 있다. PEG 접합체는 실질적인 면역 반응을 유발하거나 응고 또는 다른 바람직하지 않은 효과를 유발하는 경향을 나타내지 않는다. 화학식 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (식 중, n 은 약 3~약 4,000이고, 일반적으로 약 20~약 2,000임)로 표시되는 PEG가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 PEG가 중합체 골격으로서 특히 유용하다. PEG의 분자량은 약 100 Da~약 100,000 Da 또는 그 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 범위일 수 있다. PEG의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da를 포함하나 이들에 한정되지 않는 약 100 Da~약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 100 Da~약 50,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 100 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 1,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 5,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, PEG의 분자량은 약 10,000 Da~약 40,000 Da이다.

[0699] 상기 중합체 골격은 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 중합체 골격은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 분지형 중합체는 중심 분지 코어 부분과 이 중심 분지 코어에 결합된 다수의 선형 중합체 쇄를 갖는다. PEG는 다양한 폴리올, 예를 들어 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 펜타에리스리톨 및 솔비톨에 에틸렌 옥시드를 첨가함으로써 제조할 수 있는 분지형으로 사용된다. 또한, 상기 중심 분지 부분은 몇몇 아미노산, 예컨대 라이신으로부터 유도될 수 있다. 분지형 폴리(에틸렌 글리콜)은 일반적으로 화학식 $\text{R}-(\text{PEG}-\text{OH})_m$ (여기서, R은 코어 부분, 예컨대 글리세롤, 글리세롤 올리고머 또는 펜타에리스리톨로부터 유도되고, m 은 아암의 수를 나타냄)으로 표시될 수 있다. 또한, 멀티아암형 PEG 분자, 예컨대 본 명세서에서 각각 그 전체가 참고로 인용되는 미국 특허 제5,932,462호, 제5,643,575호, 제5,229,490호 및 제4,289,872호; 미국 특허 출원 제2003/0143596호; WO 96/21469; 및 WO 93/21259에 기재된 것들도 중합체 골격으로서 사용될 수 있다.

[0700] 또한, 분지형 PEG는 $\text{PEG}(-\text{YCH}_2)_n$ (여기서, Y는 링커기이고, Z는 일정한 길이의 원자로 된 쇄에 의해 CH에 연결된 활성화된 말단 기임)으로 표시되는 갈래형 PEG의 형태일 수 있다.

- [0701] 또 다른 분지 형태인 현수형 PEG는 PEG 쇠의 말단이 아니라 PEG 골격을 따라 카복실기와 같은 반응기를 갖는다.
- [0702] 또한, 이러한 PEG 형태 이외에도, 골격 내에 약한 또는 분해 가능한 결합을 갖는 중합체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 중합체 골격 내에 가수 분해되기 쉬운 에스테르 결합을 갖는 PEG를 제조할 수 있다. 이하에 나타낸 바와 같이, 이러한 가수분해는 상기 중합체를 저분자량의 단편으로 절단시킨다:
- [0703] $-PEG-CO_2-PEG- + H_2O \rightarrow PEG-CO_2H + HO-PEG-$
- [0704] 당업자라면, 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG라는 용어가 본 명세서에 개시된 것들을 포함하나 이들에 한정되지 않는 공지된 모든 형태를 나타내거나 포함한다는 것을 이해할 수 있다.
- [0705] 다수의 다른 중합체도 본 발명에 사용하기에 적합하다. 일부 실시형태에서, 2개~약 300개의 말단을 갖는 수용성 중합체 골격이 본 발명에 특히 유용하다. 적절한 중합체의 예로는 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 이들의 공중합체(에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체를 포함하나 이에 한정되지 않음), 이들의 삼원 공중합체, 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 다양할 수 있으나, 일반적으로 약 800 Da~약 100,000 Da, 종종 약 6,000 Da~약 80,000 Da의 범위이다. 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da를 포함하나 이들에 한정되지 않는 약 100 Da~약 100,000 Da의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 약 100 Da~약 50,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 약 100 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 약 1,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 약 5,000 Da~약 40,000 Da이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 골격의 각 쇠의 분자량은 약 10,000 Da~약 40,000 Da이다.
- [0706] 당업자라면, 실질적으로 수용성인 골격의 상기 리스트가 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 전술한 특징을 갖는 모든 중합체 물질이 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.
- [0707] 본 발명의 일부 실시형태에서, 상기 중합체 유도체는 "다작용성"이며, 이는 중합체 골격이 작용기에 의해 작용기화 또는 활성화된 2개 이상의 말단, 경우에 따라서는 약 300개만큼 많은 말단을 갖는다는 것을 의미한다. 다작용성 중합체 유도체의 예로는 각각의 말단이 동일하거나 상이할 수 있는 작용기에 결합된 2개의 말단을 갖는 선형 중합체를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0708] 일 실시형태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0709] $X-A-POLY-B-N=N-N$
- [0710] 상기 식에서,
- [0711] $N=N=N$ 은 아지드 부분이고;
- [0712] B는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 연결 부분이며;
- [0713] POLY는 수용성 비방향성 중합체이고;
- [0714] A는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있으며 B와 동일하거나 상이할 수 있는 연결 부분이며;
- [0715] X는 제2 작용기이다.
- [0716] A 및 B에 대한 연결 부분의 예로는 18개 이하, 예를 들어 1~10개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 알킬기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 헤테로원자를 상기 알킬쇄에 포함시킬 수 있다. 상기 알킬쇄는 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 부분의 다른 예로는 10개 이하, 예를 들어 5~6개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 아릴기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기의 다른 예로는 미국 특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0143596호(이들 각각은 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함함)에 기재된 연결기를 포함한다. 당업자라면 연결 부분에 대한 상기 리스트가 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 전술한 특징을 갖는 모든 연결 부분이 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주

된다는 것을 알 것이다.

- [0717] X로서 사용하기에 적합한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스테르, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 카보네이트, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아지드를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 선택된 X 부분은 아지드기와 반응이 발생하지 않도록 아지드기와 상용성이어야 한다. 아지드 함유 중합체 유도체는 호모이작용성(이는 제2 작용기(즉, X) 역시 아지드 부분임을 의미함), 또는 헤테로이작용성(이는 제2 작용기가 상이한 작용기임을 의미함)일 수 있다.
- [0718] "보호된"이란 표현은 특정한 반응 조건하에 화학적 반응성 작용기의 반응을 방지하는 보호기 또는 부분이 존재함을 의미한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응기의 종류에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 화학적 반응기가 아민 또는 하이드라지드인 경우, 보호기는 tert-부틸옥시카보닐(t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc)로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응기가 티올인 경우, 보호기는 오르토포리딜디설파이드일 수 있다. 화학적 반응기가 카복실산, 예를 들어 부탄산 또는 프로피온산, 또는 하이드록실기인 경우, 보호기는 벤질 또는 알킬 기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 당업계에 공지된 다른 보호기도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [0719] 문헌에 기재된 말단 작용기의 구체적인 예로는 N-숙신이미딜 카보네이트(예를 들어, 미국 특허 제5,281,698호 및 제5,468,478호 참조), 아민(예를 들어, 문헌[Buckmann et al., Makromol. Chem. 182:1379 (1981)] 및 문헌[Zalipsky et al., Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)] 참조), 하이드라지드(예를 들어, 문헌[Andresz et al., Makromol. Chem. 179:301 (1978)] 참조), 숙신이미딜 프로피오네이트 및 숙신이미딜 부타노에이트(예를 들어, 문헌[Olson et al., in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181], 문헌[Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997]; 및 미국 특허 제5,672,662호 참조), 숙신이미딜 숙시네이트(예를 들어, 문헌[Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984)] 및 문헌[Joppich et al., Makromol. Chem. 180:1381 (1979)] 참조), 숙신이미딜 에스테르(예를 들어, 미국 특허 제4,670,417호 참조), 벤조트리아졸 카보네이트(예를 들어, 미국 특허 제5,650,234호 참조), 글리시딜 에테르(예를 들어, 문헌[Pitha et al., Eur. J. Biochem. 94:11 (1979)], 문헌[Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)] 참조), 옥시카보닐이미다졸(예를 들어, 문헌[Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983)], 문헌[Tondelli et al., J. Controlled Release 1:251 (1985)] 참조), p-니트로페닐 카보네이트(예를 들어, 문헌[Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985)]; 및 문헌[Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)] 참조), 알데히드(예를 들어, 문헌[Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)], 미국 특허 제5,824,784호 및 미국 특허 제5,252,714호 참조), 말레이미드(예를 들어, 문헌[Goodson et al., Bio/Technology 8:343 (1990)], 문헌[Romani et al., in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)] 및 문헌[Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)] 참조), 오르토포리딜-디설파이드(예를 들어, 문헌[Woghiren, et al., Bioconj. Chem. 4:314 (1993)] 참조), 아크릴올(예를 들어, 문헌[Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)] 참조), 비닐설펜(예를 들어, 미국 특허 제5,900,461호 참조)을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 상기 모든 참고 문헌 및 특허는 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함된다.
- [0720] 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 발명의 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:
- [0721] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N=N=N$
- [0722] 상기 식에서,
- [0723] X는 전술한 것과 같은 작용기이고;
- [0724] n은 약 20~약 4,000이다.
- [0725] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:
- [0726] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-W-N=N=N$
- [0727] 상기 식에서,

- [0728] W는 1~10개의 탄소 원자를 포함하는 지방족 또는 방향족 링커 부분이고;
- [0729] n은 약 20~약 4,000이며;
- [0730] X는 전술한 것과 같은 작용기이고;
- [0731] m은 1~10이다.
- [0732] 본 발명의 아지드 함유 PEG 유도체는 당업계에 공지되고/되거나 본 명세서에 개시된 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 이하에 제시된 한 방법에서, 평균 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격으로서, 제1 작용기에 결합된 제1 말단과, 적절한 이탈기에 결합된 제2 말단을 갖는 중합체 골격을 아지드 음이온(이것은 나트륨, 칼륨, tert-부틸암모늄 등을 비롯한 다수의 임의의 적절한 반대 이온과 쌍을 형성할 수 있음)과 반응시킨다. 이탈기는 친핵성 치환을 겪게 되고 아지드 부분에 의해 대체되어, 소정의 아지드 함유 PEG 중합체가 수득된다.
- [0733] $X-PEG-L + N_3^- \rightarrow X-PEG-N_3$
- [0734] 제시된 바와 같이, 본 발명에 사용하기 위한 적절한 중합체 골격은 화학식 X-PEG-L(식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이며, L은 적절한 이탈기임)로 표시된다. 적절한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카복실산, 카복실산 보호된 카복실산, 말레이미드, 디티오피리딘 및 비닐피리딘 및 케톤을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 적절한 이탈기의 예로는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0735] 본 발명의 아지드 함유 중합체 유도체의 또 다른 제조 방법에서는, 아지드 작용기를 보유하는 연결 체제를 평균 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격과 접촉시켜서(이때 상기 연결 체제는 PEG 중합체 상의 화학적 작용기와 선택적으로 반응하는 화학적 작용기를 보유함), 아지드 함유 중합체 유도체 생성물을 형성한다(상기 아지드는 연결기에 의해 중합체 골격으로부터 분리됨).
- [0736] 대표적인 반응식은 다음과 같이 나타내어진다:
- [0737] $X-PEG-M + N-링커-N=N=N \rightarrow PG-X-PEG-링커-N=N=N$
- [0738] 상기 식에서,
- [0739] PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 알콕시와 같은 캡핑기 또는 전술한 작용기이며;
- [0740] M은 아지드 작용기와는 반응하지 않으나 N 작용기와는 효율적이고 선택적으로 반응하는 작용기이다.
- [0741] 적절한 작용기의 예로는, N이 아민인 경우 M은 카복실산, 카보네이트 또는 활성 에스테르인 것; N이 하이드라지드 또는 아미노옥시 부분인 경우 M이 케톤인 것; N이 친핵체인 경우 M이 이탈기인 것을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0742] 미정제 생성물의 정제는 생성물의 침전에 이어 필요에 따라 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0743] PEG 디아민의 경우, 더 구체적인 예가 이하에 제시되어 있으며, 여기서 아민 중 하나는 tert-부틸-Boc와 같은 보호기에 의해 보호되고, 생성된 단일보호 PEG 디아민은 아지드 작용기를 보유하는 연결 부분과 반응한다:
- [0744] $BocHN-PEG-NH_2 + HO_2C-(CH_2)_3-N=N=N$
- [0745] 이 경우, 상기 아민기를, 티오닐 클로라이드 또는 카보디이미드 반응제 및 N-하이드록시숙신이미드 또는 N-하이드록시벤조트리아졸과 같은 다양한 활성화제를 사용하여 카복실산기에 커플링하여, 모노아민 PEG 유도체와 아지드 함유 링커 부분 사이에 아마이드 결합을 형성한다. 아마이드 결합이 성공적으로 형성되면, 형성된 N-tert-부틸-Boc-보호 아지드 함유 유도체는 생물 활성 분자를 변경하는 데 바로 사용되거나, 또는 이것은 다른 유용한 작용기를 설치하기 위해 추가로 가공될 수 있다. 예를 들어, 상기 N-t-Boc 기를 강산을 사용한 처리로 가수분해하여 오메가-아미노-PEG-아지드를 생성할 수 있다. 생성된 아민은, 유용한 헤테로이작용성 반응제의 생성을 위한, 말레이미드기, 활성화된 디설파이드, 활성화된 에스테르 등과 같은 다른 유용한 작용기를 설치하기 위한 합성 수단으로서 사용될 수 있다.

- [0746] 헤테로이작용성 유도체는 중합체의 각각의 말단에 상이한 분자를 부착시킬 것이 요망될 경우 특히 유용하다. 예를 들어, 오메가-N-아미노-N-아지도 PEG는 PEG의 한쪽 말단에 대한 활성화된 친전자성 기, 예컨대 알데히드, 케톤, 활성화된 에스테르, 활성화된 카보네이트 등을 갖는 분자의 부착을 가능하게 하고 PEG의 다른 쪽 말단에 대한 아세틸렌기를 갖는 분자의 부착을 가능하게 한다.
- [0747] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0748] $X-A-POLY-B-C\equiv C-R$
- [0749] 상기 식에서,
- [0750] R은 H, 또는 알킬, 알켄, 알콕시, 또는 아릴 또는 치환된 아릴 기이고;
- [0751] B는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 연결 부분이며;
- [0752] POLY는 수용성 비항원성 중합체이고;
- [0753] A는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있으며 B와 동일할 수도 있고 상이할 수도 있는 연결 부분이며;
- [0754] X는 제2 작용기이다.
- [0755] A 및 B에 대한 연결 부분의 예로는 18개 이하, 예를 들어 1~10개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 알킬기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 헤테로원자를 상기 알킬쇄에 포함시킬 수 있다. 상기 알킬쇄는 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 부분의 다른 예로는 10개 이하, 예를 들어 5~6개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 아릴기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기의 다른 예로는 미국 특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0143596호(이들 각각은 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함함)에 기재된 연결기를 포함한다. 당업자라면 연결 부분에 대한 상기 리스트가 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 전술한 특징을 갖는 다중 다양한 연결 부분이 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.
- [0756] X로서 사용하기에 적합한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성화 에스테르, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성화 카보네이트, 예컨대 N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성화 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아지드를 들 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 선택된 X 부분은 아세틸렌기와 반응이 발생하지 않도록 아세틸렌기와 상용성이어야 한다. 아세틸렌 함유 중합체 유도체는 호모이작용성(이는 제2 작용기(즉, X) 역시 아세틸렌 부분임을 의미함), 또는 헤테로이작용성(이는 제2 작용기가 상이한 작용기임을 의미함)일 수 있다.
- [0757] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:
- [0758] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C\equiv CH$
- [0759] 상기 식에서,
- [0760] X는 전술한 것과 같은 작용기이고;
- [0761] n은 약 20~약 4,000이며;
- [0762] m은 1~10이다.
- [0763] 상기 헤테로이작용성 PEG 중합체 각각의 구체적인 예는 이하에 제시한다.
- [0764] 본 발명의 아세틸렌 함유 PEG 유도체는 당업자에게 공지되고/되거나 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 한 방법에서, 평균 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격으로서, 제1 작용기에 결합된 제1 말단과, 적절한 친핵성 기에 결합된 제2 말단을 갖는 중합체 골격을, 아세틸렌 작용기와 함께, PEG 상의 친핵성 기와의 반응에 적합한 이탈기를 보유하는 화합물과 반응시킨다. 친핵성 부분을 보유하는 PEG 중합체와 이탈기 보유 분자를 조합할 경우, 이탈기는 친핵성 치환을 겪게 되고 친핵성 부분에 의해 대체되어, 소정

의 아세틸렌 함유 중합체가 수득된다.

- [0765] $X\text{-PEG-Nu} + L\text{-A-C} \rightarrow X\text{-PEG-Nu-A-C}\equiv\text{CR}'$
- [0766] 제시된 바와 같이, 상기 반응에 사용하기에 바람직한 중합체 골격은 화학식 X-PEG-Nu(식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, Nu는 친핵성 부분이며, X는 Nu, L 또는 아세틸렌 작용기와 반응하지 않는 작용기임)로 표시된다.
- [0767] Nu의 예로는 주로 SN2형 메커니즘을 통해 반응하는 아민, 알콕시, 아릴옥시, 설프하이드릴, 이미노, 카복실레이트, 하이드라지드, 아미노옥시 기를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. Nu 기의 추가적인 예는 주로 친핵 첨가 반응을 통해 반응하는 작용기를 포함한다. L 기의 예로는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트, 및 친핵 치환 반응을 겪을 것으로 예상되는 다른 기뿐만 아니라, 케톤, 알데히드, 티오에스테르, 올레핀, α - β 불포화 카보닐기, 카보네이트 및 친핵체에 의한 첨가 반응을 겪을 것으로 예상되는 다른 친전자성 기를 들 수 있다.
- [0768] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, A는 탄소 원자수 1~10의 지방족 링커 또는 탄소 원자수 6~14의 치환된 아릴 고리이다. X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이고, L은 적절한 이탈기이다.
- [0769] 본 발명의 아세틸렌 함유 중합체 유도체의 제조를 위한 또 다른 방법에서, 한쪽 말단에 보호된 작용기 또는 캡핑제를 보유하고 다른 쪽 말단에 적절한 이탈기를 보유하는, 평균 분자량이 약 800 Da~약 100,000 Da인 PEG 중합체를 아세틸렌 음이온과 접촉시킨다:
- [0770] 대표적인 반응식은 다음과 같이 나타내어진다:
- [0771] $X\text{-PEG-L} + \text{-C}\equiv\text{CR}' \rightarrow X\text{-PEG-C}\equiv\text{CR}'$
- [0772] 상기 식에서,
- [0773] PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 알콕시와 같은 캡핑기 또는 전술한 작용기이고;
- [0774] R'은 H, 알킬, 알콕시, 아릴 또는 아릴옥시 기 또는 치환된 알킬, 알콕실, 아릴 또는 아릴옥시 기이다.
- [0775] 상기 예에서, 이탈기 L은 충분한 농도의 아세틸렌 음이온과 접촉할 경우 SN2형 치환 반응을 겪을 수 있도록 충분히 반응성이 있어야 한다. 아세틸렌 음이온에 의한 이탈기의 SN2 치환을 수행하는 데 필요한 반응 조건은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0776] 미정제 생성물의 정제는 통상적으로 생성물의 침전에 이어 필요에 따라 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0777] 수용성 중합체는 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 상기 수용성 중합체는 FGF-21 폴리펩티드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 또는 비천연적으로 코딩되거나 천연적으로 코딩된 아미노산의 임의의 작용기 또는 치환기, 또는 비천연적으로 코딩되거나 천연적으로 코딩된 아미노산에 부가된 임의의 작용기 또는 치환기를 통해 연결될 수 있다. 대안으로, 상기 수용성 중합체는 천연 아미노산(시스테인, 라이신 또는 N 말단 잔기의 아민기를 포함하나 이에 한정되지 않음)을 통해 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입한 FGF-21 폴리펩티드에 연결된다. 일부 경우에 있어서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 비천연 아미노산을 포함하며, 이때 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들)은 수용성 중합체(들)(PEG 및/또는 올리고사카라이드를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 연결된다. 일부 경우에 있어서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 수용성 중합체에 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들)을 추가로 포함한다. 일부 경우에 있어서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 수용성 중합체에 연결된 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들) 및 수용성 중합체에 연결된 하나 이상의 천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 수용성 중합체는 비접합 형태에 비해 FGF-21 폴리펩티드의 혈청 반감기를 증대시킨다.
- [0778] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 연결되는 수용성 중합체의 수(즉, PEG화 또는 글리코실화 정도)는 생체내 반감기와 같은 약리학적, 약동학적 또는 약력학적 특성이 변경(증가 또는 감소를 포함하나 이에 한정되지 않음)되도록 조정할 수 있다. 일부 실시형태에서, FGF-21의 반감기는 비변형 폴리펩티드에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 50배, 또는 적어도 약 100배 증가된다.
- [0779] **강한 친핵성 기(즉, 하이드라지드, 하이드라진, 하이드록실아민 또는 세미카바지드)**를 포함하는 PEG 유도체

- [0780] 본 발명의 일 실시형태에서, 카보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 PEG 골격에 직접 연결된 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카바지드 부분을 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.
- [0781] 일부 실시형태에서, 상기 하이드록실아민 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0782] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$
- [0783] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임).
- [0784] 일부 실시형태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0785] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0786] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 경우에 따라 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 카보닐기(C=O)이다.
- [0787] 일부 실시형태에서, 상기 세미카바지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0788] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0789] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다.
- [0790] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 아미드 결합에 의해 PEG 골격에 연결되는 말단 하이드록실아민, 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카바지드 부분을 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.
- [0791] 일부 실시형태에서, 상기 하이드록실아민 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0792] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{NH}_2$
- [0793] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임).
- [0794] 일부 실시형태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0795] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0796] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 경우에 따라 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 카보닐기(C=O)이다.
- [0797] 일부 실시형태에서, 상기 세미카바지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0798] $\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0799] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다.
- [0800] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카바지드 부분을 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키는데, 이때 분지형 PEG의 각각의 쇄는 MW가 10~40 kDa, 예를 들어 5~20 kDa일 수 있다.
- [0801] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 분지형 구조를 갖는 PEG 유도체로 변형시킨다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0802] $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})]_2\text{CH}(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{NH}-\text{NH}_2$
- [0803] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이고, X는 경우에 따라 존재할 수도 존재하지 않을 수도 있는 카보닐기(C=O)이다.
- [0804] 일부 실시형태에서, 세미카바지드기를 포함하는 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

- [0805] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$
- [0806] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 경우에 따라 NH, O, S, C(O)이거나 존재하지 않으며, m은 2~10이고, n은 100~1,000이다.
- [0807] 일부 실시형태에서, 하이드록실아민기를 포함하는 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0808] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$
- [0809] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 경우에 따라 NH, O, S, C(O)이거나 존재하지 않으며, m은 2~10이고, n은 100~1,000이다.
- [0810] 수용성 중합체(들)가 FGF-21 폴리펩티드에 연결되는 정도 및 부위는 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 대한 FGF-21 폴리펩티드의 결합을 조절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합은, 문헌[Spencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988)]에 기재된 바와 같이 FGF-21에 대한 평형 결합 분석으로 측정시, FGF-21 폴리펩티드가 약 400 nM 이하의 K_d , 150 nM 이하의 K_d 로, 일부 경우에는 100 nM 이하의 K_d 로 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 결합하도록 조정된다.
- [0811] 중합체 활성화 및 펩티드 접합에 대한 방법 및 화학 반응에 대해서는 문헌에 기재되어 있고 당업계에 공지되어 있다. 중합체의 활성화를 위해 일반적으로 이용되는 방법으로는, 시아노젠 브로마이드, 펄로오데이트, 글루타르알데히드, 비에폭시드, 에피클로로히드린, 디비닐설폰, 카보다이미드, 설포닐 할라이드, 트리클로로트리아진 등에 의한 작용기의 활성화를 포함하나 이에 한정되지 않는다[참고 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].
- [0812] PEG의 작용기화 및 접합에 대한 몇 가지 재고찰 문헌 및 논문이 입수 가능하다. 예를 들어, 문헌[Harris, Macromol. Chem. Phys. C25:325-373 (1985)]; 문헌[Scouten, Methods in Enzymology 135:30-65 (1987)]; 문헌[Wong et al., Enzyme Microb. Technol. 14:866-874 (1992)]; 문헌[Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304 (1992)]; 문헌[Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6:150-165 (1995)]을 참조할 수 있다.
- [0813] 또한, 중합체의 활성화 방법에 대해서는 WO 94/17039, 미국 특허 제5,324,844호, WO 94/18247 및 WO 94/04193, 미국 특허 제5,219,564호, 미국 특허 제5,122,614호, WO 90/13540, 미국 특허 제5,281,698호 및 WO 93/15189호에서 찾아볼 수 있으며, 응고 인자 VIII(WO 94/15625), 헤모글로빈(WO 94/09027), 산소 운반 분자(미국 특허 제4,412,989호), 리보뉴클레아제 및 슈퍼옥시드 디스뮤타제[Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11:141-45 (1985)]를 포함하나 이들에 한정되지 않는 효소와 활성화된 중합체 간의 접합에 대해서는 문헌에 공지되어 있다. 인용된 모든 문헌 및 특허는 본원에 참고로 포함된다.
- [0814] p-아지도-L-페닐알라닌과 같은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 PEG화(즉, 임의의 수용성 중합체의 부가)는 임의의 편리한 방법으로 수행한다. 예를 들어, FGF-21 폴리펩티드를 알킨 말단 mPEG 유도체로 PEG화한다. 요약하면, 실온에서 과잉량의 고체 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH를 p-아지도-L-Phe 함유 FGF-21 폴리펩티드의 수용액에 교반하면서 첨가한다. 일반적으로, 상기 수용액은 반응이 수행되는 pH(일반적으로 약 pH 4~10) 가까이의 pK_a를 갖는 완충액으로 완충시킨다. 예를 들어 pH 7.5에서의 PEG화를 위한 적절한 완충액의 예로는 HEPES, 포스페이트, 보레이트, TRIS-HCl, EPPS 및 TES를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 상기 pH는 연속적으로 모니터링되며 필요에 따라 조절된다. 상기 반응은 일반적으로 약 1~48시간 동안 지속시킨다.
- [0815] 그 후, 반응 생성물을 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용하여, 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH 및 분자의 양쪽 말단에서 비차단 PEG가 활성화될 경우(이로써 FGF-21 폴리펩티드 변이체 분자가 가교결합됨) 형성될 수 있는 PEG화 FGF-21 폴리펩티드의 임의의 고분자량 복합체로부터 PEG화 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 분리한다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 중의 조건은, 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH는 컬럼을 통과하는 반면, 하나 이상의 PEG기에 접합된 하나의 FGF-21 폴리펩티드 변이체 분자를 포함하는 임의의 가교결합된 PEG화 FGF-21 폴리펩티드 변

이체 복합체는 목적 형태에 따라 용리되도록 하는 조건이다. 적절한 조건은, 가교결합된 복합체와 목적 접합체의 상대 크기에 따라 달라지며, 당업자가 쉽게 결정할 수 있다. 목적 접합체를 함유하는 용리액은 한외여과로 농축시키고 정용여과로 탈염한다.

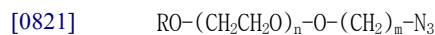
[0816] 필요에 따라, 소수성 크로마토그래피로부터 얻은 PEG화된 FGF-21 폴리펩티드를 친화성 크로마토그래피; 음이온 교환 크로마토그래피 또는 양이온 교환 크로마토그래피(DEAE 세파로스를 사용하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음); 실리카 크로마토그래피; 역상 HPLC; 겔 여과(세파덱스 G-75를 사용하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기 배제 크로마토그래피, 금속 킬레이트 크로마토그래피; 한외여과/정용여과; 에탄올 침전; 황산암모늄 침전; 크로마토포커싱; 치환 크로마토그래피; 전기영동법(분취용 등전 포커싱을 포함하나 이에 한정되지 않음); 차등 용해도법(황산암모늄 침전을 포함하나 이에 한정되지 않음); 또는 추출을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 당업자에게 공지된 하나 이상의 방법으로 추가 정제할 수 있다. 겔보기 분자량은 구형 단백질 표준 물질과 비교함으로써 GPC에 의해 추정할 수 있다(문헌[Preneta AZ, in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306] 참조). FGF-21:PEG 접합체의 순도는 단백질 분해(트립신 분해를 포함하나 이에 한정되지 않음) 후 질량 분광분석법으로 평가할 수 있다[Pepinsky R. B., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297 (3):1059-66 (2001)].

[0817] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 아미노산에 연결된 수용성 중합체는 제한없이 추가로 유도체화 또는 치환될 수 있다.

[0818] 아지드 함유 PEG 유도체

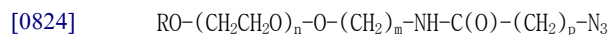
[0819] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드를 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 알킨 부분과 반응하는 아지드 부분을 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체는 평균 분자량이 1~100 kDa이고, 일부 실시형태에서, 10~40 kDa이다.

[0820] 일부 실시형태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



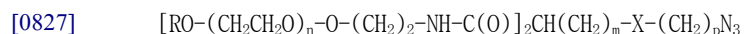
[0822] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임).

[0823] 또 다른 실시형태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



[0825] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이다(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임).

[0826] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 알킨 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 말단 아지드 부분을 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키며, 이때 상기 분지형 PEG의 각각의 쇄의 MW는 10~40 kDa, 예를 들어 5~20 kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



[0828] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이며, X는 경우에 따라 O, N, S 또는 카보닐기(C=O)(각각의 경우에 존재할 수도 존재하지 않을 수도 있음)이다.

[0829] 알킨 함유 PEG 유도체

[0830] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드를 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 부분과 반응하는 알킨 부분을 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.

[0831] 일부 실시형태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



[0833] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, n은 100~1,000이다(즉, 평균 분자량이 5~40 kDa임).

[0834] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 알킨을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티

드를 아미드 결합에 의해 PEG 골격에 연결되는 말단 아지드 또는 말단 알킨 부분을 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.

[0835] 일부 실시형태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

[0836] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

[0837] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이다.

[0838] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 아지드 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 말단 알킨 부분을 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키며, 이때 분지형 PEG의 각각의 쇄의 MW는 10~40 kDa, 예를 들어 5~20 kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

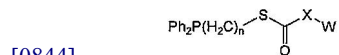
[0839] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pC\equiv CH$

[0840] 상기 식에서, R은 단순한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2~10이며, p는 2~10이고, n은 100~1,000이며, X는 경우에 따라 O, N, S 또는 카보닐기(C=O)이거나 존재하지 않는다.

[0841] 포스핀 함유 PEG 유도체

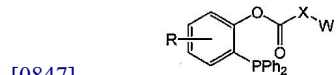
[0842] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드를, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 부분과 반응하는 아릴 포스핀기를 추가로 포함하는 활성화된 작용기(에스테르, 카보네이트를 포함하나 이에 한정되지 않음)를 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체는 평균 분자량이 1~100 kDa이고, 일부 실시형태에서, 10~40 kDa이다.

[0843] 일부 실시형태에서, 상기 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



[0845] 상기 식에서, n은 1~10이고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이다.

[0846] 일부 실시형태에서, 상기 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:



[0848] 상기 식에서, X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이며, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기이다. 대표적인 R 기로는 $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-할로젠$, $-C(O)R'$, $-CONR'R''$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-CN$ 및 $-NO_2$ 를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''은 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헥테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1~3개의 할로젠으로 치환된 아릴을 포함하나, 이에 한정되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 나타낸다. 본 발명의 화합물이 예를 들어 1개보다 많은 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 독립적으로 선택되고, 각각의 R', R'', R''' 및 R''''기도 이들이 1개보다 많이 존재할 경우 독립적으로 선택된다. R' 및 R''이 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 그 질소 원자와 함께 5원, 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-NR'R''$ 은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 치환기에 관한 전술한 설명으로부터, 당업자라면 "알킬"이란 용어가 수소 이외의 다른 기에 결합된 탄소를 포함하는 기, 예컨대 할로알킬($-CF_3$ 및 $-CH_2CF_3$ 를 포함하나 이들에 한정되지 않음) 및 아실($-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ 등을 포함하나 이들에 한정되지 않음)을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0849] 다른 PEG 유도체 및 일반적인 PEG화 기법

[0850] FGF-21 폴리펩티드에 연결될 수 있는 다른 예시적인 PEG 분자 및 PEG화 방법은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0001838호; 제2002/0052009호; 제2003/0162949호; 제2004/0013637호; 제2003/0228274호; 제2003/0220447호; 제2003/0158333호; 제2003/0143596호; 제2003/0114647호; 제2003/0105275호; 제2003/0105224호; 제2003/0023023호; 제2002/0156047호; 제2002/0099133호; 제2002/0086939호; 제2002/0082345호; 제2002/0072573호; 제2002/0052430호; 제2002/0040076호; 제2002/0037949호; 제2002/0002250호; 제2001/0056171

호; 제2001/0044526호; 제2001/0021763호; 미국 특허 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, WO 95/13090, 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 것들을 포함하나 이들에 한정되지 않으며, 상기 문헌들은 본 명세서에서 참고로 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 PEG 분자는 단일쇄, 분지쇄, 멀티아암쇄, 단일 작용성, 이 작용성, 다작용성, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 형태로 사용될 수 있다.

[0851] 그 밖의 중합체 및 PEG 유도체는 본 명세서에서 그 전체를 참고로 포함하는 하기 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217532호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217289호, 미국 가특허 제60/755,338호; 미국 가특허 제60/755,711호; 미국 가특허 제60/755,018호; 국제 특허 출원 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; 미국 가특허 제60/743,041호; 미국 가특허 제60/743,040호; 국제 특허 출원 PCT/US06/47822; 미국 가특허 제60/882,819호; 미국 가특허 제60/882,500호; 및 미국 가특허 제60/870,594호에 기재되어 있다.

[0852] 혈청 알부민에 대한 친화성 증대

[0853] 또한, 다양한 분자를 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 융합시켜 상기 FGF-21 폴리펩티드의 혈청 반감기를 조절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 분자를 연결 또는 융합시켜, 동물의 체내에서의 내인성 혈청 알부민에 대한 친화성을 증대시킨다.

[0854] 예를 들어, 일부 경우, FGF-21 폴리펩티드와 알부민 결합성 서열의 재조합 융합체를 제조한다. 예시적인 알부민 결합성 서열은 스트렙토코커스(*streptococcal*) 단백질 G로부터의 알부민 결합성 도메인(예를 들어, 문헌[Makrides et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:534-542 (1996)] 및 문헌[Sjolander et al., J. Immunol. Methods 201:115-123 (1997)] 참조), 또는 알부민 결합성 펩티드, 예를 들어 문헌[Dennis, et al., J. Biol. Chem. 277(38):35035-35043 (2002)]에 기재된 펩티드를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0855] 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 지방산에 의해 아실화시킨다. 일부 경우, 상기 지방산은 혈청 알부민에 대한 결합을 촉진한다. 예를 들어, 문헌[Kurtzhals, et al., Biochem. J. 312:725-731 (1995)]을 참조할 수 있다.

[0856] 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 혈청 알부민(인간 혈청 알부민을 포함하나 이에 한정되지 않음)에 직접 융합시킨다. 당업자라면, 다종 다양한 다른 분자들을 본 발명의 FGF-21에 연결하여, 혈청 알부민 또는 다른 혈청 성분에 대한 결합을 조절할 수 있다는 것을 알 것이다.

[0857] X. FGF-21 폴리펩티드의 글리코실화

[0858] 본 발명은 사카라이드 잔기를 보유하는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 도입된 FGF-21 폴리펩티드를 포함한다. 상기 사카라이드 잔기는 천연 사카라이드 잔기(N-아세틸글루코사민을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 비천연 사카라이드 잔기(3-플루오로갈락토스를 포함하나 이에 한정되지 않음)일 수 있다. 상기 사카라이드는 N 결합 또는 O 결합 글리코시드 결합(N-아세틸갈락토스-L-세린을 포함하나 이에 한정되지 않음) 또는 비천연 결합(옥심 또는 상응하는 C 결합 또는 S 결합 글리코시드를 포함하나 이들에 한정되지 않음)에 의해 비천연적으로 코딩된 아미노산에 연결될 수 있다.

[0859] 상기 사카라이드(글리코실을 포함하나 이에 한정되지 않음) 부분은 생체내 또는 시험관내에서 FGF-21 폴리펩티드에 부가될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 카보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 아미노옥시기에 의해 유도체화된 사카라이드를 이용하여 변형시켜, 옥심 결합을 통해 연결된 상응하는 글리코실화된 폴리펩티드를 생성한다. 일단 사카라이드가 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착되면, 이 사카라이드를 글리코실트랜스퍼라제 및 다른 효소로 추가로 처리하여 FGF-21 폴리펩티드에 결합된

올리고사카라이드를 얻을 수 있다. 예를 들어, 문헌[H. Liu, et al., J. Am. Chem. Soc. 125:1702-1703 (2003)]을 참조할 수 있다.

[0860] 본 발명의 일부 실시형태에서, 카보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 아미노옥시 유도체로서 제조된 규정된 구조를 갖는 글리칸으로 직접 변형시킨다. 당업자라면 아지드, 알킨, 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카바지드를 비롯한 다른 작용기가 사카라이드를 비천연적으로 코딩된 아미노산에 연결하는 데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0861] 본 발명의 일부 실시형태에서, 그 후, 아지드 또는 알키닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 각각 알키닐 또는 아지드 유도체를 포함하나 이들에 한정되지 않는 것에 의해 Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응을 포함하나 이에 한정되지 않는 방법으로 변형시킬 수 있다. 이 방법에 의하면 매우 높은 선택도로 단백질을 변형시킬 수 있다.

[0862] XI. FGF-21 이량체 및 다량체

[0863] 본 발명은 또한 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체(즉, 삼량체, 사량체 등)와 같은 FGF-21 및 FGF-21 유사체 조합을 제공하며, 여기서 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21은 또 다른 FGF-21 또는 이의 FGF-21 변이체 또는 FGF-21이 아닌 임의의 다른 폴리펩티드 또는 이의 FGF-21 변이체에 그 폴리펩티드 골격에 직접 또는 링커를 통해 결합된다. 단량체에 비해 증가된 분자량으로 인하여, FGF-21 이량체 또는 다량체 접합체는 단량체 FGF-21에 비해 상이한 약리학적, 약동학적 또는 약력학적 특성, 조절된 치료 반감기 또는 조절된 혈장 반감기를 포함하나 이들에 한정되지 않는 새로운 또는 바람직한 특성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 이량체는 FGF-21 수용체의 신호 전달을 조절할 것이다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 이량체 또는 다량체는 FGF-21 수용체 길항제, 효연제 또는 조절제로서 작용할 것이다.

[0864] 일부 실시형태에서, 이량체 또는 다량체를 포함하는 FGF-21 내에 존재하는 하나 이상의 FGF-21 분자는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0865] 일부 실시형태에서, 상기 FGF-21 폴리펩티드는 Asn-Lys 아미드 결합 또는 Cys-Cys 디설파이드 결합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 결합을 통해 직접 연결된다. 일부 실시형태에서, FGF-21 폴리펩티드 및/또는 연결된 비 FGF-21 분자는, Huisgen [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 접합되는, 제1 FGF-21 폴리펩티드의 비천연적으로 코딩되는 제1 아미노산의 알킨과 제2 분자의 비천연적으로 코딩되는 제2 아미노산의 아지드를 포함하나 이들에 한정되지 않는, 이량체화를 촉진하기 위한 비천연적으로 코딩되는 상이한 아미노산을 포함한다. 대안으로, 케톤을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 및/또는 연결된 비 FGF-21 분자가 하이드록실아민을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 제2 폴리펩티드에 접합될 수 있으며, 이 폴리펩티드는 상응하는 옥심의 형성을 통해 반응한다.

[0866] 대안으로, 상기 두 FGF-21 폴리펩티드 및/또는 연결된 비 FGF-21 분자는 링커를 통해 연결된다. 임의의 헤테로이 작용성 또는 호모이 작용성 링커가, 동일하거나 상이한 1차 서열을 가질 수 있는 2개의 분자 및/또는 연결된 비 FGF-21 분자를 연결하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우, FGF-21 및/또는 연결된 비 FGF-21 분자를 서로 연결하는 데 사용되는 링커는 이 작용성 PEG 반응제일 수 있다. 이 링커는 다양한 범위의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. FGF-21과 연결된 물질 사이, 또는 FGF-21과 그 수용체 사이, 또는 연결된 물질과 그 결합 파트너(존재할 경우) 사이의 소정의 공간적 관계 또는 입체구조를 제공하기 위해 더 큰 또는 더 작은 분자량의 링커를 사용할 수 있다. FGF-21과 연결된 물질 사이, 또는 연결된 물질과 그 결합 파트너(존재할 경우) 사이에 원하는 공간 또는 유연성을 제공하기 위해 더 긴 또는 더 짧은 분자 길이를 갖는 링커를 사용할 수도 있다.

[0867] 일부 실시형태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 덤벨 구조를 갖는 수용성 이 작용기성 링커를 제공한다: a) 중합체 골격의 적어도 제1 말단 상의 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민 또는 카보닐 함유 부분; 및 b) 중합체 골격의 제2 말단 상의 적어도 제2 작용기. 상기 제2 작용기는 제1 작용기와 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 제2 작용기는 상기 제1 작용기와 반응하지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 분지형 분자 구조로 된 하나 이상의 아암을 포함하는 수용성 화합물을 제공한다. 예를 들어, 상기 분지형 분자 구조는 수지상일 수 있다.

[0868] 일부 실시형태에서, 본 발명은 하기 구조를 갖는 활성화된 수용성 중합체와의 반응에 의해 형성된 하나 이상의 FGF-21 폴리펩티드를 포함하는 다량체를 제공한다:

- [0869] $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$
- [0870] 상기 식에서, n은 약 5~약 3,000이고, m은 2~10이며, X는 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 아미노옥시기, 하이드록실아민, 아세틸, 또는 카보닐 함유 부분이고, R은 X와 동일하거나 상이할 수 있는 캡핑기, 작용기 또는 이탈기이다. R은, 예를 들어 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, N-하이드록시숙신이미딜 에스테르, 1-벤조트리아졸릴 에스테르, N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트, 1-벤조트리아졸릴 카보네이트, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 셀론, 아민, 아미노옥시기, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카복실산, 보호된 카복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설폰, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄 및 케톤으로 구성된 군에서 선택되는 작용기일 수 있다.
- [0871] **XII. FGF-21 폴리펩티드 활성 및 FGF-21 폴리펩티드 수용체에 대한 FGF-21 폴리펩티드의 친화성의 측정**
- [0872] FGF-21은, 본 명세서에서 그 전체를 참고로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2004/0259780호의 실시예 3에 제시된 지방 조직 대사의 연구에 이용된 시험관내 모델인 3T3-L1 지방 세포에서 글루코스 흡수를 촉진하고 인슐린 민감성을 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 제2형 당뇨병의 특징은 지방 조직을 비롯한 각종 조직 유형에 있어서의 글루코스 흡수의 결핍이다. 따라서, FGF-21은 혈중 글루코스 수치를 낮춤으로써 제2형 당뇨병을 치료하는 데 유용하다. 게다가, FGF-21은 더 빠르고 더 효율적인 글루코스 이용에 의해 에너지 소비를 증가시킴으로써 비만을 치료하는 데 유용하다. 또한, FGF-21은 인슐린 의존적 방식으로 3T3-L1 지방 세포에서 글루코스 흡수를 촉진하는 것으로 확인되었는데, 이는 이것이 제1형 당뇨병의 치료에도 유용함을 시사한다. 이와 관련하여 미국 특허 출원 공개 제2004/0259780호를 참조할 수 있다. 미국 특허 출원 공개 제2004/0259780호에서, FGF-21은 최적 이하의 인슐린 농도(5 nM)와 인슐린 부재하에 3T3-L1 지방 세포의 글루코스 흡수를 농도 의존적으로 촉진하는 것으로 확인된다. 또한, FGF-21은, 미국 특허 출원 공개 제2004/0259780호에 기재된 생체의 조직 모델에서 글루코스 흡수를 유도한다.
- [0873] 3T3-L1 지방 세포에서의 글루코스 흡수는 하기 방법을 이용하여 평가할 수 있다. 3T3-L1 세포는, 미국 표준 균주 보존 기관(ATCC, 미국 매릴랜드주 록빌 소재)으로부터 입수한다. 세포를 둘베코 개질 이글 배지 중에 10% 철이 보충된 우태 혈청을 함유하는 배양 배지(GM)에서 배양한다. 표준 지방 세포 분화를 위해, 세포가 컨플루언시(confluency)에 도달(제0일이라 함)한 지 2일 후, 세포를 10% 우태 혈청, 10 µg/ml의 인슐린, 1 µM 텍사메타손 및 0.5 µM 이소부틸메틸크산틴을 함유하는 분화 배지(DM)에 48시간 동안 노출시킨다. 그 후, 세포를 10% 우태 혈청 및 10 µg/ml의 인슐린을 함유하는 분화 후 배지에서 유지한다. 시험관내 효능은 당업자에게 공지되어 있는 글루코스 흡수 분석을 이용하여 측정할 수 있다. 시험관내 효능은 세포에 기초한 분석에서의 FGF-21 화합물의 글루코스 흡수의 척도로서 정의될 수 있으며, 이는 FGF 화합물의 생물학적 효능의 척도이다. 이것은 단일 용량 반응 실험에서 50% 활성을 유발하는 화합물의 유효 농도인 EC₅₀으로서 표현될 수 있다.
- [0874] 0.1 mM 2-데옥시-D-[¹⁴C]글루코스의 측정에 의해 분석되는, 글루코스 수송 분석(인슐린 의존적) 옥탄당 흡수는 다음과 같이 측정된다: 12웰 플레이트의 3T3-L1 지방 세포를, 0.2% BSA를 함유하고 37°C로 가온한 KRP 완충액(136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM NaPO₄, 0.9 mM CaCl₂, 0.9 mM MgSO₄, pH 7.4)으로 2회 세척하고, 0.2% BSA 함유 Leibovitz L-15 배지 중에서 실내 공기에서 37°C로 2시간 동안 항온처리한 후, 0.2% BSA 완충액을 함유하는 KRP로 다시 2회 세척하고, 워트만닌 부재(Me₂SO 단독) 또는 존재하에 0.2% BSA 완충액을 함유하는 KRP 중에서 실내 공기에서 37°C로 30분 동안 항온처리한다. 그 후, 최종 농도가 100 nM이 되도록 15분 동안 인슐린을 첨가하고, 2-데옥시-D-[¹⁴C]글루코스의 흡수를 마지막 4분 동안 측정한다. 모든 값으로부터 10 µM의 사이토칼라신 B 존재하에 측정된 비특이적 흡수를 제한한다. 단백질 농도는 Pierce BCA 분석으로 측정한다. 흡수는 각 실험에 대해 통상적인 방식으로 삼중 또는 사중으로 측정한다. 인슐린 존재하에서의 FGF-21을 사용한 3T3-L1 지방 세포의 급성 및 만성 전처리의 효과를 조사할 수 있다.
- [0875] 글루코스 수송 분석(인슐린 비의존적): 3T3-L1 섬유아세포를 96웰 플레이트에 플레이팅하고 2주 동안 지방 세포로 분화시킨다. 분화 후 이 세포를 무혈청 배지에서 배양하고 FGF-21로 24시간 동안 처리한다. 처리 후, 세포를 0.1% BSA 함유 KRBH 완충액으로 2회 세척한다. 글루코스 흡수는 KRBH 완충액 중의 표지된 글루코스(인슐린 없음) 존재하에 이루어진다. FGF-21은 최적 이하의 인슐린 농도(5 nM)와 인슐린 부재하에 3T3-L1 지방 세포에서의 글루코스 흡수를 농도 의존적으로 촉진하는 것으로 확인되었다(미국 특허 출원 공개 제2004/259780호 참조).

또한, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 생체의 조직 모델에서 글루코스 흡수를 유도할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0876] 생체의 글루코스 수송 모델에서, 글루코스 수송 분석은 다음과 같이 설명된다: 크랩스-헨셀레이트 완충액 저장 용액(Krebs-Henseleit Buffer Stock Solution)-저장 용액 1: NaCl(1.16 M); KCl(0.046 M); KH_2PO_4 (0.0116 M); NaHCO_3 (0.0253 M). 저장 용액 2: CaCl_2 (0.025 M); $\text{MgSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ (0.0116 M). BSA: ICN Cohn 분획 V, 지방산 비함유 BSA를 투석하지 않고 바로 사용함. 매질 제조: 크랩스 저장 용액 1 50 ml를 dH_2O 395 ml에 첨가하고, 95% O_2 /5% CO_2 가스를 1시간 동안 공급한다. 저장 용액 2 50 ml를 첨가하고 dH_2O 로 500 ml로 만든다. ICN 지방산 비함유 BSA 500 mg을 첨가한다. 사전 항온처리 및 항온처리 매질: 32 mM 만니톨, 8 mM 글루코스. 세척 매질: 40 mM 만니톨, 2 mM 피루베이트. 수송 매질: 39 mM 만니톨, 1 mM 2-DG; 32 mM 만니톨, 8 mM 3-O-MG. 인슐린 용액: 최종 농도 2,000 $\mu\text{U/ml}$ 또는 13.3 nM의 (돼지 인슐린[Lilly] 100,000,000 $\mu\text{U/ml}$). 방사능 표지 매질 제조: 사용된 비활성 2DG=1.5 mCi/ml; 3-O-MG=437 $\mu\text{Ci/ml}$; 또는 만니톨=8 $\mu\text{Ci/ml}$. 래트에게 체중 100 g당 0.1 cc의 넵부탈을 주사하여 마취시킨다. 근육 조직을 절제하여 0.9% 염수로 행군 후, 29°C의 사전 항온처리 매질(2 ml)에 1시간 동안 둔다. 근육 조직을 항온처리 매질(2 ml; 인슐린 또는 테스트 화합물을 포함하는 것을 제외하고 사전 항온처리와 동일함)로 옮겨서, 30분 동안 항온처리한다(실험 조건에 따라 달라짐). 그 후, 근육 조직을 세척 매질(2 ml)로 옮겨서 29°C에서 10분 동안 둔 후, 표지 매질(1.5 ml)로 옮겨서 10분(3-O-MG) 또는 20분(2DG) 동안 둔다. 근육 조직을 손질하고 계량하여 드라이아이스 위의 폴리프로필렌 튜브에 넣는다. 이 튜브에 1 N KOH 1 ml를 첨가한 후, 이것을 70°C 수조에 넣어 몇 분마다 튜브를 진탕시키면서 10~15분 동안 둔다. 그 후, 얼음 위에서 튜브를 냉각시키고, 1 N HCl 1 ml를 첨가한 후 잘 혼합한다. 그 후, 상청액 200 μl 를 이중으로 신틸레이션 바이알에 넣어 알려진 방사능 표준 물질과 비교하여 신틸레이션 카운터에서 카운팅한다.

[0877] 수축을 위해, 근육을 먼저 사전 항온처리/항온처리 매질에서 1시간 동안 항온처리한다. 1시간 후, 각 쌍(래트당 한쌍) 중 한쪽 근육을 신틸레이션 장치에 고정하고, 다른 쪽 근육을 새로운 항온처리 매질 플라스크로 옮긴다. 수축된 근육을, 트레이의 각각의 펄스를 0.1 msec로 하여 70 Hz의 200 msec 트레이너로 자극한다. 10~15 V, 1/sec로 사이에 1분간의 휴지기를 두어 10분씩 2회 트레이너를 전달한다. 자극 기간의 후반부에, 자극 장치로부터 근육을 분리하여 세척 매질에 10분 동안 둔 후, 전술한 표지 매질로 옮긴다.

[0878] 상기 FGF 수용체는 당업자에게 공지된 기법 및 방법을 이용하여 제조할 수 있다. FGF-21 폴리펩티드 활성은 표준 또는 공지된 시험관내 또는 생체내 분석을 이용하여 측정할 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 비PEG화 또는 PEG화 FGF-21 폴리펩티드의 경우, 그 수용체에 대한 FGF-21의 친화성은 BIAcore™ 바이오센서(Pharmacia)를 이용하여 측정할 수 있다.

[0879] FGF-21 폴리펩티드를 생성하는 데 어느 방법이 이용되는지에 관계없이, 그 FGF-21 폴리펩티드로 생물학적 활성을 분석할 수 있다. 일반적으로, 생물학적 활성에 대한 테스트는, 원하는 결과, 예컨대, (변형된 FGF-21과 비교하여) 생물학적 활성의 증가 또는 감소, (변형된 FGF-21과 비교하여) 상이한 생물학적 활성, 수용체 또는 결합 파트너 친화성 분석, (변형된 FGF-21과 비교하여) FGF-21 자체 또는 그 수용체의 입체구조 또는 구조 변화에 대한 분석, 또는 혈청 반감기 분석을 제공해야 한다.

[0880] 분석 방법에 대한 상기 참고 문헌들은 총망라된 것이 아니며, 당업자라면 원하는 최종 결과를 위해 테스트하는데 유용한 다른 분석을 이해할 것이다.

[0881] XIII. 효능, 기능성 생체내 반감기 및 약동학적 파라미터의 측정

[0882] 본 발명의 중요한 측면은, FGF-21 폴리펩티드를 수용성 중합체 부분에 접합시키거나 접합시키지 않고서 이 폴리펩티드를 작제하는 것에 의해 생물학적 반감기가 연장된다는 것이다. FGF-21 폴리펩티드의 투여 후 그 혈청 농도가 급속히 감소되는 것은 접합 및 비접합 FGF-21 폴리펩티드 및 그 변이체를 사용한 처리에 대한 생물학적 반응을 평가하는 것을 중요하게 하였다. 본 발명의 접합 및 비접합 FGF-21 폴리펩티드 및 그 변이체는, 예를 들어 피하 또는 정맥내 투여에 의한 투여 후에도 연장된 혈청 반감기를 나타낼 수 있기 때문에, 예를 들어 ELISA법 또는 1차 스크리닝 분석법을 이용한 분석을 가능하게 한다. 상업적 공급업체로부터 입수한 ELISA 또는 RIA 키트가 사용될 수 있다. 생체내 생물학적 반감기의 측정은 본 명세서에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0883] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드의 효능 및 기능성 생체내 반감기는 당업자에게 공지된 프로토콜에 따라 측정할 수 있다.

[0884] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드에 대한 약동학적 파라미터는 정상 스프래그-돌리

수컷 래트(처리군당 동물수 = 5)에서 평가할 수 있다. 래트에게 마리당 25 μ g을 단일 용량으로 정맥 주사하거나 마리당 50 μ g을 단일 용량으로 피하 주사하고, 정해진 시간 경로에 따라, 일반적으로 수용성 중합체에 접합되지 않은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드에 대해서는 약 6시간 동안, 수용성 중합체에 접합되고 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드에 대해서는 약 4일 동안 약 5~7개의 혈액 시료를 취한다. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하지 않은 FGF-21에 대한 약동학적 데이터를, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드에 대해 얻은 데이터와 바로 비교할 수 있다.

[0885] 약동학적 파라미터는 또한 영양류, 예를 들어 사이노몰거스 원숭이에서 평가할 수 있다. 일반적으로, 피하 또는 정맥내로 1회 주사를 투여하며, 혈청 FGF-21 수치를 경시적으로 모니터링한다.

[0886] 본 발명에 따른 FGF-21 폴리펩티드의 비활성은 당업계에 공지된 다양한 분석법으로 측정할 수 있다. 본 발명에 따라 수득하고 정제한 FGF-21 폴리펩티드 뮤테인(mutein) 또는 그 단편의 생물학적 활성은 본 명세서에 기재 또는 인용되었거나 당업자에게 공지된 방법으로 테스트할 수 있다.

[0887] 본 발명의 폴리펩티드는, 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM: 제2형), 인슐린 의존형 당뇨병(제1형)뿐만 아니라, 비만, 부적절한 당 제거율(글루코스 제거율), 고혈당증, 고인슐린혈증 등을 앓고 있는 포유동물을 치료하는 데 사용될 수 있다. FGF-21은 본 명세서에서 전체를 참고로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2004/0259780호에 기재된 바와 같이 당뇨병 및 비만의 동물 모델에 유효하다. 비만 및 당뇨병의 다양한 동물 모델들 간에 대사 프로파일 이 상이하기 때문에, 고인슐린혈증, 고혈당증 및 비만의 효과를 구별하기 위해 복수 모델의 분석을 수행하였다. 당뇨병(db/db) 및 비만(ob/ob) 마우스는 고도 비만, 과식증, 각종 고혈당증, 인슐린 내성, 고인슐린혈증 및 열 발생 장애를 특징으로 한다[Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340]. 그러나, 당뇨병은 db/db 모델에서 훨씬 더 심각하다[Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340]. Zucker(Zucker)(fa/fa) 래트는 고도 비만, 고인슐린혈증 및 인슐린 내성이 있고[Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340], fa/fa 돌연변이는 래트에 있어서 쥐과 db 돌연변이에 상당하는 것일 수 있다[Friedman et al., Cell 69:217-220, 1992; Truett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7806, 1991]. 투비(Tubby)(tub/tub) 마우스는 심각한 고혈당증을 동반하지 않은 비만, 중등도의 인슐린 내성 및 고인슐린혈증을 특징으로 한다[Coleman et al., J. Heredity 81:424, 1990].

[0888] 또한, 화학적으로 유발한 비만에 대한 모노소름 글루타메이트(MSG) 모델[Olney, Science 164:719, 1969; Cameron et al., Cii. Exp. Pharmacol. Physiol. 5:41, 1978](이 모델에서는, 비만이 유전적 모델보다 덜 심각하며 과식증, 고인슐린혈증 및 인슐린 내성없이 발생함)도 조사할 수 있다. 마지막으로, 화학적으로 유발한 당뇨병에 대한 스트렙토조토신(STZ) 모델을 비만이 없을 때의 고혈당증의 영향을 조사하기 위해 테스트할 수 있다. STZ 처리 동물은 인슐린이 부족하며, 고혈당증이 심각하다[Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340].

[0889] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 ob/ob 마우스의 생체내 패혈증 쇼크 모델에서 평가할 수 있다. 이에 대해서는 본 명세서에서 그 전체를 참고로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2005/0176631호를 참조할 수 있다.

[0890] XIV. 투여 및 약학 조성물

[0891] 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질(하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 FGF-21, 합성효소, 단백질 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않음)는, 경우에 따라, 적절한 약학적 담체와 함께(이에 한정되지 않음) 치료적 용도로 사용된다. 이러한 조성물은, 예를 들어 치료적 유효량의 상기 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체 또는 부형제로는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및/또는 이들의 조합을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 이 제제는 투여 방식에 적합하도록 제조된다. 일반적으로, 단백질 투여 방법은 당업자에게 공지되어 있고 본 발명의 폴리펩티드의 투여에 적용될 수 있다.

[0892] 효능 및 조직 대사를 확인하고 투여량을 평가하기 위해, 본 발명의 1종 이상의 폴리펩티드를 포함하는 치료용 조성물을, 경우에 따라, 당업계에 공지된 방법에 준하여 1종 이상의 적절한 시험관내 및/또는 생체내 동물 질환 모델에서 테스트한다. 특히, 투여량은, 즉, 관련 분석에서 측정된, 천연 아미노산 상동체에 대한 본원의 비천연 아미노산의 활성, 안정성 또는 다른 적절한 척도(하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하도록 변형된 FGF-21 폴

리펩티드와 천연 아미노산 FGF-21 폴리펩티드의 비교를 포함하나, 이에 한정되지 않음)에 의해 초기에 결정할 수 있다.

[0893] 투여는 분자를 최종적으로 혈액 또는 조직 세포와 접촉시키는 데 통상적으로 이용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 본 발명의 비천연 아미노산 폴리펩티드는 경우에 따라 1종 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 함께 임의의 적절한 방식으로 투여된다. 본 발명에 있어서 이러한 폴리펩티드를 환자에게 투여하기에 적합한 방법이 이용 가능하고, 특정 조성물을 투여하는 데 하나 이상의 경로를 이용할 수 있지만, 대개 특정 경로가 또 다른 경로보다 더 빠르고 더 효과적인 작용 또는 반응을 제공할 수 있다.

[0894] 약학적으로 허용되는 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물뿐만 아니라, 조성물을 투여하는 데 이용되는 특정 방법에 의해서도 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물로 이루어진 다종 다양한 적절한 제제가 존재한다.

[0895] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 비경구 경로(예를 들어, 피하 또는 정맥 주사 또는 임의의 다른 형태의 주사 또는 주입을 포함하나 이들에 한정되지 않는 주사)를 포함하나 이에 한정되지 않는, 단백질 또는 펩티드에 적합한 임의의 편리한 경로를 통해 투여될 수 있다. 폴리펩티드 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국소, 설하 또는 직장 경로를 포함하나 이들에 한정되지 않는 다수의 경로를 통해 투여될 수 있다. 변형 또는 비변형의 비천연 아미노산 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 리포솜을 통해 투여될 수도 있다. 이러한 투여 경로 및 적절한 제제는 당업자에게 일반적으로 알려져 있다. FGF-21 폴리펩티드는 단독으로, 또는 약학적 담체와 같은 다른 적절한 성분들과 함께 사용될 수 있다. 상기 FGF-21 폴리펩티드는 경구용 당뇨병 치료제를 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 제제들과 함께 사용될 수 있다.

[0896] "당뇨병 치료제"란 용어는 본 명세서에 기재된 임의의 병증, 질병 또는 합병증을 비롯하여 임의의 글루코스 대사 질환, 또는 이의 임의의 합병증을 치료하거나 예방하거나 다른 방식으로 완화시키는 데 유용한 임의의 약물을 의미한다. 당뇨병 치료제로는 인슐린, 티아졸리딘디온, 설폰닐요소, 벤조산 유도체, α-글루코시다제 억제제 등을 들 수 있다. 피험 조성물의 일부일 수 있는 다른 일반 부류의 당뇨병 치료제로는(정의된 용어는 따옴표로 표시함) 미국 약전(official United States Pharmacopoeia) 또는 국가 공인 처방서(official National Formulary)(또는 이것의 임의의 증보)에서 인정하는 "약품(drug article)"; 미국 법률 21편(Title 21 of the United States Code)에서 사용되는 용어로서 미국 FDA에 의해 승인된 "신약" 및 "동물 신약"; 미국 또는 해외의 정부 기관의 승인을 요하는 임의의 약물("승인된 약물"); 21 U.S.C. § 355(a)에 따르면 규제 승인을 얻을 필요가 있는 임의의 약물("규제 승인 약물"); 21 U.S.C. § 379(g) 하에 인체 약물 신청이 이루어졌거나 진행중인 임의의 제제("인체 약물")를 포함한다(이러한 정의와 관련하여 언급된 모든 법령 코드는 본 출원의 최초 출원일 당시의 코드에 해당함). 다른 당뇨병 치료제도 본 명세서에 개시되어 있으며, 당업자에게 알려져 있다. 당업계에 알려져 있는 제2형 당뇨병을 치료하는 데 사용되는 현재의 약물 또는 당뇨병 치료제로는 비구아나이드, 티아졸리딘디온, 설폰닐요소, 벤조산 유도체 및 글루코시다제 억제제를 들 수 있다. 이러한 약물들은 일반적으로 상이한 작용 방식을 갖는다. 비구아나이드, 예를 들어 메트포르민은 과도한 간의 당 신생을 예방하는 것으로 생각된다. 티아졸리딘디온은 말초 글루코스 처리율을 증가시킴으로써 작용하는 것으로 생각된다. 설폰닐요소, 예를 들어 톨부타마이드 및 글리부라이드와, 벤조산 유도체, 예를 들어 레파글리나이드는 인슐린 분비를 촉진함으로써 혈장 글루코스를 낮춘다. α-글루코시다제 억제제는 탄수화물을 대사시키는 α-글루코시다제를 경쟁적으로 억제함으로써 탄수화물 흡수를 지연시키고 식후 고혈당을 감소시킨다. 또한, 인체 사용에 대해 아직 승인을 받지 못한 당뇨병 치료를 위해 제안된 요법도 다수 있다.

[0897] 당업계에 잘 알려져 있는, 당뇨병 및 그 전조 증후군(예컨대 인슐린 내성)의 치료에 사용되는 현재의 약물 또는 당뇨병 치료제는 하기 5개 부류의 화합물, 즉, 비구아나이드, 예를 들어, 메트포르민; 티아졸리딘디온; 설폰닐요소, 예를 들어, 톨부타마이드 및 글리부라이드; 벤조산 유도체, 예를 들어 레파글리나이드; 및 글루코시다제 억제제를 포함한다. 이들 제제 이외에도, DPP-4 억제제를 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 다른 치료제가 글루코스 조절을 향상시키기 위해 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있다. 이러한 당뇨병 치료제 중 일부는 인체 사용에 대해 승인을 받았다. 임상 시험에서 테스트된 선도 DPP-4 화합물은 빌다글립틴(Galvus)(LAF237), 시타글립틴(Januvia), 삭사글립틴 및 알로글립틴을 포함한다. 자누비아(Sitagliptin)는 단독 요법 또는 메트포르민 또는 티아졸리딘디온과의 병용 요법으로 사용하는 것에 대해 2006년 10월 17일에 미국에서 제2형 당뇨병의 치료용으로 승인을 받았다. 1세대 노바티스 화합물 1-[[[2-[(5-시아노피리딘-2-일)아미노]에틸]아미노]아세틸]-2-시아노-(S)-피롤리돈(NVP DPP728)을 제2형 당뇨병 환자(평균 HbA1c 7.4%) 93명에게 4주에 걸쳐 투여하였을 때 4주의 연구 기간 동안 혈장 글루코스, 인슐린 및 HbA1c 수치를 낮추었다[참고 문헌: Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV Improves Metabolic Control Over 4-Week Study Period in Type 2

Diabetes. Diabetes Care. 2002 May;25(5):869-875]. 메트포르민을 투여받은 환자 역시 GLP-1 요법의 실시 후 추가적인 글루코스 저하 이익을 나타내는 것으로 확인되었다[참고 문헌: Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2001 Apr; 24(4):720-5]을 참조할 수 있다. 10명의 비만 비당뇨병 남성 환자의 연구에서, 메트포르민 투여는 경구 글루코스 섭취 후의 순환 GLP-1 수치의 증가와 관련이 있었고, 혼주 인간 혈장을 사용한 실험에서는, 메트포르민(0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$)이 DPP-4 존재 또는 부재하에 37°C에서 30분간 항온처리 후 GLP-1(7-36)아미드의 분해를 현저히 억제하였다. 이 연구 논문의 저자는 메트포르민이 시험관내 및 생체내에서 GLP-1의 효소 분해를 억제할 수 있는 가능성을 제기하였다[참고 문헌: Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. Diabetes Care. 2001 Mar;24(3):489-94]. 시험관내 생화학적 분석을 이용하여, DPP-4 분해와 GLP-1 분해 사이의 관계를 분석한 결과, Demuth 및 그 동료는 다양한 인간 DPP-4 공급원을 사용할 때 메트포르민이 DPP-4 매개 GLP-1 분해에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다[참고 문헌: Metformin Effects on Dipeptidylpeptidase IV Degradation of Glucagon-like Peptide-1. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 15; 291(5):1302-8].

[0898] 당뇨병 치료제로서 유용한 비구아나이드 중에서도, 메트포르민이 특히 성공적인 것으로 입증되었다. 메트포르민(N,N-디메틸이미도디카본이미드 디아미드; 1,1-디메틸비구아나이드; N,N-디메틸비구아나이드; N,N-디메틸디구아나이드; N'-디메틸구아닐구아니딘)은 간에 의한 글루코스 생산을 줄이고 글루코스의 장내 흡수를 줄임으로써 작용하는 당뇨병 치료제이다. 이것은 신체 임의의 부위의 조직의 인슐린 민감성을 향상시키는 것(말초 글루코스 흡수 및 이용을 증가시키는 것)으로 생각된다. 메트포르민은 내당능 장애(IGT) 피험체 및 제2형 당뇨병 피험체에서 내당능을 향상시킴으로써 식전 및 식후 혈당을 떨어뜨린다. 메트포르민은 일반적으로 인슐린 부재하에서는 효과적이지 않다[Bailey, Diabetes Care 15:755-72 (1992)].

[0899] 메트포르민의 효능은 여러 실험에서 확인되었다. 중등도 비만 제2형 당뇨병에 대한 한 연구에서는, 메트포르민 단독 요법 또는 설포닐요소와의 병용 요법 29주 후, HbA1c 수치가 8.6%에서 7.1%로 향상되었다[DeFronzo et al., New Engl. J. Med. 333:541-49 (1995)]. 메트포르민은 또한 혈청 지질에 유리한 효과를 부여하여, 평균 공복 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 수치를 낮추고, 다른 지질 수치에 유해 효과를 나타내지 않았다. 또 다른 실험에서는, 메트포르민이 NIDDM 피험체에서 용량 의존적으로 혈당 조절을 개선시켰다. 14주 후, 매일 투여된 메트포르민 500 mg 및 2,000 mg은 HbA1c를 각각 0.9% 및 2.0% 낮추었다[Garber et al., Am J. Med. 102:491-97 (1997)]. 메트포르민은 또한 인슐린 내성 비당뇨병 환자에 유의한 치료 효과를 제공할 수 있다. 한 연구는, 고혈압 비만 비당뇨병 여성을 메트포르민으로 치료하자 혈압, 공복 및 글루코스 자극 혈장 인슐린 피브리노겐이 감소되었다고 보고하였다[Giugliano et al., Diabetes Care 16:1387-90 (1993)].

[0900] 메트포르민은 일반적으로 메트포르민 HCl로서 투여된다. 이 형태 및 다른 모든 유용한 형태의 메트포르민이 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드와의 병용에 고려된다. 일반적으로, 메트포르민 HCl 또는 임의의 다른 약제를 사용한 당뇨병의 고혈당 치료를 위해서는 고정 용량법이 개별화된다. 용량의 개별화는 유효성 및 내성에 기초하여 이루어지는 한편, 일반적으로 최대 권장 1일 용량이 2,550 mg을 초과하지 않는다.

[0901] 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 고려되는 티아졸리딘디온은 트로글리타존 등을 포함한다. 이러한 화합물은, 예를 들어, 미국 특허 제5,223,522호, 제5,132,317호, 제5,120,754호, 제5,061,717호, 제4,897,405호, 제4,873,255호, 제4,687,777호, 제4,572,912호, 제4,287,200호 및 제5,002,953호; 및 문헌[Current Pharmaceutical Design 2:85-101 (1996)]에 기재된 바와 같이 잘 알려져 있다. 트로글리타존은, 경우에 따라 퍼옥시좀 증식 인자 활성화 수용체- γ (PPAR γ)의 활성화에 의해 글루코스 수송을 증가시키는 경구용 혈당강하제이다. 이러한 활성화에 의해, 트로글리타존은 GLUT4 글루코스 수송체의 발현을 증대시켜, 인슐린 촉진 글루코스 흡수를 증가시킬 수 있다. 트로글리타존은 또한 당 신생 및/또는 당 분해 활성화를 완화시킬 수 있다.

[0902] HbA1c는 환자가 혈당 증가기를 겪을 때 일반적으로 더 높아지는 글리코실화양을 측정하는 혈액 테스트이다. 이 테스트는 환자의 당뇨병 치료 기간 중 마지막 2~3개월의 평가 결과를 제공한다. 트로글리타존 요법에 기인한 당 조절은 HbA1c를 약 1~2% 감소시킨다[Mimura et al., Diabetes Med. 11:685-91 (1994); Kumar et al., Diabetologia 39:701-09 (1996)]. 효과는 치료를 시작한 후 몇 주 동안은 나타나지 않을 수 있다. 트로글리타존은 또한 인슐린 요구량을 줄일 수 있다. NIDDM 환자에서 외인성 인슐린을 사용한 한 실험에서는, 각각 200 mg 및 600 mg 용량의 트로글리타존의 경우 평균 HbA1c가 0.8% 및 1.4% 감소된다. 인슐린 요구량은 최대 29% 줄었다[Schwartz et al., New Engl. J. Med. 338:861-66 (1998)]. 400 mg 및 600 mg의 트로글리타존을 사용한 NIDDM 당뇨병 환자를 대상으로 한 또 다른 연구에서는, 식전 및 식후 글루코스 수치가 감소되었고, 고인슐린혈증 정상 혈당 클램프는 글루코스 이용률이 치료 전 수치보다 약 45% 높았음을 나타내었다[Maggs et al., Ann. Intern.

Med. 128:176-85 (1998)].

- [0903] 한 연구에서, 400 mg의 트로글리타존은 내당능 장애가 있거나 내당능이 정상인 비만 환자에 있어서 글루코스 이용률을 증가시켰다[Nolan et al., New Eng. J. Med 331:1188-93 (1994)]. IGT 및 임신 당뇨병 병력이 있는 여성을 대상으로 한 또 다른 연구에서, 600 mg의 트로글리타존은 인슐린 민감성의 향상 및 순환 인슐린 농도의 강하를 비롯하여 인슐린 항상성을 개선시켰으나, 내당능에는 변화가 없었다[Berkowitz et al., Diabetes 45:172-79 (1996)]. 티아졸리딘디온은 NIDDM 위험 집단, 예컨대 PCOS 또는 GDM이 있는 여성에서 NIDDM의 개시를 예방 또는 지연시키는 데 사용될 수 있다[미국 특허 제5,874,454호]. 단독으로 사용될 때의 트로글리타존의 유효량은 1일 용량당 약 10 mg~약 800 mg이며, 같은 정도의 범위가 본 발명에서의 사용에 고려된다. 메트포르민과 함께 사용하는 것에 더하여, 트로글리타존은 인슐린 및 설포닐요소 제제와 함께 사용될 수 있다[참고 문헌: 미국 특허 제5,859,037호].
- [0904] 설포닐요소는 일반적으로 췌장으로부터의 인슐린 방출을 증가시켜 혈장 글루코스를 낮춤으로써 작용한다. 구체적으로, 설포닐요소는 ATP 민감성 칼슘 채널을 차단함으로써 작용한다. 설포닐요소 글리메피라이드는 또한 GLUT4 수송체를 자극함으로써 인슐린 민감성을 증가시킬 수 있다. 설포닐요소는 일반적으로 HbA1c가 8%보다 높을 때 처방된다[참고 문헌: 미국 특허 제5,258,185호, 제4,873,080호].
- [0905] 설포닐요소는 당업계에 잘 알려진, 예를 들어 미국 특허 제3,454,635호, 제3,669,966호, 제2,968,158호, 제3,501,495호, 제3,708,486호, 제3,668,215호, 제3,654,357호 및 제3,097,242호에 기재된 화합물 부류이다. 본 발명의 특정 실시형태에서 사용하기 위한 것으로 고려되는 대표적인 설포닐요소(일반적인 1일 용량을 괄호 안에 표시함)는 아세토헥사마이드(약 250 mg~약 1,500 mg), 클로로프로파미드(약 100 mg~약 500 mg), 톨라지마이드(약 100 mg~약 1,000 mg), 톨부타마이드(약 500 mg~약 3,000 mg), 글리클라자이드(약 80 mg~약 320 mg), 글리피자이드(약 5 mg~약 40 mg), 글리피자이드 GITS(약 5 mg~약 20 mg), 글리부라이드(약 1 mg~약 20 mg), 미분화된 글리부라이드(약 0.75 mg~약 12 mg), 글리메피라이드(약 1 mg~약 8 mg), AG-EE 623 ZW 등을 포함한다. 글리메피라이드는 이 부류에서 인슐린과의 병용이 승인된 첫 번째 당뇨병 치료제로서 그 사용과 관련된 저혈당 위험이 적을 수 있다.
- [0906] 당뇨병을 치료 및/또는 예방하기 위해, 다양한 α -글루코시다제 억제제가 본 발명에 사용될 수 있다. 이러한 억제제는 탄수화물을 대사시키는 α -글루코시다제를 경쟁적으로 억제함으로써, 탄수화물 흡수를 지연시키고 식후 고혈당을 완화시킨다[Clissod et al., Drugs 35:214-23 (1988)]. 글루코스 감소는 HbA1c 수치 감소를 통해 나타날 수 있다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 것으로 고려되는 대표적인 α -글루코시다제 억제제로는 아카보스, 미글리톨 등을 포함한다. 아카보스 및 미글리톨 양자의 유효 투여량은 1일당 약 25 mg~약 300 mg이다.
- [0907] α -글루코시다제 억제제는 설포닐요소와 병용하여 본 발명의 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있다. 설포닐요소만과 병용되는 α -글루코시다제 억제제는 HbA1c 수치를 일반적으로 약 0.5~1.0% 감소시키는 것으로 확인되었다. 또한, α -글루코시다제 억제제는 식후 혈당 상승을 줄이는 데 효과적인 것으로 확인되었다[Lefevre et al., Drugs 44:29-38 (1992)].
- [0908] 당뇨병을 치료 및/또는 예방하기 위해, 다양한 벤조산 유도체가 본 발명의 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있다. 메글리타나이드로도 알려진 이러한 제제는 인슐린 분비능이 있는 비설포닐요소 혈당강하제이다. 예를 들어, 레글리나이드는 췌장 베타 세포의 ATP 민감성 칼슘 채널에 결합함으로써 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 생각된다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 것으로 고려되는 대표적인 벤조산 유도체로는 레파글리나이드 등을 들 수 있다. 레파글리나이드의 경우, 유효 1일 용량이 약 0.5 mg~약 16 mg일 수 있으며, 이 제제는 매끼 식사 전에 복용될 수 있다.
- [0909] 수많은 제제가 현재 인간의 잠재적 당뇨병 치료제로서 연구되고 있다. 이러한 제제들 중 임의의 것이, 이들이 치료 용도에 이용 가능하게 된다면, 대사 질환, 특히 당뇨병의 치료 및/또는 예방을 위해 본 발명의 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있다.
- [0910] 당뇨병 치료제의 또 다른 부류는, 본 발명의 또 다른 실시형태에서 혈중 글루코스를 조절하기 위해 변형된 FGF-21 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I(CPT-I)의 억제제, 예컨대 에토목시어이다. 에토목시어는 지방산 산화에 필요한 카르니틴 팔미토일-트랜스퍼라제 I을 가역적으로 억제한다. 이러한 억제제는 공복 고혈당증을 감소시킬 수 있는데, 왜냐하면 지방산 산화 생성물이 간의 당 신생을 촉진하기 때문이다. 에토목시어는 제2형 당뇨병에서 인슐린 감수성을 개선시킬 수 있다[Hubinger et al., Hormone Metab. Res. 24:115-18 (1992)].

- [0911] 다른 공지된 당뇨병 치료제로는 인슐린 제제(예를 들어, 소 및 돼지의 췌장으로부터 추출된 동물 인슐린 제제; 에스케리치아 콜라이, 효모를 사용하여 유전적으로 합성한 인간 인슐린 제제; 아연 인슐린; 프로타민 아연 인슐린; 인슐린의 단편 또는 유도체(예를 들어, INS-1), 경구용 인슐린 제제), 인슐린 감작제(예를 들어, 피오글리타존 또는 그 염(바람직하게는 염산염), 로시글리타존 또는 그 염(바람직하게는 말레산염), 네토글리타존, 리보글리타존(CS-011), FK-614, WO 01/38325에 기재된 화합물, 테사글리타자(AZ-242), 라가글리타자(N,N-622), 무라글리타자(BMS-298585), 에다글리타존(BM-13-1258), 메타글리타센(MBX-102), 나베글리타자(LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921, α -글루코시다제 억제제(예를 들어, 보글리보스, 아카보스, 미글리톨, 에미글리테이트 등), 비구아나이드(예를 들어, 펜포르민, 메트포르민, 부포르민 또는 이들의 염(예를 들어, 염산염, 푸마르산염, 숙신산염)), 인슐린 분비 증강제[설포닐요소(예를 들어, 톨부타마이드, 글리벤클라마이드, 글리클라자이드, 클로르프로파마이드, 톨라자마이드, 아세토헥사마이드, 글리클로피라마이드, 글리메피라이드, 글리피자이드, 글리부졸), 레파글리나이드, 나테글리나이드, 미티글리나이드 또는 이들의 칼슘염 수화물], 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제(예를 들어, 비다글립틴(LAF237), P32/98, 시타글립틴(MK-431), P93/01, PT-100, 삭사글립틴(BMS-477118), T-6666, TS-021), β 3 효현제(예를 들어, AJ-9677), GPR40 효현제, 글루카곤 유사 폴리펩티드 (I)(glp I), (glp2), 또는 다른 당뇨병 유발성 펩티드 호르몬, GLP-1 수용체 효현제(예를 들어, GLP-1, GLP-1MR 제제, N,N-2211, AC-2993(엑센딘-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH.sub.2, CJC-[131], 아밀린 효현제(예를 들어, 프람린타이드), 포스포타이로신 포스포타제 억제제(예를 들어, 바나드산나트륨), 당신생 억제제(예를 들어, 글리코겐 포스포릴라제 억제제, 글루코스-6-포스포타제 억제제, 글루카곤 길항제), SGLUT(나트륨-글루코스 공수송체) 억제제(예를 들어, T-1095), 11β -하이드록시스테로이드 탈수소효소 억제제(예를 들어, BVT-3498), 아디포넥틴 또는 그 효현제, IKK 억제제(예를 들어, AS-2868), 랩틴 내성 개선제, 소마토스타틴 수용체 효현제(WO 01/25228, WO 03/42204, WO 98/44921, WO 98/45285, WO 99/2273.5 등에 기재된 화합물), 글루코키나제 활성화제(예를 들어, R.sup.o-28-1675), GIP(글루코스 의존적 인슐린 분비 펩티드) 등을 들 수 있다.
- [0912] 비천연 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를, 단독으로 또는 다른 적절한 성분들과 함께, 흡입 투여를 위한 에어로졸 제제(즉, 이것은 "분무"될 수 있음)로 제조할 수 있다. 에어로졸 제제는 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 적절한 압축 추진제 중에 함유될 수 있다.
- [0913] 예를 들어, 관절내(관절 안), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내 및 피하 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충액, 정균제와, 제제가 해당 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의 등장성 멸균 주사액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. FGF-21의 제제는 앰플 및 바이알과 같이 단회 투여 또는 다회 투여용 밀봉 용기로 제공될 수 있다.
- [0914] 비경구 투여 및 정맥내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 특히, 현재 사용되고 있는 제제와 함께, 천연 아미노산 상동체 치료제에 대해 이미 이용되고 있는 투여 경로(EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, 인터루킨, 항체, FGF 및/또는 임의의 다른 약학적으로 전달되는 단백질에 대해 일반적으로 이용되는 투여 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않음)가 본 발명의 폴리펩티드에 대한 바람직한 투여 경로 및 제제를 제공한다.
- [0915] 본 발명에 있어서, 환자에게 투여되는 투여량은 시간이 경과함에 따라 환자에게 유익한 치료 반응을 나타내거나 용도에 따라 다른 적절한 활성을 나타내기에 충분하다. 투여량은 특정 벡터 또는 제제의 효과, 사용된 비천연 아미노산 폴리펩티드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기 및 환자의 상태뿐만 아니라, 치료 대상 환자의 체중 또는 체표면적에 의해 결정된다. 또한, 투여량의 크기는 특정 환자에 있어서의 특정 벡터, 제제의 투여에 동반되는 임의의 유해 부작용의 존재, 성질 및 정도 등에 의해 결정된다.
- [0916] 질환(암, 유전 질환, 당뇨병, AIDS 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음)의 치료 또는 예방을 위해 투여되는 벡터 또는 제제의 유효량을 결정함에 있어서, 의사는 순환 혈장 수치, 제제의 독성, 질환의 진행도, 및/또는 관련이 있는 경우, 항 비천연 아미노산 폴리펩티드 항체의 생성을 평가한다.
- [0917] 예를 들어, 체중 70 kg의 환자에게 투여되는 투여량은, 일반적으로, 해당 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 맞추어 조정된, 현재 사용되는 치료용 단백질의 투여량과 등가의 범위 내에 있다. 본 발명의 벡터 또는 약학 제제는 항체 투여, 백신 투여, 세포 독성제의 투여, 천연 아미노산 폴리펩티드의 투여, 핵산의 투여, 뉴클레오타이드 유사체의 투여, 생물학적 반응 변경제의 투여 등을 비롯한 임의의 공지된 통상의 치료법에 의해 치료 조건을 보충할 수 있다.

- [0918] 투여에 있어서, 본 발명의 제제는 해당 제형의 LD₅₀ 또는 ED₅₀, 및/또는 다양한 농도(예를 들어 환자의 체중 및 환자의 전반적인 건강 상태에 맞게 조정되는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음)에서의 비천연 아미노산 폴리펩티드의 임의의 부작용의 관찰에 의해 결정된 비율로 투여된다. 투여는 단회 투여 또는 분할 투여를 통해 이루어질 수 있다.
- [0919] 제제를 주입받고 있는 환자가 발열, 오한 또는 근육통을 보일 경우, 적정량의 아스피린, 이부프로펜, 아세트아미노펜 또는 다른 통증/발열 억제 약물을 투여한다. 발열, 근육통 및 오한과 같은 주입에 대한 반응을 보이는 환자에게는, 후속 주입 30분 전에 아스피린, 아세트아미노펜, 또는 디펜하이드라민을 포함하나 이들에 한정되지 않는 약물을 미리 투여한다. 해열제 및 항히스타민제에 빠르게 반응하지 않는 보다 심한 오한 및 근육통에 대해서는 메페리딘을 사용한다. 반응의 중증도에 따라 세포 주입을 늦추거나 중단한다.
- [0920] 본 발명의 인간 FGF-21 폴리펩티드를 포유동물 피험체에게 직접 투여할 수 있다. 투여는 FGF-21 폴리펩티드를 피험체에 도입하는 데 통상적으로 이용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 본 발명의 실시형태에 따른 FGF-21 폴리펩티드 조성물은 경구, 직장, 국소, 흡입(에어로졸을 이용하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음), 협측(설하를 포함하나 이에 한정되지 않음), 질내, 비경구(피하, 근육내, 피내, 관절내, 흉막강내, 복강내, 뇌내, 동맥내 또는 정맥내 경로를 포함하나 이들에 한정되지 않음), 국소(즉, 피부 및 기도 표면을 비롯한 점막 표면 모두) 및 경피 투여에 적합한 것들을 포함하나, 임의의 주어진 경우에 있어서 가장 적합한 경로는 치료 대상 상태의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 투여는 국소 또는 전신 투여일 수 있다. 화합물의 제제는 앰플 및 바이알과 같은 단회 투여 또는 다회 투여용의 밀봉 용기로 제공될 수 있다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 단위 제형의 주사제 형태(용액제, 현탁제 또는 에멀션제를 포함하나, 이들에 한정되지 않음)로 혼합물로 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 연속 주입(삼투압 펌프와 같은 미니펌프를 포함하나 이에 한정되지 않음), 단일 볼루스 또는 서방형 데포 제제에 의해 투여될 수 있다.
- [0921] 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제를 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의 등장성 멸균 용액과, 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 용액 및 현탁액은 이미 알려진 유형의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0922] 동결 건조는, 관심있는 단백질 제제로부터 물을 제거하는 역할을 하는, 단백질의 제공에 통상적으로 이용되는 기법이다. 동결 건조 또는 냉동 건조는 건조시키고자 하는 물질을 먼저 동결시킨 후 진공 환경하에 승화로 얼음 또는 동결된 용매를 제거하는 공정이다. 동결 건조 과정 동안 안정성을 향상시키고 저장시 동결 건조된 제품의 안정성을 개선시키기 위해 동결 건조 전 제제에 부형제를 포함시킬 수 있다[Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) and Arakawa et al., Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)].
- [0923] 약제의 분무 건조 역시 당업자에게 공지되어 있다. 이에 관해서는, 예를 들어 문헌[Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm., 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992)]을 참조할 수 있다. 소분자 약제 이외에도, 다양한 생물학적 물질이 분무 건조되었으며 여기에는 효소, 혈청, 혈장, 미생물 및 효모가 포함된다. 분무 건조는 1 단계 공정으로 액상 약학 제제를 미세한 미분진 또는 과립 분말로 전환할 수 있기 때문에 유용한 기법이다. 기본적인 기법은 하기 4 단계를 포함한다: a) 공급 용액을 분무하여 분무물로 만드는 단계; b) 분무물과 공기를 접촉시키는 단계; c) 분무물을 건조시키는 단계; 및 d) 건조된 생성물을 건조 공기로부터 분리하는 단계. 본원에서 참고로 인용되는 미국 특허 제6,235,710호 및 제6,001,800호에는 분무 건조에 의한 재조합 에리스로포이에틴의 제조 방법이 기재되어 있다.
- [0924] 본 발명의 약학 조성물 및 제제는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물과, 조성물을 투여하는 데 이용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물(임의적인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함함)로 이루어진 다종 다양한 적절한 제제가 존재한다[참고 문헌: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985].
- [0925] 적절한 담체로는 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 바이카보네이트 및 다른 유기산을 함유하는 완충액; 아스코르브산을 포함하나 이에 한정되지 않는 항산화제; 저분자량의 폴리펩티드(약 10개 미만의 잔기를 갖는 폴리펩티드를 포함하나 이에 한정되지 않음); 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린을 포함하나 이들에 한정되지 않는 단백질; 폴리비닐피롤리돈을 포함하나 이에 한정되지 않는 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 히스티딘 또는 히스티딘 유도체, 메티오닌, 글

루타메이트 또는 라이신을 포함하나 이들에 한정되지 않는 아미노산; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물(트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하나 이들에 한정되지 않음); EDTA 및 에텐테이트 디소듐을 포함하나 이들에 한정되지 않는 킬레이트제; 아연, 코발트 또는 구리를 포함하나 이들에 한정되지 않는 2가 금속 이온; 만니톨 또는 솔비톨을 포함하나 이들에 한정되지 않는 당 알코올; 나트륨 및 염화나트륨을 포함하나 이들에 한정되지 않는 염 형성성 반대 이온; 및/또는 Tween™ [Tween 80(폴리솔베이트 80) 및 Tween 20(폴리솔베이트 20)을 포함하나, 이들에 한정되지 않음], Pluronic™ 및 다른 플루론산[플루론산 F68(폴록사머 188)을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 플루론산을 포함하나 이들에 한정되지 않음] 또는 PEG를 포함하나 이들에 한정되지 않는 비이온성 계면활성제를 들 수 있다. 적합한 계면활성제로는, 예를 들어 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드), 즉 (PEO-PPO-PEO), 또는 폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드), 즉 (PPO-PEO-PPO)에 기초한 폴리에테르 또는 이들의 조합을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. PEO-PPO-PEO 및 PPO-PEO-PPO는 상표명 Pluronic™, R-Pluronic™, Tetronics™ 및 R-Tetronics™(미국 미시건주 와이언도트 소재의 BASF Wyandotte Corp. 제품)로 시판되며, 또한 본원에 그 전체가 참고로 인용되는 미국 특허 제4,820,352호에 추가로 기재되어 있다. 다른 에틸렌/폴리프로필렌 블록 중합체도 적절한 계면활성제일 수 있다. 계면활성제 또는 이의 조합을 사용하여, 교반으로 인해 발생하는 스트레스를 포함하나 이에 한정되지 않는 1종 이상의 스트레스로부터 PEG화된 FGF-21를 안정화시킬 수 있다. 상기 물질들 중 일부 물질은 증량제(bulking agent)로 불리기도 한다. 또한, 일부 물질은 "장성 조절제"로 불리기도 한다. 항균 보존제도 제품 안정성 및 항균 효능을 위해 사용될 수 있고; 적합한 보존제로는 벤질 알코올, 벤즈알코늄 클로라이드, 메타크레솔, 메틸/프로필 파라벤, 크레솔 및 페놀, 및 이들의 조합을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0926] PEG와 같은 수용성 중합체에 연결된 것들을 비롯한 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 서방형 시스템 또는 이의 일부에 의해 투여될 수도 있다. 서방형 조성물은 필름 또는 마이크로캡슐을 포함하나 이들에 한정되지 않는 성형품 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 서방형 매트릭스는 생체적합성 물질, 예컨대 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)[Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)], 에틸렌 비닐 아세테이트[Langer et al., supra] 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산[유럽 특허 제133,988호], 폴리락티드(폴리락트산)[미국 특허 제3,773,919호; 유럽 특허 제58,481호], 폴리글리콜리드(글리콜산의 중합체), 폴리락티드 코-글리콜리드(락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물(polyanhydride), L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체[Sidman et al., Biopolymers, 22, 547-556 (1983)], 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산, 콜라겐, 콘트로이틴 설페이트, 카복실산, 지방산, 인지질, 폴리사카라이드, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예컨대 페닐알라닌, 타이로신, 이소루신, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 또한, 서방형 조성물은 리포솜에 봉입된 화합물을 포함한다. 이 화합물을 함유하는 리포솜은, 독일 특허 제3,218,121호; 문헌[Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:3688-3692 (1985)]; 문헌[Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4030-4034 (1980)]; 유럽 특허 제52,322호; 유럽 특허 제36,676호; 미국 특허 제4,169,794호; 유럽 특허 제143,949호; 미국 특허 제5,021,234호; 일본 특허 출원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 유럽 특허 제102,324호에 기재된 방법에 의해 제조된다. 인용된 모든 참고 문헌 및 특허 문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0927] 리포솜에 봉입된 FGF-21 폴리펩티드는, 예를 들어 독일 특허 제3,218,121호; 문헌[Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:3688-3692 (1985)]; 문헌[Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4030-4034 (1980)]; 유럽 특허 제52,322호; 유럽 특허 제36,676호; 미국 특허 제4,169,794호; 유럽 특허 제143,949호; 미국 특허 제5,021,234호; 일본 특허 출원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 유럽 특허 제102,324호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 리포솜의 조성 및 크기는 잘 알려져 있거나 당업자가 실험적으로 쉽게 결정할 수 있다. 리포솜의 몇 가지 예가, 예를 들어 문헌[Park JW, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331 (1995)]; 문헌[Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998)]; 문헌[Drummond DC, et al., Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002)]; 문헌[Park JW, et al., Clin. Cancer Res. 8:1172-1181 (2002)]; 문헌[Nielsen UB, et al., Biochim. Biophys. Acta 1591 (1-3):109-118 (2002)]; 문헌[Mamot C, et al., Cancer Res. 63:3154-3161 (2003)]에 기재되어 있다. 인용된 모든 참고 문헌 및 특허 문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0928] 본 발명에서 환자에게 투여되는 투여량은 시간이 경과함에 따라 피험체에서 유익한 반응을 유발하기에 충분해야

한다. 일반적으로, 1회 투여당 비경구로 투여되는 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 총 약학적 유효량은 약 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ ~약 100 $\mu\text{g/kg/일}$, 또는 환자 체중 기준으로 약 0.05 mg/kg~약 1 mg/kg이나, 이 양은 치료적 판단에 좌우된다. 또한, 투여 빈도 역시 치료적 판단에 달려 있지만, 인체 사용에 대해 승인된 시판되는 FGF-21 폴리펩티드보다 투여 빈도보다 더 적거나 더 많을 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 PEG화 FGF-21 폴리펩티드는 전술한 투여 경로 중 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0929]

일부 실시형태에서, 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 당뇨병 치료제의 효과를 조절한다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 당뇨병 치료제와 동시에 투여될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 당뇨병 치료제로 치료하기 전에 투여될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 당뇨병 치료제로 치료한 후 투여될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 메트포르민과 함께 투여된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드 및 메트포르민을 사용한 치료는 인슐린 존재 또는 부재하에 혈장 글루코스를 조절하는 메트포르민의 능력을 증가시킨다. 병용 요법에서, 메트포르민은 설폰닐요소, α -글루코시다제 억제제, 트로글리타제온 및 인슐린과 함께 사용되어 왔다. 설폰닐요소와 병용되는 메트포르민은 인슐린 민감성을 증가시키며 혈장 글루코스를 낮출 수 있다. 대안으로, 레파글리나이드와 병용되는 메트포르민은 글리피자이드보다 더 효과적일 수 있으며, 수개월 동안 당 조절을 유지함에 있어서 적어도 글리부라이드만큼 효과적이다. 트로글리타존과 병용되는 메트포르민은 과잉량의 어느 한 제제만 사용되는 경우의 글루코스 조절을 개선시킨다[Inzucchi et al., New. Eng. J. Med. 338:867-72 (1998)]. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 클로토 베타와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타 및 당뇨병 치료제와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 당뇨병 치료제와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 하기 물질 중 1종 이상과 함께 사용된다: 타우린, 알파 리포산, 오디 추출물, 크롬, 글루타민, 에인코스테마 리토레일 블루메(*Encicostemma littorale* Blume), 스코파리아 둘시스(*Scoparia dulcis*), 타라곤(*Tarragon*) 추출물 및 안드로그래피스 파니쿨라타(*Andrographis paniculata*). 일부 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 하기 물질 중 1종 이상과 함께 사용된다: 인슐린 제제(예를 들어, 소 및 돼지의 췌장으로부터 추출된 동물 인슐린 제제; 에스케리치아 콜라이, 효모를 사용하여 유전적으로 합성한 인간 인슐린 제제; 아연 인슐린; 프로타민 아연 인슐린; 인슐린의 단편 또는 유도체(예를 들어, INS-1), 경구용 인슐린 제제), 인슐린 감작제(예를 들어, 피오글리타존 또는 그 염(바람직하게는 염산염), 로시글리타존 또는 그 염(바람직하게는 말레산염), 네토글리타존, 리보글리타존(CS-011), FK-614, WO 01/38325에 기재된 화합물, 테사글리타자(AZ-242), 라가글리타자(N,N-622), 무라글라티자(BMS-298585), 에다글리타존(BM-13-1258), 메타글리다센(MBX-102), 나베글리타자(LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921, α -글루코시다제 억제제(예를 들어, 보글리보스, 아카보스, 미글리톨, 에미글리테이트 등), 비구아나이드(예를 들어, 펜포르민, 메트포르민, 부포르민 또는 이들의 염(예를 들어, 염산염, 푸마르산염, 숙신산염)), 인슐린 분비 증강제[설폰닐요소(예를 들어, 톨부타마이드, 글리벤클라마이드, 글리클라자이드, 클로르프로파마이드, 톨라자마이드, 아세토헥사마이드, 글리클로피라마이드, 글리페피라이드, 글리피자이드, 글리부졸), 레파글리나이드, 나테글리나이드, 미티글리나이드 또는 이들의 칼슘염 수화물], 디펩티딜 펩티다제 IV 억제제(예를 들어, 비다글립틴(LAF237), P32/98, 시타글립틴(MK-431), P93/01, PT-100, 삭사글립틴(BMS-477118), T-6666, TS-021), β 3 효현제(예를 들어, AJ-9677), GPR40 효현제, 글루카곤 유사 폴리펩티드 (I)(glp I), (glp2), 또는 다른 당뇨병 유발성 펩티드 호르몬, GLP-1 수용체 효현제(예를 들어, GLP-1, GLP-1MR 제제, N,N-2211, AC-2993(엑센딘-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1(7,37)NH.sub.2, CJC-[131], 아밀린 효현제(예를 들어, 프람린타이드), 포스포타이로신 포스파타제 억제제(예를 들어, 바나드산나트륨), 당 신생 억제제(예를 들어, 글리코겐 포스포릴라제 억제제, 글루코스-6-포스파타제 억제제, 글루카곤 길항제), SGLUT(나트륨-글루코스 공수송체) 억제제(예를 들어, T-1095), 11β -하이드록시스테로이드 탈수소효소 억제제(예를 들어, BVT-3498), 아디포넥틴 또는 그 효현제, IKK 억제제(예를 들어, AS-2868), 랩틴 내성 개선제, 소마토스타틴 수용체 효현제(WO 01/25228, WO 03/42204, WO 98/44921, WO 98/45285, WO 99/2273.5 등에 기재된 화합물), 글루코키나제 활성화제(예를 들어, R.sup.o-28-1675), GIP(글루코스 의존적 인슐린 분비 펩티드).

[0930]

일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 타우린, 알파 리포산, 오디 추출물, 크롬, 글루타민, 에인코스테마 리토레일 블루메, 스코파리아 둘시스, 타라곤 추출물 및 안드로그래피스 파니쿨라타를 포함하나 이들에 한정되지 않는 인슐린 작용 증강제와 함께 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 인슐린의 분비 또는 활성을 추가로 증강시키기 위해 이소말트, 트레할로스 또는 D-만노스 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 인슐린 작용 증강제 및 본 발명의 폴리펩티드는 또 다른 당뇨병 치료제에 추가하여 사용된다.

[0931] 본 발명의 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 포함하는 병용 요법의 치료 효능을 결정할 수 있는 한 가지 방법은 환자의 HbA1c 수치를 감소시키는 것에 의한 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 사용한 치료를 시작하기 2개월 전 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 사용한 치료를 시작하기 3개월 전의 HbA1c 수치로부터, 또는 기저값으로부터의 퍼센트 변화로, 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 적어도 50%의 변화만큼 HbA1c 수치를 낮춘다. 또 다른 실시형태에서, 당뇨병 치료제로도 치료하고 있는 환자에게 투여되는 본 발명의 폴리펩티드는 혈중 글루코스를 낮추는 당뇨병 치료제의 능력을 조절한다. 또 다른 실시형태에서, 당뇨병 치료제로도 치료하고 있는 환자에게 투여되는 본 발명의 폴리펩티드는, 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 사용한 치료를 시작하기 2개월 전 또는 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 사용한 치료를 시작하기 3개월 전의 HbA1c 수치로부터, 또는 기저값 또는 치료 전 기저값으로부터의 퍼센트 변화로, 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 적어도 50%의 변화만큼 HbA1c 수치를 낮춘다.

[0932] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 인슐린 요구량을 감소시키는 트로글리타존의 능력을 조절한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 변형된 FGF-21 폴리펩티드는, 트로글리타존을 사용하여 치료하고 있는 환자에게 투여될 때 상기 환자의 인슐린 요구량을 추가로 감소시킨다. 본 발명과 함께 사용되는 트로글리타존은 본 발명의 특정 실시형태에서 제2형 당뇨병을 지연 또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0933] 본 발명의 일 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 설포닐요소와 동시에 투여된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 설포닐요소를 사용한 치료 전에 투여된다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 변형된 FGF-21 폴리펩티드는 설포닐요소를 사용한 치료 후에 투여된다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 치료량의 변형된 FGF-21 폴리펩티드를 사용한 치료는 혈청 글루코스를 조절한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 함께 투여되고, 이는 혈중 글루코스에 대한 상기 폴리펩티드의 효과를 조절한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 클로토 베타와 함께 투여되고, 이는 변형된 FGF-21 폴리펩티드만을 사용하는 경우보다 더 많이 혈중 글루코스를 감소시킨다. 또 다른 실시형태에서, 이러한 변화는 HbA1c 테스트를 이용하여 측정한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드와 클로토 베타는 당뇨병 치료제로 치료 중인 환자에게 투여되고, 이는 당뇨병 치료제만을 사용하는 경우보다 더 많이 혈중 글루코스를 감소시킨다.

발명의 효과

[0934] **XV. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 치료적 용도**

[0935] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 다양한 질환의 치료에 유용하다.

[0936] 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM: 제2형), 인슐린 의존형 당뇨병(제1형)뿐만 아니라, 비만, 부적절한 당 제거율, 고혈당증, 고인슐린혈증, 및 FGF-21에 의해 매개될 수 있는 임의의 다른 질환 또는 병증을 앓고 있는 포유동물의 치료에 사용될 수 있다. 당불내성은 글루코스에 대한 민감성이 특이한 것으로 정의될 수 있다. 고혈당증은 혈중 과잉 당(글루코스)으로서 정의된다. 고인슐린혈증은 혈중 인슐린 수치가 정상 수치보다 높은 것으로서 정의된다. 인슐린 내성은 정상량의 인슐린이 정상에 못미치는 생물학적 반응을 유발하는 상태로 정의된다. 인간 피험체에 있어서의 비만은, 특정 집단의 이상적인 체중보다 체중이 20% 더 많이 나가는 것으로 정의될 수 있다[R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916].

[0937] 당뇨병은 임상적 징후에 기초하여 크게 2개의 군, 즉, 인슐린 비의존형 또는 성숙기 개시형(제2형이라고도 함) 당뇨병; 및 인슐린 의존형 또는 소아기 개시형(제1형이라고도 함) 당뇨병으로 분류된다. 임상적으로, 제2형 성숙기 개시형 당뇨병 환자의 대부분이 비만이며, 질병의 임상적 증상의 발현이 일반적으로 40세 이상에서 나타난다. 이와는 대조적으로, 제1형 소아기 개시형 당뇨병 환자는 그 연령 및 신장에 비해 과체중이 아니며, 제1형 당뇨병이 어느 연령대에서도 발생할 수 있는 것과는 달리, 어린 나이에, 대개 30세 이전에 질병이 조기 발생한다.

[0938] 당뇨병은 일반 집단에서의 발병률이 약 1%인 인간의 대사 질환으로서, 그 중 1/4이 제1형이다[Foster, D. W., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chap. 114, pp. 661-678, 10th Ed., McGraw-Hill, New York]. 이 질환은 그 자체가, 결국 눈, 신장, 신경 및 혈관을 비롯한 몇몇 장기에 영향을 주는 심각한 장기적 쇠약 합병증을 초래하게 되는 일련의 호르몬 유발성 대사 이상으로서 나타난다. 병리학적으로, 이 질환은 전자 현미경으로 관찰이 가능한 기저막의 병변을 특징으로 한다.

- [0939] 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM: 제2형)은 높은 순환 혈중 글루코스, 인슐린 및 코르티코스테로이드 수준을 특징으로 하는 쇠약 질환이다. 제2형 당뇨병의 발병률은 높은데다가 증가하고 있고 전세계적으로 사망률, 발병률 및 보건 의료 비용의 주요 원인이 되고 있다[Amos et al., Diabetic Med. 14:S1-85, 1997].
- [0940] 제2형 당뇨병의 원인은 잘 이해되어 있지 않다. 제2형 당뇨병은 인슐린을 이용할 수 있음에도 불구하고 글루코스 생산이 과도한 것을 특징으로 하며, 부적절한 당 제거율로 인해 순환 글루코스 수준이 지나치게 높게 유지된다. 인슐린 작용에 대한 표적 조직의 내성과 감소된 인슐린 분비("β 세포 장애")가 둘 다 발생하는 것으로 생각된다. 글루코스 항상성을 위한 주요 인슐린 반응성 조직은, 간(여기서 인슐린은 글리코겐 합성을 촉진하고 당 신생을 억제함), 근육(여기서 인슐린은 글루코스 흡수를 촉진하고 글리코겐은 글루코스 흡수를 촉진하며 지질 분해를 억제함)이다. 따라서, 당뇨병증의 결과로서, 혈중 글루코스 수치가 높아지고, 병증의 지표인 장기 고혈당이 혈관 및 신경 손상을 유발한다.
- [0941] 현재, 제2형 당뇨병의 치료를 위한 다양한 약리학적 접근법이 존재한다[Scheen et al., Diabetes Care, 22(9):1568-1577, 1999]. 이 접근법들은 상이한 작용 방식에 의해 작용하는데, 즉, 1) 설폰닐요소는 실질적으로 인슐린 분비를 촉진하고; 2) 비구아나이드(메트포르민)는 글루코스 이용을 촉진하고 간내 글루코스 생산을 줄이고 장내 글루코스 생성을 줄임으로써 작용하며; 3) α-글루코시다제 억제제(아카보스, 미글리톨)는 탄수화물 소화를 늦추어 결과적으로 장으로부터의 흡수를 늦추고 식후 고혈당증을 감소시키고; 4) 티아졸리딘디온(트로글리타존)은 인슐린 작용을 증대시킴으로써 말초 조직에서의 글루코스 이용을 촉진하며; 5) 인슐린은 조직의 글루코스 이용을 촉진하고 간의 글루코스 생성을 억제한다. 전술한 약리학적 접근법들은 개별적으로 또는 병용 요법으로 이용될 수 있다. 그러나, 각각의 접근법은 그 한계와 부작용이 있다.
- [0942] 비만은 현대사회에 크게 만연해 있는 만성 질환으로서 사회적 오욕감과 관련되어 있을 뿐만 아니라, 수명 감소 및 불리한 심리적 발달, 피부 질환(예컨대, 감염), 하지정맥류, 운동 불내성, 당뇨병, 인슐린 내성, 고혈압, 고콜레스테롤혈증 및 관상 심장 질환을 비롯한 다수의 의료적 문제와 관련되어 있다[Rissanen et al., British Medical Journal, 301:835-837 (1990)].
- [0943] 비만의 기존 치료법은 표준 식이와 운동, 초저칼로리 식이, 행동 요법; 식욕 억제제, 열대사 촉진제, 음식 흡수 억제제를 포함한 약물 요법; 턱 와이어링(jaw wiring), 허리 코드 및 별론과 같은 기계적 디바이스 및 수술을 포함한다[Jung and Chong, Clinical Endocrinology, 35:11-20 (1991); Bray, Am. J. Clin. Nutr., 55: 538S-544S (1992)].
- [0944] 우리 사회에 비만이 널리 퍼져있는 점과 전술한 바와 같이 이와 관련된 심각한 결과를 고려할 때, 비만인의 체중을 줄이는 데 잠재적으로 유용한 임의의 치료 약물이 건강에 매우 유익한 영향을 발휘할 수 있다. 당업계에서는 비만 환자의 전신 체중을 현저한 유해 부작용 없이 이상적인 체중으로 줄이고 비만 환자가 감소된 체중 수준을 유지하도록 돕는 약물이 요구되고 있다.
- [0945] 따라서, 비만 환자의 체중을 정상적인 이상 체중으로 회복시키는 데 유용한 치료 방법을 제공할 것이 요망된다. 또한, 장기간 동안 감소된 체중을 유지할 수 있게 하는 비만 치료법을 제공할 것이 요망된다.
- [0946] 비만은 실험 동물 및 인간에 있어서 인슐린 내성과 당뇨병과 깊은 상관관계가 있다. 실제로, 비만 및 인슐린 내성(후자는 일반적으로 고인슐린혈증 또는 고혈당 또는 이들 둘 다를 동반함)은 제2형 당뇨병의 특징이다. 또한, 제2형 당뇨병은 2~4배 높은 관상 동맥 질환의 위험과 관련이 있다. 이러한 심각한 건강 문제에 대한 연구가 수십년 동안 이루어졌음에도 불구하고, 비만과 인슐린 내성의 병인은 알려져 있지 않다.
- [0947] 제1형 당뇨병은 높은 글루카곤 수치와 함께 극소량 또는 측정이 불가능한 혈장 인슐린을 특징적으로 나타낸다. 정확한 병인이 무엇인지에 관계없이, 대부분의 제1형 당뇨병 환자는 인슐린, 랑게르한스섬 세포의 세포질 및 효소 글루탐산 데카복실라제에 대한 항체를 포함하여 그 자신의 췌장 세포에 대해 생성된 순환 항체를 보유한다. 베타 세포(인슐린 생산 세포)에 대해 특이적으로 유발된 면역 반응은 제1형 당뇨병을 초래한다. 이러한 특이성은 장기 임상 양상에 의해 지지되는데, 그 이유는, 베타 세포는 인슐린을 분비하는 한편, 알파 세포는 글루카곤을 분비하기 때문이다.
- [0948] 제1형 당뇨병의 현행 치료 방법은 천연 인슐린 결핍(이것은 베타 세포 손상에 의한 결과임)에 의해 발생하는 고혈당증을 최소화하기 위해 식이를 조절하는 것을 포함한다. 또한, 식이는 호르몬의 저혈당 영향을 막기 위해 인슐린 투여와 관련하여 조절된다. 치료 형태가 무엇이든 간에, 모든 제1형 당뇨병에는 인슐린의 비경구 투여가 필요하고, 따라서, "인슐린 의존형 당뇨병"이라 불린다.

- [0949] 따라서, 이용 가능한 약물 요법보다 유해 효과가 더 적은 제2형 당뇨병의 효과적인 치료 방법이 필요하다. 또한, 인슐린에 대한 효과적인 대안의 치료법은 제1형 당뇨병의 치료에도 유용할 수 있다. 본 발명은 글루코스 흡수를 촉진하고 말초 조직에서의 인슐린 민감성을 증대시키며 제2형 당뇨병의 현행 치료 방법보다 유해 부작용이 적은 약물 요법을 제공한다. 또한, 본 발명은 제1형 당뇨병의 대안적 치료법을 제공한다. 또한, 본 발명은 더 빠르고 더 효율적인 글루코스 이용에 의해 에너지 소비를 증가시킴으로써 비만을 치료하는 데 유용하다.
- [0950] 본 발명은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 비만, 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 당불내성 또는 고혈당증 중 하나 이상을 앓고 있는 포유동물을 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 상기 치료에 필요한 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0951] 상기 치료 방법은 상기 포유동물에서 하기 조절, 즉, 체지방 저장량 감소, 인슐린 내성 감소, 고인슐린혈증의 감소, 글루코스 내성의 증가 및 고혈당증의 감소 중 하나 이상이 달성되기에 충분할 수 있다.
- [0952] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 체지방 저장량을 줄이기 위해, 소, 돼지, 양, 말 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 가축 동물을 치료하는 방법으로서, 유효량의 FGF-21 또는 그 변이체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 장기간 동안 또는 영속적으로 가축의 체지방 저장량을 감소시키는 것은 분명히 인간에게 큰 경제적 이익이 될 것인데, 그 이유는 특히 동물이 인간 식량의 대부분을 공급하고 동물 지방은 인체에서 새로운 지방이 축적됨에 따라 고갈될 수 있기 때문이다.
- [0953] 섬유아세포 성장 인자 21(FGF-21)은 중환자와 관련된 발병률 및 사망률을 줄이는 데 사용될 수 있다(본 명세서에서 참고로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2005/0176631호 참조). 장기간 동안 집중적인 치료가 필요한 중환자는 사망 및 실질적인 치사 위험이 크다. 환자의 집중 치료실(ICU) 입원의 일반적 원인은, 감염과 관련된 전신성 염증 반응 증후군(SIRS)(패혈증) 및 비감염성 병적 원인, 예컨대 췌장염, 허혈, 다발성 외상 및 조직 손상, 출혈성 쇼크 및 면역 관련 장기 손상이다. 본 발명은 또한 감염과 관련된 전신성 염증 반응 증후군(SIRS)뿐만 아니라 비감염성 병적 원인으로 고통받는 중환자에 있어서 발병률과 사망률을 감소시키는 방법으로서, 상기 중환자에게 치료적 유효량의 FGF-21을 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. SIRS를 수반하는 병증의 예로는 패혈증, 췌장염, 허혈, 다발성 외상 및 조직 손상, 출혈성 쇼크, 면역 매개 장기 손상, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 쇼크, 신부전증 및 다발성 장기 부전 증후군(MODS)을 들 수 있다. 본 발명은 또한 호흡 곤란을 겪고 있는 중환자에 있어서 발병률 및 사망률을 감소시키는 방법을 포함한다.
- [0954] SIRS의 일반적 합병증은 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 쇼크, 신부전증 및 다발성 장기 부전 증후군(MODS)(이들 모두 유해 결과 위험을 증폭시킴)을 비롯한 장기 부전의 발생이다. 많은 전문가들이, 몇 가지 유형의 영양 보충제가, 중환자가 대사 안정성을 회복하는 것을 돕는 데 유익하다고 생각하고 있지만, 이러한 주장의 이점 및 특성은 잘 관리된 무작위 임상 시험이 없기 때문에 여전히 논쟁의 여지가 있다.
- [0955] 고혈당증 및 인슐린 내성은 영양 보충제를 투여받은 중환자에 있어서 일반적이기 때문에, 일부 ICU는 식사를 한 중환자의 과도한 고혈당을 치료하기 위해 인슐린을 투여한다. 실제로, 최근의 연구는, 혈중 글루코스 수치를 110 mg/dl 이하로 유지하기 위해 외인성 인슐린을 사용한 것이, 당뇨병 병력의 유무에 관계없이 외과 집중 치료실의 중환자의 발병률 및 사망률을 감소시켰다고 보고하였다[Van den Berghe, et al., N Engl J. Med., 345(19):1359, 2001].
- [0956] 본 발명은 FGF-21을 투여함으로써 이러한 중환자의 발병률 및 사망률을 감소시키는 방법을 포함한다. 본 발명에 포함되는 중환자는 일반적으로 불안정한 대사 항진 상태를 경험한다. 이러한 불안정한 대사 상태는 일부 영양소의 상대적 결핍을 초래할 수 있는 기질 대사에 있어서의 변화에 기인하는 것이다. 일반적으로 지방과 근육 양쪽의 산화가 증가한다.
- [0957] FGF-21의 투여가 사망 및 발병 위험을 감소시킬 수 있는 중환자는 바람직하게는 전신성 염증 반응 증후군 또는 호흡 곤란을 경험한 환자이다. 발병률 감소란 중환자가 추가적인 질병, 병증 또는 증상을 발생시킬 가능성을 낮추거나 추가적인 질병, 병증 또는 증상의 중증도를 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 발병률 감소는 균혈증 또는 패혈증 또는 다발성 장기 부전과 관련된 합병증 발생률의 감소에 해당할 수 있다.
- [0958] 전신성 염증 반응 증후군(SIRS)은 수많은 임상 상태와 관련된 염증 과정을 나타내는 것으로서, 하기 임상 징후, 즉, (1) 체온이 38℃보다 높거나 36℃보다 낮은 것; (2) 심박수가 분당 90회보다 많은 것; (3) 호흡수가 분당 20회보다 많은 것으로 나타나는 빈호흡, 또는 PaCO₂가 32 mmHg 미만인 과호흡; 및 (4) 백혈구수의 변화, 예컨대 12,000/cu mm 초과 또는 4,000/cu mm 미만의 수, 또는 10% 미성숙 호중구의 존재 중 하나 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 생리학적 변화는 화학 요법에 의해 유발된 호중구 감소증 및 백혈구 감소증과 같은

이상의 알려진 다른 원인 없이도 기저값으로부터 급성 변화를 나타내어야 한다.

- [0959] 패혈증은 감염에 의해 발생하는 SIRS로서 정의된다. SIRS의 비감염성 병원성 원인은 채장염, 허혈, 다발성 외상 및 조직 손상(압제 손상 또는 심한 화상을 포함하나, 이들에 한정되지 않음), 출혈성 쇼크, 면역 매개 장기 손상, 및 염증 과정의 추정 매개인자로서의 종양 괴사 인자 및 다른 사이토카인의 외적 투여를 포함할 수 있다.
- [0960] 패혈성 쇼크 및 다발성 장기 부전은 ICU 셋팅에 있어서 발병 및 사망의 주요 기여 요인이다. 패혈증은 사이토카인 네트워크, 백혈구 및 보체 캐스케이드를 포함하는 다수의 숙주 방어 메커니즘과 내피를 포함하는 응고/섬유소 용해 시스템의 활성화와 관련되어 있고 이것에 의해 매개된다. 파종 혈관내 응고(DIC) 및 각종 장기의 미세 혈관계 내의 섬유소 침착과 관련된 다른 정도의 소모성 응고병증은 패혈증/패혈성 쇼크의 징후이다. 표적 장기 에 대한 숙주 방어 반응의 하류 효과는 다발성 장기 부전 증후군(MODS)의 발생에 있어서 중요한 매개인자이고 패혈증, 중증 패혈증 및 쇼크에 의해 악화되는 패혈증을 앓고 있는 환자의 나쁜 예후에 기여한다.
- [0961] 호흡 곤란이란 환자가 몇 가지 유형의 폐 기능 장애로 인하여 호흡이 곤란한 상태를 의미한다. 흔히, 이들 환자는 보충 산소를 사용한 치료에 난치성일 수도 아닐 수도 있는 다양한 정도의 저산소증을 나타낸다. 호흡 곤란은 직접적인 폐 손상으로 인한 폐 기능 장애를 갖고 있는 환자에게서 발생하거나 전신 프로세스의 셋팅에서와 같이 간접적인 폐 손상으로 인해 발생할 수 있다. 또한, 다수의 소인성 질환의 존재는 위험을 크게 증가시키고, 만성 알코올 남용, 만성 폐 질환 및 낮은 혈청 pH와 같은 2차적 요인의 존재 역시 위험을 증가시킨다.
- [0962] 직접적 폐 손상의 몇 가지 원인으로는 폐렴, 위 내용물의 흡인, 폐 좌상, 지방 전색증, 익수, 흡입 손상, 고소(high altitude) 및 폐 이식 또는 폐 색전 제거술 후의 재관류 폐 부종을 포함한다. 간접적 폐 손상의 몇 가지 원인으로는 패혈증, 쇼크 및 여러 차례의 수혈에 의한 심한 외상; 심폐 바이패스, 약물 과용, 급성 채장염 및 혈액 제품의 수혈을 포함한다.
- [0963] 호흡 곤란을 유발하는 폐 질환의 한 부류는 폐성심(Cor Pulmonale)으로 알려진 증후군과 관련되어 있다. 이러한 질환은 폐 고혈압이라 불리는 폐 순환 내의 압력 상승을 초래하는 만성 저산소증과 관련되어 있다. 뒤이은 폐 고혈압은 우심실의 작업 부하가 증가하여, 심실의 확장 또는 비대가 발생한다. 폐성심은 일반적으로 좌심실 압력의 지속적인 증가 및 우심으로의 정맥 환류량 감소의 임상적 증거로 정의되는 우심 부전으로서 나타난다.
- [0964] 폐기종 및 만성 기관지염을 포함하는 만성 폐색성 폐 질환(COPD) 또한 호흡 곤란을 유발하고 공기류 폐색을 특징으로 한다. COPD는 4번째 주요 사망 원인으로서 매년 100,000명의 생명을 앗아간다.
- [0965] 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)은 일반적으로 진행성이며 뚜렷한 단계가 있는 것이 특징이다. 이 증후군은 일반적으로 이 병증의 위험 요인을 갖는 환자에 있어서 호흡 부전의 빠른 개시에 의해 나타난다. 보충 산소를 사용한 치료에 난치성인 동맥 저산소혈증이 특징적인 점이다. 폐포 충만(alveolar filling), 경화(consolidation) 및 중독성 폐 영역에서 발생하는 무기폐가 존재할 수 있으나, 비중독성 영역도 상당한 염증을 지닐 수 있다. 이 증후군은 지속성 저산소증, 폐포 사강 증가 및 폐 순응도의 추가 감소를 동반한 섬유화 폐포염으로 진행될 수 있다. 폐 모세혈관 그물의 손상으로부터 야기되는 폐 고혈압이 발생할 수도 있다.
- [0966] 임상적 폐 손상의 중증도는 다양하다. 흡입 산소 분율에 대한 동맥 산소 분압의 비가 300 이하인 것으로 정의되는 저산소증이 덜 심각한 환자, 상기 비가 200 이하로 정의되는 저산소증이 더 심각한 환자 모두 본 발명에 포함된다. 일반적으로, 상기 비가 300 이하인 환자를 급성 폐 손상이 있는 것으로 분류하고 상기 비가 200 이하인 환자를 급성 호흡 곤란 증후군이 있는 것으로 분류한다.
- [0967] 급성 폐 손상의 급성기는, 폐포 모세혈관 장벽의 혈관 투과성 증가로 인하여 폐 기강으로 단백질이 많은 부종액이 유입되는 것을 특징으로 한다. 투과성이 변화되는 상피세포 온전성의 상실은 폐포 홍수를 유발하고, 정상적인 액 수송을 파괴하여 폐포강으로부터의 부종액 제거를 손상시키며, 계면활성제 생산 및 턴오버(turnover) 감소시키고, 세균성 폐렴 환자에서 패혈성 쇼크를 유발하며, 섬유증을 발생시킨다. 패혈증은 급성 폐 손상 진행 위험이 매우 높은 것과 관련이 있다.
- [0968] 대사 향진이 발생하는 패혈증과 같은 병증에서는, 당 신생을 지속시키고 단백질 합성 증가에 요구되는 아미노산을 유리시키기 위해 단백질 분해가 촉진된다. 고혈당증이 나타날 수 있고 혈청 중에 중성지방 및 다른 지질의 농도가 높게 나타날 수 있다.
- [0969] 폐 기능이 손상된 환자의 경우, 대사 향진이 이산화탄소 생산 대 산소 소비의 비에 영향을 미칠 수 있다. 이것은 호흡률(respiratory quotient)(R/Q)로서 정의되며, 정상적인 개체에서는, 약 0.85~약 0.90이다. 과잉 지방 대사는 R/Q를 낮추는 경향이 있는 반면, 과잉 글루코스 대사는 R/Q를 높인다. 호흡 곤란 환자는 대개 이산화탄

소 배출에 곤란을 겪기 때문에 호흡률이 비정상적으로 높다.

[0970] 본 발명에 포함되는 중환자는 또한 일반적으로, 대부분의 세포 산물의 일시적 하향 조절과 열 충격 단백질의 상향 조절을 특징으로 하는 특정 스트레스 반응을 경험한다. 또한, 이러한 스트레스 반응은 글루카곤, 성장 호르몬, 코르티솔, 항염증성 및 항염증성 사이토카인과 같은 호르몬의 활성화를 연루시킨다. 이러한 스트레스 반응은 보호 기능을 갖는 것으로 생각되지만, 이 반응은 이러한 중환자에 있어서는 추가적인 대사 불안정성을 야기한다. 예를 들어, 이러한 특정 호르몬의 활성화는 고혈당증을 초래하는 혈중 글루코스 상승을 유발한다. 또한, 심장 및 다른 장기의 손상이 아드레날린 자극에 의해 악화될 수 있다. 또한, 대사 활성화에 유의적인 영향을 줄 수 있는 갑상선의 변화가 있을 수 있다.

[0971] 상기 FGF-21의 평균량은 다양할 수 있고, 특히 자격을 갖춘 의사의 권고와 처방에 기초하여야 한다. FGF-21의 정확한 양은 치료 대상 병증의 정확한 유형, 치료 대상 환자의 상태 및 조성물 중의 다른 성분들과 같은 요인들에 따라 달라진다. 본 발명은 또한 치료적으로 유효한 양의 다른 활성 물질을 투여하는 것을 제공한다. 투여량은 FGF-21을 사용한 치료에 기초하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

[0972] 본 발명의 약학 조성물은 통상적인 방법으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0973] 도 1 - FGF-21에서의 앰버 돌연변이 및 FGF-19에서의 상응하는 부위가 도시된다.
- 도 2 - 인간 FGF-19의 구조가 도시된다.
- 도 3 - FGF-21에서의 앰버 돌연변이 및 FGF-2에서의 상응하는 부위가 도시된다.
- 도 4 - 인간 FGF-19의 구조가 도시된다.
- 도 5 - N 말단 His 태깅 FGF-21의 발현 및 7개 앰버 부위에서의 억제제가 도시된다.
- 도 6 - N 말단 His 태깅 FGF-21의 발현 및 7개 앰버 부위에서의 억제로부터 얻어진 BPER 상청액 시료가 도시된다.
- 도 7a - FGF21 변이체 30K PEG-391, 30K PEG-477, 30K PEG-R131, 30K PEG-Q108, HIS-FGF21(His 태깅 야생형)의 계열 희석액에 대한 EC₅₀ 값을 계산하는 시그나플롯(SigmaPlot).
- 도 7b - 열거된 PEG화 FGF21 변이체 각각에 대한 평균 활성 손실 배수를 보여주는 표.
- 도 8 - 이. 콜라이에서 발현된 비His 태깅 FGF-21의 SDS-PAGE 분석.
- 도 9 - (A) FGF-21-Y83pAF 용리 분획의 SDS-PAGE 분석. (B) 비태깅 FGF-21 -Y83pAF의 Q HP 용리의 크로마토그램. (C) FGF-21-Y832pAFQ HP 용리 풀(pool)의 SDS-PAGE 분석.
- 도 10 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 11 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 12 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 13 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 14 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 15 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 16 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 17 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 18 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 19 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 20 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.
- 도 21 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.

도 22 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.

도 23 - 실시예 28의 데이터, 래트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성.

도 24 - pVK10-FGF21 벡터 맵.

도 25 - pVK10-FGF21 벡터 서열.

도 26a - 래트에서의 3가지 용량의 N-6His WT FGF21의 혈청 농도-시간 프로파일. 래트에게 테스트 물질을 1회 피하 투여하였다. 군당 동물수 = 4. 기호는 측정된 혈청 농도의 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다.

도 26b - 0.25 mg/kg으로 피하 또는 정맥내 투여된 N-6His WT FGF21의 혈청 농도-시간 프로파일. 래트에게 테스트 물질을 1회 피하 투여하였다. 군당 동물수 = 4. 기호는 측정된 혈청 농도의 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다. 총 생체이용률은 약 87%이다.

도 27a - C_{max} 에서의 테스트 물질의 혈청 농도와 용량과의 관계. C_{max} 값은 이론값이 아니라 관찰값으로서 기록되었다. 처리군당 동물수 = 4. 선형 회귀값은 0.59이고 기울기는 348.5 ± 91.22 이다.

도 27b - 테스트 물질의 종말 반감기와 용량과의 관계. 처리군당 동물 수 = 4. 0.25 mg/kg 이상에서는 겔보기 제거 포화로 인해 선형 회귀값을 계산할 수 없었다.

도 27c - 혈청 농도 AUC와 용량과의 관계. AUC 값은 무한대까지 계산한 관찰값으로서 기록하였다. 처리군당 동물수 = 4. 선형 회귀값은 0.75이고 기울기는 1079 ± 194.1 이다.

도 28a - 래트에서의 3가지 용량의 PP WT FGF21의 혈청 농도-시간 프로파일. 래트에게 테스트 물질을 1회 피하 투여하였다. 군당 동물수 = 4. 기호는 측정된 혈청 농도의 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다.

도 28b - 0.25 mg/kg으로 피하 또는 정맥내 투여된 PP WT FGF21의 혈청 농도-시간 프로파일. 래트에게 테스트 물질을 1회 피하 투여하였다. 군당 동물수 = 4. 기호는 측정된 혈청 농도의 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다. 총 생체이용률은 약 65%이다.

도 29a - C_{max} 에서의 테스트 물질의 혈청 농도와 용량과의 관계. C_{max} 값은 이론값이 아니라 관찰값으로서 기록되었다. 처리군당 동물수 = 4. 선형 회귀값은 0.92이고 기울기는 454.2 ± 42.42 이다.

도 29b - 테스트 물질의 종말 반감기와 용량과의 관계. 처리군당 동물수 = 4. 0.25 mg/kg 이상에서는 겔보기 제거 포화로 인해 선형 회귀값을 계산할 수 없었다.

도 29c - 혈청 농도 AUC와 용량과의 관계. AUC 값은 무한대까지 계산한 관찰값으로서 기록하였다. 처리군당 동물수 = 4. 선형 회귀값은 0.93이고 기울기는 1585 ± 137.1 이다.

도 30a - 래트에게 0.5 mg/kg으로 피하 투여된 PP 대 N6-His WT FGF21 화합물의 계산된 종말 반감기 비교. 양측 t-검정을 이용하여 계산한 p 값은 0.7715이다. 군당 동물수 = 3~4.

도 30b - 래트에게 0.5 mg/kg으로 피하 투여된 PP 대 N6-His WT FGF21 화합물의 C_{max} 값 비교. 양측 t-검정을 이용하여 계산한 p 값은 0.7652이다. 군당 동물수 = 3~4.

도 30c - 래트에게 0.5 mg/kg으로 피하 투여된 PP 대 N6-His WT FGF21 화합물의 AUC_{inf} 비교. 양측 t-검정을 이용하여 계산한 p 값은 0.4372이다.

도 31a - 10종의 PEG화 N6-His 태깅 FGF21 이성질체의 PK 프로파일.

도 31b - 0.25 mg/kg의 피하 주사 후의 PEG화 FGF21 이성질체의 흡수 프로파일.

도 31c - 0.25 mg/kg의 피하 주사 후의 PEG화 FGF21 이성질체의 제거 프로파일.

도 32 - 20 kDa PEG화와 30 kDa PEG화의 약동학적 비교.

도 33 - 0.25 mg/kg의 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21을 정맥내 또는 피하 투여한 래트에 대한 혈장 농도 시간 곡선. 각각의 동물에게 1회 용량을 투여하였다. 군당 동물수 = 4. 기호는 측정된 혈청 농도의 평균을 나타내고,

막대는 표준 편차를 나타낸다. 총 생체이용률은 약 30%이다.

도 34 - 이. 콜라이에서의 FGF21 분비와, OmpA, MalE 및 StII를 이용한 리더가 매우 잘 기능하고 있음(두 번째 겔에서의 주변세포질 방출 가용성 분획에 의해 입증됨)을 보여주는 2개의 겔.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[실시예]

하기 실시예는 예시를 위해 제공된 것으로, 청구된 발명을 한정하지 않는다.

실시예 1

이 실시예에서는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 FGF-21로의 도입 부위를 선택하기 위한 기준의 다수의 잠재적 세트 중 하나에 관해 설명한다.

도 1은, 벡터 NTI(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen 제품)를 사용하여 측정한, FGF-21(단백질 수탁 번호 BC018404)과 FGF-19(단백질 수탁 번호 BAA75500) 간의 서열 상동성을 보여준다. 별표로 표시된 아미노산은 두 분자 간에 유사하다. 밑줄친 아미노산은 두 폴리펩티드 간에 동일하다. 천연적으로 코딩된 아미노산을 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하여 몇 개의 상이한 FGF-21 폴리펩티드를 생성하였다. 각각의 폴리펩티드는, 파라-아세틸페닐알라닌으로 치환된, 도 1에서 직사각형으로 표시된 아미노산 중 하나를 가졌다. 생성된 폴리펩티드는 도 1 및 3에 제시된 리더 서열이 없었고 6 히스티딘 잔기를 갖는 N 말단에서 His 태깅되었다. 서열 번호 1은 리더 서열이 없는 인간 FGF-21(P 형태)의 181개 아미노산 서열이다. 서열 번호 2는 리더 서열이 없고 N 말단에 His 태그가 있는 인간 FGF-21(P 형태)의 서열이다. 생성된 폴리펩티드 각각은 서열 번호 1의 10, 52, 77, 117, 126, 131 및 162번 위치 중 하나에서 비천연적으로 코딩된 아미노산 치환을 가졌다.

도 2는 단백질 데이터 뱅크(Protein Data Bank: PDB)[Bernstein et al., J. Mol. Biol. 1997, 112, pp 535](IPWA)로부터 입수하였고 PyMOL 소프트웨어(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 DeLano Scientific 제품)를 사용하여 표시한 인간 FGF-19의 구조를 보여준다. FGF-19의 V34, L79, G104, S144, K155, L160 및 S196에 상응하는 아미노산은 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에서 파라-아세틸페닐알라닌으로 치환되었다. 점선은 원래 구조에서 해명되지 않았던 영역을 나타낸다.

도 3은, 벡터 NTI(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen 제품)를 사용하여 측정한, FGF-21(단백질 수탁 번호 BC018404)과 FGF-19(단백질 수탁 번호 BAA75500) 간의 서열 상동성을 보여준다. 별표로 표시된 아미노산은 두 분자 간에 유사하다. 밑줄친 아미노산은 두 폴리펩티드 간에 동일하다. 도 1에 치환 부위로서 표시된 7개 아미노산이 또한 도 3에서 직사각형으로 표시되어 있다.

도 4는 PDB(1CVS)로부터 입수하고 PyMOL 소프트웨어(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 DeLano Scientific 제품)를 사용하여 표시한 인간 FGF-2의 구조를 보여준다. 회색 구조는 인간 FGF 수용체 1(FGFR1)이고, 검정은 인간 FGF2이다. 문헌[Plotnikov, AN et al., Cell. 1999 Sep 3; 98(5):641-50]은 FGF 수용체에 결합된 FGF2의 결정 구조에 관해 기술한다. FGF-2의 F21, K62, K86, V125, K134, T139에 상응하는 아미노산이 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에서 파라-아세틸페닐알라닌으로 치환되었다. 점선은 원래 구조에서 해명되지 않았던 영역을 나타낸다.

비천연적으로 코딩된 아미노산의 도입을 위한 바람직한 부위의 선택을 위한 기준의 또 다른 세트는 다음과 같다. 단백질 데이터 뱅크로부터의 10개 결정 구조를 FGF-21의 구조를 모델링하는 데 사용하였다: 1PWA(인간 FGF-19); 1IJT(인간 FGF-4); 1NUN(인간 FGF10-FGF 수용체 2b 복합체); 1G82(FGF 수용체 및 헤파린을 갖는 인간 FGF-9 이량체); 1IHK(인간 FGF-9); 1BAR(소 FGF-1); 1QQK(랫 FGF-7); 1K5U(인간 FGF-1); 1FQ9(FGF 수용체 1 및 헤파린을 갖는 인간 FGF-2); 및 2FDB(FGF 수용체 2c를 갖는 인간 FGF-8b). 이러한 구조의 좌표는 단백질 데이터 뱅크(PDB)로부 입수 가능하다[Bernstein et al., J. Mol. Biol. 1997, 112, pp 535]. 결정 구조의 비교는 이들이 모두 코어 구조에 있어 매우 유사하다는 것을 나타내었다. 그러나, N 말단과 C 말단은 이들 FGF 분자 간에 다양성이 매우 커서 말단을 모델링할 수 없었다. 이 모델링은 2개의 잔기, 즉 Y22 및 Y104를 확인하였는데, 이것들은 보존성이 높았고 수용체 결합에 관여하였다. R36 및 E37을 포함하는 2개의 잠재적인 헤파린 결합 부위도 확인하였다. 수용체 결합 및 헤파린 결합 잔기에 대해 확인된 아미노산 위치는 서열 번호 1에 상응한다.

결과적으로, 1) FGF 수용체 또는 헤파린에 대한 결합을 간섭하고, 2) 단백질 내부에 존재하지 않으며, 3) 결정 구조 간에 매우 일관된 영역에 존재하는 잔기들을 확인하였다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로

코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 서열 번호 1의 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산 중 하나 이상을 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치로 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 FGF-21의 하기 위치, 즉, 서열 번호 1의 87, 77, 83, 72번 위치, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산 중 하나 이상을 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치로 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 FGF-21의 하기 위치, 즉, 서열 번호 1의 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산 중 하나 이상의 위치를 포함하나 이들에 한정되지 않는 위치로 도입된다.

[0984] 하기 기준을 이용하여, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 도입을 위한 FGF-21의 각 위치를 평가하였다: 잔기가 (a) 구조 분석에 기초할 때 FGF-21 수용체의 결합을 간섭하지 않아야 하고, b) 알라닌 또는 동족체 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 영향을 받지 않아야 하며, (c) 표면이 노출되고 주변 잔기와 최소한의 반데르발스 또는 수소 결합 상호작용을 해야 하고, (d) FGF-21 변이체에서 결실되거나 가변성이어야 하며, (e) 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환시 보존적 변화를 유도하여야 하고, (f) 유연성이 큰 영역 또는 구조적으로 강성인 영역에서 확인될 수 있다는 점.

[0985] FGF-23 및/또는 FGF-19의 구조와 같이 FGF 패밀리의 구성원에 대한 추가적인 또는 상이한 결정 구조는 또한 FGF-21로 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 부위를 선택하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 인간 FGF-19의 결정 구조(PDB ID 2P23) 및/또는 인간 FGF-19의 결정 구조(PDB ID 2P23) 및/또는 인간 FGF-23의 결정 구조(PDB ID 2P39)는 FGF-21로 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 부위를 선택하기 위한 추가적인 정보를 제공할 수 있다. 이러한 부위는 N 말단 및 C 말단, 수용체 결합 및 헤파린 결합 영역을 포함하나 이들에 한정되지 않는 단백질의 다양한 영역 내에 존재할 수 있다. 또한, 각각의 단백질 원자에 대해 돌출 정도를 평가하기 위해, Cx 프로그램[Pintar et al., (2002) Bioinformatics, 18, pp 980]을 이용하여 FGF-21 분자에 대해 추가적인 계산을 수행할 수 있다.

[0986] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21의 하기 위치, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21의 하기 위치, 즉, 10, 52, 77, 117, 126, 131 및 162번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21의 하기 위치, 즉, 87, 77, 83, 72번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 FGF-21의 하기 위치, 즉, 69, 79, 91, 96, 108 및 110번 위치(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7의 상응하는 아미노산) 중 하나 이상에 도입된다.

[0987] 실시예 2

[0988] 이 실시예는, 이. 콜라이에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 클로닝하고 발현시키는 방법에 대해 상세히 설명한다. 이 실시예는 또한 변형된 FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성을 평가하기 위한 방법을 설명한다.

[0989] FGF-21을 클로닝하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. FGF-21의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열과, FGF-21을 숙주 세포로 클로닝하는 방법은 미국 특허 제6,716,626호; 미국 특허 출원 공개 제2005/0176631호, 제2005/0037457호, 제2004/0185494호, 제2004/0259780호, 제2002/0164713호 및 제2001/0012628호; WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606; WO

06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463(이 특허 문헌들은 본 명세서에서 참고로 포함함)에 상세히 기재되어 있다.

- [0990] 리더 서열이 없는 FGF-21의 P 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 8로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 1로서 제시된다.
- [0991] 리더 서열이 없는 FGF-21의 His 태깅 P 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 9로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 2로서 제시된다.
- [0992] 3개 루신을 함께 포함하는 리더 서열이 있는 FGF-21의 P 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 10으로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 3으로서 제시된다.
- [0993] 2개 루신을 함께 포함하는 리더 서열이 있는 FGF-21의 P 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 11로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 4로서 제시된다.
- [0994] 리더 서열이 없는 FGF-21의 L 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 12로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 5로서 제시된다.
- [0995] 3개 루신을 함께 포함하는 리더 서열이 있는 FGF-21의 L 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 13으로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 6으로서 제시된다.
- [0996] 2개 루신을 함께 포함하는 리더 서열이 있는 FGF-21의 L 형태를 코딩하는 cDNA는 서열 번호 14로서 제시된다. 이 폴리펩티드는 서열 번호 7로서 제시된다.
- [0997] 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템이 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용된다. 상기 O-RS는 O-tRNA를 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화한다. 또한, 이 번역 시스템은 코딩된 셀렉터 코돈에 반응하여 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산을 FGF-21에 삽입한다. 적절한 O-RS 및 O-tRNA 서열은, 본 명세서에서 참고로 포함하는 WO 2006/068802[발명의 명칭: "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof (E9; 서열 번호 15)] 및 WO 2007/021297[발명의 명칭: "Compositions of tRNA and Uses Thereof (F13; 서열 번호 16)]에 기재되어 있다.

[0998] [표 2]: O-RS 및 O-tRNA 서열

서열 번호 17	원. 잔나스카이 mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	tRNA
서열 번호 18	HLAD03; 최적화된 염색 서프래서 tRNA	tRNA
서열 번호 19	HL325A; 최적화된 AGGA 프래임서프 서프래서 tRNA	tRNA
서열 번호 20	p-아지도-L-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-Az-PheRS(6)	RS
서열 번호 21	p-벤조일-L-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-BpaRS(1)	RS
서열 번호 22	프로파길-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 프로파길-PheRS	RS
서열 번호 23	프로파길-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 프로파길-PheRS	RS
서열 번호 24	프로파길-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 프로파길-PheRS	RS
서열 번호 25	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-Az-PheRS(1)	RS
서열 번호 26	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-Az-PheRS(3)	RS
서열 번호 27	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-Az-PheRS(4)	RS
서열 번호 28	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 p-Az-PheRS(2)	RS
서열 번호 29	p-아세틸-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 (LW1)	RS
서열 번호 30	p-아세틸-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 (LW5)	RS
서열 번호 31	p-아세틸-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 (LW6)	RS
서열 번호 32	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 (AzPheRS-5)	RS
서열 번호 33	p-아지도-페닐알라닌의 도입을 위한 아미노아실 tRNA 합성효소 (AzPheRS-6)	RS

- [0999]
- [1000] 변형된 FGF-21 유전자 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소/tRNA 쌍(소정의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 대해 특이적임)을 포함하는 플라스미드를 사용한 이. 콜라이의 형질전환에 의하면, FGF-21 폴리펩티드로 비천연적으로 코딩된 아미노산이 부위 특이적으로 도입된다.
- [1001] 표준 프로토콜을 이용하여 건강한 인간 간 폴리A+ mRNA(Biochain)로부터 유도된 cDNA 합성 반응으로부터 PCR에 의해 야생형 성숙 FGF-21을 증폭시키고, pET30(NcoI-BamHI)으로 클로닝하였다. 서열 확인 후, N 말단 HHHHHHSGG 서열을 포함하는 FGF-21을, 이. 콜라이 지단백질 프로모터 서열로부터 유도된 합성 프로모터(Miller,

J.H., Gene, 1986)의 항상성 제어하의 메타노코커스 잔나스키이(*Methanococcus jannaschii*)(Mj tRNA^{Tyr/CUA}) 유래의 앰버 서프레서 타이로실 tRNA^{Tyr/CUA} 및 이. 콜라이 GlnRS 프로모터 제어하의 오르토고날 타이로실-tRNA 합성 효소(MjTyrRS)를 포함하는 억제 벡터로 서브클로닝하였다. FGF-21의 발현은 T7 프로모터의 제어하에 있었다. 표준 급변 돌연변이 프로토콜(미국 캘리포니아주 라 호야 소재의 Stratagene 제품)을 이용하여 앰버 돌연변이를 도입하였다. 모든 구성체의 서열을 검증하였다.

[1002] 과라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)을 사용한 억제

[1003] T7 폴리머라제의 발현이 아라비노스 유도성 프로모터 제어하에 있는 이. 콜라이 W3110 B2 균주로 플라스미드 (pVK3-HisFGF21)를 형질전환시켰다. 밤새 배양한 박테리아 배양물을 2× YT 배양 배지를 함유하는 진탕 플라스크에 1:100으로 희석하여 넣고 37℃에서 OD₆₀₀이 약 0.8이 될 때까지 배양하였다. 아라비노스(최종 농도 0.2%) 및 과라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)을 최종 농도가 4 mM이 될 때까지 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 배양물은 37℃에서 4시간 동안 항온처리하였다. 세포를 펠릿화하고 B-PER 용해 완충액(Pierce)(100 μl/OD/ml + 10 μg/ml DNase)에 재현탁시키고, 37℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 원심분리로 세포 물질을 제거하고 상청액을 회수하였다. 펠릿을 동량의 SDS-PAGE 단백질 로딩 완충액에 재현탁시켰다. 모든 시료를 MES 및 DTT를 함유한 4~12% PAGE 겔에 로딩하였다. FGF-21의 정제 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 분석 또는 전기분무-이온화 이온 트랩 질량 분광분석법 등으로 확인한다.

[1004] N 말단 His 태깅 FGF-21의 발현 및 7개 앰버 부위에서의 억제는 도 5에 도시된 바와 같다. 상기 FGF-21 폴리펩티드는 화살표로 표시된다. 도 5는 B-PER 펠릿 시료 - 레인 1: 마커; 레인 2: VK3-FGF21 사전 유도, 상청액; 레인 3: VK3-FGF21 사전 유도, 펠릿; 레인 4: VK3-FGF21 0.2% 아라비노스, 상청액; 레인 5: VK3-FGF21 0.2% 아라비노스, 펠릿; 레인 6: VK3-FGF21-pAcF-L10, 0.2% 아라비노스; 레인 7: VK3-FGF21-pAcF-L52, 0.2% 아라비노스; 레인 8: VK3-FGF21-pAcF-R77, 0.2% 아라비노스; 레인 9: VK3-FGF21-pAcF-H117, 0.2% 아라비노스; 레인 10: VK3-FGF21-pAcF-R126, 0.2% 아라비노스; 레인 11: VK3-FGF21-pAcF-R131, 0.2% 아라비노스; 레인 12: VK3-FGF21-pAcF-S162, 0.2% 아라비노스를 도시한다. 아미노산 치환에 대해 표시된 위치의 번호는 서열 번호 1에 기초한 것이다.

[1005] 도 6은 B-PER 상청액 시료 - 레인 1: VK3-FGF21 사전 유도, 상청액; 레인 2: VK3-FGF21 사전 유도, 펠릿; 레인 3: 마커; 레인 4: VK3-FGF21 0.2% 아라비노스, 상청액; 레인 5: VK3-FGF21 0.2% 아라비노스, 펠릿; 레인 6: VK3-FGF21-pAcF-L10, 0.2% 아라비노스; 레인 7: VK3-FGF21-pAcF-L52, 0.2% 아라비노스; 레인 8: VK3-FGF21-pAcF-R77, 0.2% 아라비노스; 레인 9: VK3-FGF21-pAcF-H117, 0.2% 아라비노스; 레인 10: VK3-FGF21-pAcF-R126, 0.2% 아라비노스; 레인 11: VK3-FGF21-pAcF-R131, 0.2% 아라비노스; 레인 12: VK3-FGF21-pAcF-S162, 0.2% 아라비노스를 도시한다. 아미노산 치환에 대해 표시된 위치의 번호는 서열 번호 1에 기초한 것이다.

[1006] 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 His 태깅 돌연변이 FGF-21 단백질을 정제할 수 있다. ProBond 니켈 킬레이팅 수지(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen 제품)를 제조업자가 제공하는 표준 His 태깅 단백질 정제 방법을 통해 이용할 수 있다.

[1007] 도 25에 제시된 서열을 갖는 비태깅 FGF-21 단백질과 함께 사용하기 위한 pVK10(도 24)을 개발하였다. 이것은 R36am 및 Y83am 돌연변이체를 제조하는 데 사용된 벡터이며, 비His 태깅 FGF-21 돌연변이체 단백질 및 그 후속 정제에 관한 추가 데이터가 실시예에 제공되고 도면 전반에 도시된다.

[1008] 3T3-L1의 지방 세포로의 분화 및 글루코스 흡수 분석

[1009] FGF-21 폴리펩티드의 생물학적 활성을 평가하기 위해, 하기 분석을 수행할 수 있다. 마우스 3T3-L1 섬유아세포(ATCC #CL-173)를 10% 우태 혈청 함유 DMEM을 포함한 10 cm 디쉬에 시딩하였다. 증식을 위해 세포를 70%가 넘지 않는 밀도로 유지하였다. 지방 세포로의 분화가 시작되기 전에, 세포가 100% 컨플루언스에 도달하게 하며, 2일마다 배지를 교환하여야 한다. 세포수를 세어 96웰/플레이트에 웰당 25,000개 세포로 시딩하여(세포를 Cytostar-T 96웰/플레이트로 플레이팅할 수도 있음) 48시간 동안 더 항온처리한다. 이전 배양 배지를 제거한 후 하기 배지를 첨가하여 분화를 유도한다: 10% FBS(우태 혈청), 1 μM 텍사메타손(DBX), 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸크산틴(IBMX) 및 5 μg/mL 인슐린을 보충한 DMEM. 분화를 유도하는 또 다른 방법은 세포를 1 μM의 로시글리타존으로 처리하고 6일 동안 항온처리한 후 배지를 DMEM/10% FBS로 교환하는 것인데, 그 이유는 이것이 3T3-L1 섬유아세포의 지방 세포로의 분화를 유도하는 더 빠른 방법이기 때문이다. 3번째 가능성은 상기 두 절차를 통합하여 분화 시간을 단축시키는 것이다.

[1010] 세포에 DBX/IBMX/인슐린 함유 배지를 첨가한 후, 이 세포를 48시간 동안 항온처리한다. 배지를 DMEM/10% FBS/5 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린으로 교환하고 세포를 48시간 동안 항온처리한다. 그 후, 이 배지를 DMEM/10% FBS로 바꾸고, 배지를 2일마다 새로운 배지로 교환한다. 세포는 7~14일 사이에 분화를 시작할 것이다. 분화된 세포는 지질 소적에 축적된다. 이 세포를 OIL RED O로 염색할 수 있다. 95% 지방 세포가 지질 소적을 함유하게 되면, 이 세포를 글루코스 흡수 분석에 사용할 수 있다.

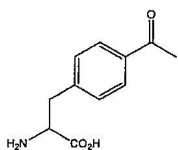
[1011] 분화된 3T3-L1을 0.1% 지방산 비함유 BSA가 보충된 DMEM 중 FGF-21(1 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여, 세포를 기아 상태(starvation)로 만든다. 그 후, 이 세포를 0.1% FAF-BSA가 보충된 크랩스-링거(Kreb's-Ringer) HEPES 완충액(KRH=0.118 M NaCl, 5 mM KCl, 2.54 mM CaCl_2 , 1.19 mM KH_2PO_4 , 1.19 mM MgSO_4 및 20 mM HEPES)으로 3회 세척한다. 표지 혼합물은, 4 μCi , 0.1 mM 2-데옥시D-[1- ^3H]-글루코스를 KRH/0.1% FAF-BSA 완충액에 첨가하여 제조한다. 세포를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 항온처리한다. 세포를 20 μM 사이토칼라신 B 함유 빙냉 PBS로 2회 처리하여 반응을 중단시킨다. 플레이트를 블로팅하여 임의의 잔류 완충액을 제거한다. 신틸레이션액을 각 웰에 첨가하고 TopCounter에서 시료를 카운팅한다.

[1012] 글루코스 흡수를 측정하는 또 다른 방법은 2-NBDG를 비방사성 기질로 하여 분화된 3T3-L1 세포를 로딩하고, 형광 플레이트 판독기로 판독하는 것이었다. 글루코스 흡수를 측정하기 위한 간접적 방법은 세포막 표면 상의 GLUT1 또는 GLUT4의 발현을 측정하는 것이다. GLUT1 및 GLUT4는 인슐린 또는 FGF-21 자극시 내부 소낭으로부터 세포막 표면 상으로 전위되는 글루코스 수송체이다. 생세포에 대한 ELISA를 개발할 수 있다.

[1013] 실시예 3

[1014] 이 실시예는 카보닐 함유 아미노산의 도입 및 아미노옥시 함유 PEG와의 후속 반응에 대해 상세히 설명한다.

[1015] 이 실시예는, 나중에 약 5,000 MW의 아미노옥시 함유 PEG와 반응하게 되는 케톤 함유 비천연적 코딩 아미노산을 도입하는 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 예시한다. 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)의 잔기 각각을 하기 구조를 갖는 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 개별적으로 치환한다:



[1016]

[1017] p-아세틸-페닐알라닌의 FGF-21로의 부위 특이적 도입에 사용되는 서열은 상기 실시예 2에 기재된 서열 번호 1(FGF-21) 및 서열 번호 16 또는 17(muttrNA, 엠. 잔나스키이 mRNA^{Tyr}) 및 15, 29, 30 또는 31(TyrRS LW1, 5 또는 6)이다.

[1018] 일단 발현되면, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 하기 형태의 아미노옥시 함유 PEG 유도체와 반응시킨다:

[1019] $\text{R-PEG(N)-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-O-NH}_2$

[1020] (여기서, R은 메틸이고, n은 3이며, N은 약 5,000 MW임).

[1021] 25 mM MES(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 6.0), 25 mM Hepes(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 7.0) 또는 10 mM 아세트산나트륨(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 4.5)에 10 mg/mL로 용해시킨 p-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 FGF-21을

10~100배 과량의 아미노옥시 함유 PEG와 반응시킨 후, 실온에서 10~16시간 동안 교반한다[Jencks, W., J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475]. 그 후, PEG-FGF-21은 즉각적인 정제 및 분석을 위해 적절한 완충액에 희석한다.

[1022] 실시예 4

[1023] 아미드 결합을 통해 PEG에 연결된 하이드록실아민기로 이루어진 PEG와의 접합.

[1024] 실시예 3에 기재된 방법을 이용하여, 하기 구조를 갖는 PEG 반응제를 케톤을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산에 커플링한다:

[1025] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-O-NH_2$

[1026] (여기서, R은 메틸이고, n은 4이며, N은 약 20,000 MW임)

[1027] 상기 반응, 정제 및 분석 조건은 실시예 3에 기재된 것과 같다.

[1028] 실시예 5

[1029] 이 실시예는 2개의 상이한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 FGF-21 폴리펩티드로 도입하는 것에 대해 상세히 설명한다.

[1030] 이 실시예는 하기 잔기, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)의 잔기 중 2개 위치에 케톤 작용기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하는 FGF-21 폴리펩티드의 제조 방법을 예시한다. 상기 FGF-21 폴리펩티드는 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 제조되나, 단, 선택적 코돈은 핵산 내의 2개의 상이한 부위로 도입된다.

[1031] 실시예 6

[1032] 이 실시예는 하이드라지드 함유 PEG에 대한 FGF-21 폴리펩티드의 접합과 후속 계내(in situ) 환원에 대해 상세히 설명한다.

[1033] 카보닐 함유 아미노산을 도입한 FGF-21 폴리펩티드는 실시예 2 및 3에 기재된 방법에 따라 제조한다. 일단 변형되면, 하기 구조를 갖는 하이드라지드 함유 PEG를 FGF-21 폴리펩티드에 접합시킨다:

[1034] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$

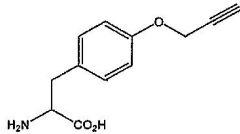
[1035] (여기서, R은 메틸이고, n은 2이며, N은 10,000 MW이고, X는 카보닐(C=O) 기임).

[1036] p-아세틸페닐알라닌을 포함하는 정제된 FGF-21을 25 mM MES(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 6.0), 25 mM Hepes(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 7.0) 또는 10 mM 아세트산나트륨(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(pH 4.5)에 0.1~10 mg/mL로 용해시키고, 1~100배 과량의 하이드라지드 함유 PEG와 반응시킨 후, H₂O에 용해시킨 1 M NaCNBH₃(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품) 저장 용액을 최종 농도가 10~50 mM이 되게 첨가하여 상응하는 하이드라존을 계내에서 환원시킨다. 반응은 4 °C~RT의 암소에서 18~24시간 동안 수행한다. 반응은, 1 M Tris(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Chemical 제품)(약 pH 7.6)를 최종 Tris 농도가 50 mM이 되도록 첨가하여 중단시키거나 즉각적인 정제를 위해 적절한 완충액에 희석한다.

[1037] 실시예 7

[1038] 이 실시예는 FGF-21 폴리펩티드로의 알킨 함유 아미노산의 도입 및 mPEG-아지드를 사용한 유도체화에 대해 상세히 설명한다.

[1039] 하기 잔기, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산)의 잔기를 각각 하기의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환한다:



[1040]

[1041] p-프로파길-타이로신의 FGF-21로의 부위 특이적 도입에 이용된 서열은 상기 실시예 2에 기재된 서열 번호 1(FGF-21), 서열 번호 16 또는 17(muttRNA, 엠. 잔나스키이 $mtRNA^{Tyr}_{CUA}$) 및 22, 23 또는 24이다. 프로파길 타이로신을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드를 이. 콜라이에서 발현시키고 실시예 3에 기재된 조건을 이용하여 정제한다.

[1042] PB 완충액(100 mM 인산나트륨, 0.15 M NaCl, pH = 8)에 용해시킨 프로파길-타이로신을 포함하는 정제된 FGF-21 및 10~1,000배 과량의 아미드 함유 PEG를 반응 혼합물에 첨가한다. 그 후, 촉매량의 $CuSO_4$ 및 Cu 와이어를 반응 혼합물에 첨가한다. 이 혼합물을 항온처리한 후(실온 또는 37°C에서 약 4시간 동안, 또는 4°C에서 밤새 항온 처리하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않음), H_2O 를 첨가하고, 이 혼합물을 투석막을 통해 여과한다. 첨가를 위해 실시예 3에 기재된 유사한 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는 방법으로 시료를 분석할 수 있다.

[1043] 이 실시예에서, 상기 PEG는 하기 구조를 갖는다:

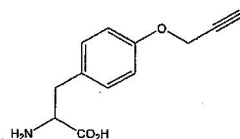
[1044] $R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-N_3$

[1045] (여기서, R은 메틸이고, n은 4이며, N은 10,000 MW임).

[1046] 실시예 8

[1047] 이 실시예는 프로파길 타이로신에 의한 FGF-21 폴리펩티드의 대형 소수성 아미노산의 치환에 대해 상세히 설명한다.

[1048] FGF-21의 하기 영역, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나에 존재하는 Phe, Trp 또는 Tyr 잔기가 실시예 7에 기재된 바와 같이 하기 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다:



[1049]

[1050] 일단 변형되면, PEG는 알킨 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체에 부착된다. 상기 PEG는 하기 구조를 가지며, 커플링 방법은 실시예 7에 기재된 것에 따른다:

[1051] $\text{Me-PEG(N)-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-N}_3$

[1052] 이로써, 천연 대형 소수성 아미노산 중 하나와 대략 등전자이며 폴리펩티드 내의 별개의 부위에서 PEG 유도체로 변형된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체가 생성된다.

[1053] 실시예 9

[1054] 이 실시예는 하나 이상의 PEG 링커에 의해 분리된 FGF-21 폴리펩티드 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체의 제조 방법을 상세히 설명한다.

[1055] 실시예 7에서 제조된 알킨 함유 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 하기 형태의 이작용성 PEG 변이체와 반응시켜, 2개의 FGF-21 분자가 PEG에 의해 물리적으로 분리된 상응하는 FGF-21 폴리펩티드 동종이량체를 생성한다:

[1056] $\text{N}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-PEG(N)-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-N}_3$

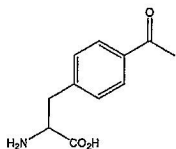
[1057] (여기서, n은 4이고, PEG는 평균 분자량이 약 5,000임)

[1058] 유사한 방법으로, FGF-21 폴리펩티드를 하나 이상의 다른 폴리펩티드에 커플링하여 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 7 및 3에 기재된 바와 같이 수행한다.

[1059] 실시예 10

[1060] 이 실시예는 FGF-21 폴리펩티드에 사카라이드 부분을 커플링하는 것에 대해 상세히 설명한다.

[1061] 실시예 3에 기재된 바와 같이, 하기 잔기, 즉, 1번 위치 앞(즉, N 말단), 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, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182번 위치(즉, 이 단백질의 카복실 말단)(서열 번호 1, 또는 서열 번호 2~7에서의 상응하는 아미노산) 중 하나를 하기 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환한다.



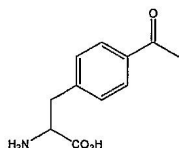
[1062]

[1063] 일단 변형되면, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 β-연결 아미노옥시 유사체와 반응시킨다. 상기 FGF-21 폴리펩티드 변이체(10 mg/mL) 및 아미노옥시 사카라이드(21 mM)를 수성 100 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 5.5)에서 혼합하고, 37℃에서 7~26시간 동안 항온처리한다. 150 mM HEPES 완충액(pH 7.4) 중에서 사카라이드 접합 FGF-21 폴리펩티드(5 mg/mL)를 UDP-갈락토스(16 mM) 및 β-1,4-갈락토실트랜스퍼라제(0.4 유닛/mL)와 항온처리하여 제2 사카라이드를 제1 사카라이드에 효소적으로 커플링한다[Schanbacher et al., J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061].

[1064] 실시예 11

[1065] 이 실시예는 PEG화 FGF-21 폴리펩티드 길항제의 제조 방법에 대해 상세히 설명한다.

[1066] FGF-21 수용체 결합에 관여하는 것을 포함하나 이에 한정되지 않는 잔기를 실시예 3에 기재된 바와 같이 하기 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환한다.



[1067]

[1068] 일단 변형되면, 카보닐 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 하기 형태의 아미노옥시 함유 PEG 유도체와 반응시켜, 상기 폴리펩티드 내의 단일 부위에서 PEG 유도체로 변형된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 길항제를 생성한다.

[1069] $\text{R-PEG(N)-O-(CH}_2)_n\text{-O-NH}_2$

[1070] (여기서, R은 메틸이고, n은 4이며, N은 20,000 MW임)

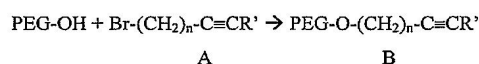
[1071] 커플링, 정제 및 분석은 실시예 3에서와 동일하게 수행한다.

[1072] 실시예 12

[1073] FGF-21 분자가 직접 연결된 FGF-21 폴리펩티드 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체의 제조

[1074] 알긴 함유 아미노산을 포함하는 FGF-21 폴리펩티드 변이체를 아직도 함유 아미노산을 포함하는 또 다른 FGF-21 폴리펩티드 변이체에 직접 커플링할 수 있다. 유사한 방식으로, FGF-21 폴리펩티드를 하나 이상의 다른 폴리펩티드에 커플링하여, 이중이량체, 동중다량체 또는 이중다량체를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 3, 6 및 7에 기재된 바와 같이 수행한다.

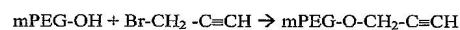
[1075] 실시예 13



[1076]

[1077] 상기 폴리알킬렌 글리콜(P-OH)을 알킬 할라이드(A)와 반응시켜 에테르 (B)를 형성한다. 이들 화합물에서, n은 1~9의 정수이고, R'은 직쇄 또는 분지쇄의 포화 또는 불포화 C₁-C₂₀ 알킬 또는 헤테로알킬 기이다. R'은 또한 C₃-C₇ 포화 또는 불포화 환형 알킬 또는 환형 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴 또는 헤테로아릴 기, 또는 치환된 또는 비치환된 알카릴(이 알킬은 C₁-C₂₀ 포화 또는 불포화 알킬임) 또는 헤테로알카릴 기일 수 있다. 일반적으로, PEG-OH는 분자량 800~40,000 달톤(Da)의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜(mPEG)이다.

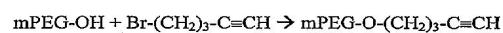
[1078] 실시예 14



[1079]

[1080] 분자량 20,000 Da의 mPEG-OH(mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g, 0.1 mmol, Sunbio)를 THF(35 mL) 중의 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리하였다. 그 후, 이 용액에, 크실렌(0.56 mL, 5 mmol, 50 당량, Aldrich) 중 80 중량% 용액으로서 용해된 프로파길 브로마이드 용액 및 촉매량의 KI를 첨가하고 얻어진 혼합물을 2시간 동안 가열 환류하였다. 그 후, 물(1 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH_2Cl_2 (25 mL)를 첨가하고, 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 부피를 약 2 mL로 감소시켰다. 이 CH_2Cl_2 용액을 디에틸 에테르(150 mL)에 적가하였다. 얻어진 침전물을 수거하여, 몇 분획의 냉각 디에틸 에테르로 세척하고 건조시켜 프로파길-O-PEG를 수득하였다.

[1081] 실시예 15



[1082]

[1083] 분자량 20,000 Da의 mPEG-OH(mPEG-OH 20 kDa; 2.0 g, 0.1 mmol, Sunbio)를 THF(35 mL) 중의 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리하였다. 그 후, 이 혼합물에 5 당량의 5-브로모-1-펜틴(0.53 mL, 5 mmol, Aldrich) 및 촉매량의 KI를 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 16시간 동안 가열 환류하였다. 그 후, 물(1 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH_2Cl_2 (25 mL)를 첨가하고, 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 부피를 약

2 mL로 감소시켰다. 이 CH_2Cl_2 용액을 디에틸 에테르(150 mL)에 적가하였다. 얻어진 침전물을 수거하여, 몇 분획의 냉각 디에틸 에테르로 세척하고 건조시켜 상응하는 알킨을 수득하였다. 5-클로로-1-펜틴을 유사한 반응에 이용할 수 있다.

[1084] 실시예 16

- (1) $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} + \text{NaOH} + \text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (2) $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{MsCl} + \text{N(Et)}_3 \rightarrow m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (3) $m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{LiBr} \rightarrow m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (4) $m\text{PEG-OH} + m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{PEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

[1085]

[1086]

THF(50 mL) 및 물(2.5 mL) 중 3-하이드록시벤질알코올(2.4 g, 20 mmol)의 용액에 먼저 분말 수산화나트륨(1.5 g, 37.5 mmol)을 첨가한 후, 크실렌(3.36 mL, 30 mmol) 중 80 중량% 용액으로서 용해된 프로파길 브로마이드의 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 6 시간 동안 가열 환류하였다. 이 혼합물에 10% 시트르산(2.5 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트(3×15 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척하고, MgSO_4 로 건조시키고, 농축시켜 3-프로파길옥시벤질 알코올을 수득하였다.

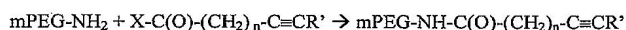
[1087]

0°C에서 메탄설포닐 클로라이드(2.5 g, 15.7 mmol) 및 트리에틸아민(2.8 mL, 20 mmol)을 CH_2Cl_2 중 화합물 3(2.0 g, 11.0 mmol)의 용액에 첨가하고, 반응물을 냉장고에 넣고 16 시간 동안 두었다. 통상적인 후처리를 실시하여, 연황색 오일로서 메실레이트를 수득하였다. 이 오일(2.4 g, 9.2 mmol)을 THF(20 mL)에 용해시키고, LiBr(2.0 g, 23.0 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 가열 환류한 후, 실온으로 냉각시켰다. 혼합물에 물(2.5 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트(3×15 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축시켜 목적 브로마이드를 얻었다.

[1088]

mPEG-OH 20 kDa(1.0 g, 0.05 mmol, Sunbio)을 THF(20 mL)에 용해시키고, 이 용액을 얼음조에서 냉각시켰다. NaH(6 mg, 0.25 mmol)를 수분 동안 세게 교반하면서 첨가한 후 상기에서 얻은 브로마이드(2.55 g, 11.4 mmol) 및 촉매량의 KI를 첨가하였다. 냉각조를 꺼내어 얻어진 혼합물을 12시간 동안 가열 환류하였다. 상기 혼합물에 물(1.0 mL)을 첨가하고 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH_2Cl_2 (25 mL)를 첨가하고, 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 부피를 약 2 mL로 감소시켰다. 에테르 용액(150 mL)에 적가하자, 백색 침전물이 얻어졌고, 이것을 수거하여 PEG 유도체를 수득하였다.

[1089] 실시예 17



[1090]

[1091]

말단 알킨 함유 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체는 또한 전술한 바와 같이 알킨 작용기를 포함하는 반응성 분자에 말단 작용기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체를 커플링하여 얻을 수 있다. n은 1~10이다. R'은 H 또는 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 의 작은 알킬기일 수 있다.

[1092] 실시예 18

- (1) $\text{HO}_2\text{C-(CH}_2)_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{NHS} + \text{DCC} \rightarrow \text{NHSO-C(O)-(CH}_2)_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
- (2) $m\text{PEG-NH}_2 + \text{NHSO-C(O)-(CH}_2)_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{PEG-NH-C(O)-(CH}_2)_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

[1093]

[1094]

4-펜틴산(2.943 g, 3.0 mmol)을 CH_2Cl_2 (25 mL)에 용해시켰다. N-하이드록시숙신이미드(3.80 g, 3.3 mmol) 및 DCC(4.66 g, 3.0 mmol)를 첨가하고, 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 얻어진 미정제 NHS 에스테르 7을 추가 정제없이 하기 반응에 사용하였다.

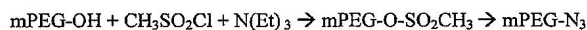
[1095]

분자량 5,000 Da의 mPEG-NH₂(mPEG-NH₂, 1 g, Sunbio)를 THF(50 mL)에 용해시키고, 혼합물을 4°C로 냉각시켰다. NHS 에스테르 7(400 mg, 0.4 mmol)을 세게 교반하면서 일부씩 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온하면서 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 물(2 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH_2Cl_2 (50 mL)를 첨가하

고, 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 부피를 약 2 mL로 감소시켰다. 이 CH_2Cl_2 용액을 에테르(150 mL)에 적가하였다. 얻어진 침전물을 수거하여 진공하에 건조시켰다.

[1096] 실시예 19

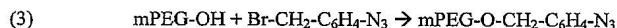
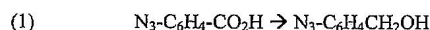
이 실시예는, 메탄설포네이트 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 메실레이트라 칭할 수도 있는 폴리(에틸렌 글리콜)의 메탄 설포닐 에스테르의 제조 방법을 예시한다. 상응하는 토실레이트 및 할라이드는 유사한 방법으로 제조할 수 있다.



톨루엔 150 mL 중 mPEG-OH(MW=3,400, 25 g, 10 mmol)를 질소하에 2시간 동안 공비 증류시키고, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 무수 트리에틸아민(15 mmol) 2.1 mL 및 무수 CH_2Cl_2 40 mL를 상기 용액에 첨가하였다. 이 용액을 얼음조에서 냉각시키고 증류된 메탄설포닐 클로라이드(15 mmol)를 적가하였다. 이 용액을 실온에서 질소하에 밤새 교반하고, 무수 에탄올 2 mL를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 혼합물을 진공하에 증발시켜 용매(주로 톨루엔 외의 용매)를 제거하고, 여과하고, 진공하에 다시 농축시킨 후, 100 mL의 디에틸 에테르로 침전시켰다. 여과물을 몇 분획의 냉각 디에틸 에테르로 세척하고 진공하에 건조시켜 메실레이트를 수득하였다.

메실레이트(20 g, 8 mmol)를 75 mL의 THF에 용해시키고, 이 용액을 4°C로 냉각시켰다. 냉각된 용액에 소듐 아지드(1.56 g, 24 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 질소하에 2시간 동안 가열 환류하였다. 그 후, 용매를 증발시키고, 잔류물을 CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석하였다. 유기 분획을 NaCl 용액으로 세척하고, 무수 MgSO_4 로 건조시켰다. 부피를 20 mL로 감소시키고, 150 mL의 냉각 무수 에테르를 첨가하여 생성물을 침전시켰다.

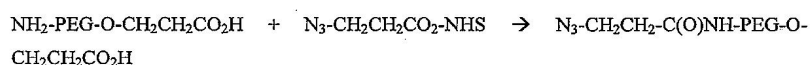
[1101] 실시예 20



본 명세서에서 참고로 포함하는 미국 특허 제5,998,595호에 기재된 방법을 이용하여 4-아지도벤질 알코올을 제조할 수 있다. 0°C에서 CH_2Cl_2 중 4-아지도벤질 알코올(1.75 g, 11.0 mmol) 용액에 메탄설포닐 클로라이드(2.5 g, 15.7 mmol) 및 트리에틸아민(2.8 mL, 20 mmol)을 첨가하고, 반응물을 냉장고에 넣어 16시간 동안 두었다. 통상적인 후처리에 의해 메실레이트를 연황색 오일로서 수득하였다. 이 오일(9.2 mmol)을 THF(20 mL)에 용해시키고, LiBr(2.0 g, 23.0 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 가열 환류한 후, 실온으로 냉각시켰다. 혼합물에 물(2.5 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트(3×15 mL)로 추출하고, 합한 유기층을 포화 NaCl 용액(10 mL)으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축시켜 목적 브로마이드를 얻었다.

mPEG-OH 20 kDa(2.0 g, 0.1 mmol, Sunbio)을 THF(35 mL)에 용해시킨 NaH(12 mg, 0.5 mmol)로 처리하고, 브로마이드(3.32 g, 15 mmol)를 촉매량의 KI와 함께 혼합물에 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 12시간 동안 가열 환류하였다. 상기 혼합물에 물(1.0 mL)을 첨가하고, 진공하에 용매를 제거하였다. 잔류물에 CH_2Cl_2 (25 mL)를 첨가하고, 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 부피를 약 2 mL로 감소시켰다. 에테르 용액(150 mL)에 적가하여 침전물을 얻고, 이것을 수거하여 mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃를 수득하였다.

[1105] 실시예 21



$\text{NH}_2\text{-PEG-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (MW 3,400 Da, 2.0 g)를 NaHCO_3 포화 수용액(10 mL)에 용해시키고, 이 용액을 0°C로 냉각시켰다. 3-아지도-1-N-하이드록시숙신이미도 프로피오네이트(5 당량)를 서서히 교반하면서 첨가하였다. 3시간 후, 20 mL의 H_2O 를 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 45분 동안 더 교반하였다. 0.5 N H_2SO_4 를 사용하여 pH를 3으로

조절하고, NaCl을 약 15 중량% 농도까지 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 (100 mL×3)로 추출하고, Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축시켰다. 냉각 디에틸 에테르로 침전시킨 후, 생성물을 여과로 수거하고, 진공하에 건조시켜 오메가-카복시-아지드 PEG 유도체를 수득하였다.

[1108] 실시예 22

[1109] $\text{mPEG-OMs} + \text{HC}\equiv\text{CLi} \rightarrow \text{mPEG-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-H}$

[1110] 당업계에 공지된 바와 같이 제조하여 -78°C 로 냉각시킨 THF 중 리튬 아세틸라이드(4 당량) 용액을 세계 교반하면서 THF 중에 용해시킨 mPEG-OMs 용액에 적가한다. 3시간 후, 반응물을 실온으로 가온하고 1 mL의 부탄올을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 그 후, 20 mL의 H_2O 를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 45분 동안 더 교반하였다. 0.5 N H_2SO_4 를 사용하여 pH를 3으로 조절하고, NaCl을 약 15 중량% 농도까지 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 (100 mL×3)로 추출하고, Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축시켰다. 냉각 디에틸 에테르로 침전시킨 후, 생성물을 여과로 수거하고, 진공하에 건조시켜 1-(부트-3-이닐옥시)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG)을 수득하였다.

[1111] 실시예 23

[1112] 문헌[L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500], 문헌[J.W. Chin et al., Science 301:964-7 (2003)], 문헌[J.W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027]; 문헌[J.W. Chin, & P.G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11):1135-1137]; 문헌[J.W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024]; 및 문헌[L. Wang, & P.G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11]에 기재된 방법을 이용하여 아지드 및 아세틸렌 함유 아미노산을 부위 특이적으로 단백질에 도입할 수 있다. 아미노산을 도입한 후, 2 mM PEG 유도체, 1 mM CuSO_4 , 및 약 1 mg Cu 와이어 존재하에 37°C 에서 4시간 동안, 인산염 완충액(PB)(pH 8) 중 0.01 mM 단백질을 사용하여 고리화첨가 반응을 수행하였다.

[1113] 실시예 24

[1114] 이 실시예는 p-아세틸-D,L-페닐알라닌(pAF) 및 m-PEG-하이드록실아민 유도체의 합성에 대해 설명한다.

[1115] 문헌[Zhang, Z., Smith, B.A.C, Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P.G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746]에 이전에 기재된 방법을 이용하여 라세미 pAF를 합성한다.

[1116] m-PEG-하이드록실아민 유도체를 합성하기 위해, 하기 절차를 수행한다. 실온(RT)에서 1시간 동안 교반한 디클로로메탄(DCM, 70 mL) 중 (N-t-Boc-아미노옥시)아세트산(0.382 g, 2.0 mmol) 및 1,3-디이소프로필카보디이미드(0.16 mL, 1.0 mmol) 용액에, 메톡시-폴리에틸렌 글리콜 아민(m-PEG-NH₂, 7.5 g, 0.25 mmol, Mt. 30 K, BioVectra 제품) 및 디이소프로필에틸아민(0.1 mL, 0.5 mmol)을 첨가한다. 반응물을 실온에서 48시간 동안 교반한 후, 약 100 mL로 농축시킨다. 이 혼합물을 냉각 에테르(800 mL)에 적가한다. t-Boc-보호된 생성물을 침전시켜 여과로 수거하고 에테르(3×100 mL)로 세척한다. 이것을 DCM(100 mL)에 재용해시켜 에테르(800 mL)로 2회 침전시킴으로써 추가 정제한다. 생성물을 진공하에 건조시켜, 7.2 g(96%)을 수득하고, NMR 및 니하이드린 테스트로 확인한다.

[1117] 상기에서 얻은 보호된 생성물(7.0 g)의 탈Boc를 50% TFA/DCM(40 mL)에서 0°C 에서 1시간 동안 수행한 후, 실온에서 1.5시간 동안 수행한다. 진공하에 TFA의 대부분을 제거한 후, 디옥산(1 mL) 중 4 N HCl을 잔류물에 첨가하여 하이드록실아민 유도체의 TFA 염을 HCl로 전환시킨다. 침전물을 DCM(50 mL)에 용해시키고, 에테르(800 mL)에 재침전시킨다. 여과에 의해 최종 생성물(6.8 g, 97%)을 수거하고, 에테르(3×100 mL)로 세척하고, 진공하에 건조시키고, 질소하에 저장하였다. 다른 PEG(5K, 20K) 하이드록실아민 유도체도 동일한 방법을 이용하여 합성한다.

[1118] 실시예 25

[1119] FGF-21 WT 및 30K PEG 유사체에 의해 유도된 ERK1/2 인산화의 분석:

[1120] 폴리-Lys 코팅 플레이트에서 100,000개 세포/웰(DMEM+10% FBS)로 인간 클로토 베타에 의해 안정하게 형질감염된 293 세포를 시딩한다. 다음 날, 세포가 100% 컨플루언시가 되면, 배지를 흡인하고 새로운 배지로 교환한 후 밤새 항온처리한다. 24시간 후 표준 FGF-21 WT를 사용하여 세포를 적절한 30K PEG FGF-21 유사체로 자극한다. 각각의 개별 화합물을 PBS/1% BSA에 용해시켜 조제한다. 세포를 37°C 항온처리기에서 10분 동안 삼중으로 처리한다. 10분 후, 각 웰로부터 항온처리 배지를 조심스럽게 흡인 제거하고, 프로테아제/포스파타제 억제제(PI 억제

일, Na_3VN_4 및 PMSF)를 함유하는 냉각 $1\times$ 세포 시그널링 용해 완충액(Cell Signaling Lysis Buffer) $40\ \mu\text{l}$ 를 각 웰에 첨가하여 세포 용해물을 제조한다. 96 웰/플레이트를 얼음 위에 20분 동안 두었다가 $4,000\ \text{rpm}$ 으로 10분 동안 회전시켜 가라앉힌다. 세포 용해물을 -80°C 에서 동결시킨다. 그 후, 각각의 시료를 해동시키고, $10\ \mu\text{l}$ 의 세포 용해물을, 비인산화 형태와 인산화 형태의 ERK1/2를 둘 다 포획하는 항체로 코팅된 MSD 처리 플레이트에 첨가한다. 1차 항체와의 항온처리를 2시간 동안 수행하고, 그 후 플레이트를 특정 완충액으로 몇 차례 세척한 뒤, 2차 항체를 첨가한다. 1시간 동안 항온처리한 후, 플레이트를 몇 차례 세척한다. 판독용 완충액을 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 MSD 판독기로 옮긴다. 생성된 곡선은 항인산화 ERK1/2 판독 장치에 기초한 것이며, EC_{50} 은 시그마 플롯을 사용하여 계산한다. 활성 손실 배수를, 30 K의 PEG화된 특정 화합물의 EC_{50} 을 WT의 EC_{50} 으로 나누어 계산한다.

[1121] 실시예 26: 세포 ERK 1/2 인산화 분석(pERK) 프로토콜 및 MSD 분석

[1122] 293 β 클로토-4 세포를 DMEM+10% FBS+P/S+0.5 mg/mL 제네티신에서 유지하였다. 세포가 50~90%의 컨플루언시에 도달했을 때, 세포를 트립신으로 처리하고, DMEM+10% FBS+P/S 중에서 폴리-D-Lys 코팅 96웰 플레이트에 웰당 100,000개 세포로 시딩하였다.

[1123] 세포가 약 100% 컨플루언시에 도달한 다음 날, 배지가 여전히 적색인지 확인한 후, 배지를 흡인하고, 웰당 $200\ \mu\text{l}$ 의 (PBS+1% BSA 중) FGF-21 변이체의 계열 희석액을 96웰 플레이트로 피펫팅하였다. 그 후, 96웰 플레이트를 37°C , 5% CO_2 항온처리기에 넣고 정확히 9분 동안 항온처리하였다. 그 후, FGF-21 처리물을 완전히 흡인하고, 새로 제조한 $1\times$ 세포 시그널링 용해 완충액, $1\times$ Sigma 프로테아제 억제제 콕테일, 2 mM 소듐 오르토바나데이트, 1 mM PMSF, $1\times$ MSD 포스파타제 억제제 I, $1\times$ MSD 포스파타제 억제제 II, $1\times$ MSD 프로테아제 억제제 콕테일, 2 mM MSD PMSF를 웰당 $40\ \mu\text{l}$ 첨가하였다. 디쉬를 얼음 위에 놓고 P20 피펫터를 사용하여 각 웰의 내용물을 위 아래로 피펫팅하여 용해물을 혼합하면서 25분 동안 두었다. 웰을 혼합한 후, 얼음이 딱찬 용기 및 디쉬에 넣어, 4°C 진탕기에서 나머지 시간 동안 두었다. 25분 후, 4°C 에서 $4,000\ \text{rpm}$ 으로 10분 동안 플레이트를 회전시켜 가라앉힌다. 상청액을 얼음 위의 냉각 둥근 바닥 96웰 플레이트로 옮긴다.

[1124] MSD 분석

[1125] 이 분석은 Meso Scale Discovery MULTI-SPOT Assay System 전세포 용해물 키트 Phospho(T/Y 202/204; 185/187)/Total - ERK1/2/ Assay를 이용하여 수행하였다.

[1126] 모든 MSD 시약을 해동시켜 실온으로 만들고 필요한 모든 완충액은 키트 설명서에 따라 제조하였다. 포스포ERK-토탈ERK 듀플렉스 플레이트의 각 웰에 $150\ \mu\text{l}$ 의 Blocker A를 첨가하고, 진탕기 위에 놓고 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 그 후, 플레이트를 웰당 $160\ \mu\text{l}$ 의 $1\times$ 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 웰당 $16\ \mu\text{l}$ 의 용해 완충액, 프로테아제 및 포스파타제 억제제(세포 자극을 위해 미리 제조함)를 첨가하고, 냉각 용해물 상청액 플레이트로부터 웰당 $10\ \mu\text{l}$ 를 덜어 MSD 플레이트 웰로 옮겼다(이로써 전체 부피가 웰당 $26\ \mu\text{l}$ 가 되었음). 상기 MSD 플레이트를 실온에서 3시간 동안 진탕기 위에서 항온처리한 후, 웰당 $160\ \mu\text{l}$ 의 $1\times$ 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 웰당 $25\ \mu\text{l}$ 의 검출 항체(항체 희석 완충액으로 50배 희석함)를 첨가하고 진탕기 위에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 다시 웰당 $160\ \mu\text{l}$ 의 $1\times$ 세척 완충액으로 4회 세척하고, 웰당 $150\ \mu\text{l}$ 의 $1\times$ 판독 완충액 T를 첨가한 후, MSD Sector Imager 2400 기계에서 플레이트를 즉시 판독하였다.

[1127] BCA 정량

[1128] Pierce BCA 단백질 분석 키트를 사용하였다. 96웰 플레이트에서 BSA 표준 물질을 $1\times$ 세포 시그널링 용해 완충액으로 최고 농도 $2\ \text{mg/mL}$ 로부터 시작하여 컬럼 아래로 내려가면서 2배씩 희석하였다(마지막 웰 세트는 완충액이었음, 즉, BSA 비함유). 웰당 $25\ \mu\text{l}$ 의 BSA 표준 물질을 2개의 MaxiSorp 96웰 플레이트에 이중으로 피펫팅하였다. $1\times$ 세포 시그널링 용해 완충액으로 용해물의 3배 희석액을 제조하고 웰당 $25\ \mu\text{l}$ 를 MaxiSorp 플레이트에 첨가하였다. Pierce 키트 설명서에 따라 워킹 시약(Working Reagent)을 제조하고, $200\ \mu\text{l}$ 를 MaxiSorp 플레이트의 각 웰에 피펫팅하였다. 플레이트를 실온에서 항온처리하고, 플레이트 판독기로 $\lambda=562\ \text{nm}$ 에서 판독하였다.

[1129] 데이터 분석

[1130] BCA 키트를 사용하여 모든 용해물에 대해 농도를 계산하였다. 용해물의 농도가 모두 유사할 경우, MSD 분석에 대해 정규화하지 않는다. MSD 분석을 위해, 평균 중복 포인트, 표준 편차 및 CV 값을 계산한다. SigmaPlot을 이용하여, FGF-21 변이체의 계열 희석액에 대한 EC_{50} 값을 계산하고, 변이체에 대한 등급 기준으로서 Fold Above

WT EC₅₀을 이용한다. 결과는 본 출원의 도 7a 및 7b에서 확인할 수 있다.

[1131] 실시예 27: FGF-21 비태깅 하류 과정

[1132] 봉입체 조제물 가용화

[1133] 4℃ 봉입체(IB) 완충액 I(50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 4℃)에 최종 고체 농도가 10%가 되도록 혼합하여 세포 페이스트를 재현탁시켰다. 재현탁된 물질을 마이크로플루이다이저에 총 2회 통과시켜 세포를 용해한 후, 원심분리하고(10,000 g; 15분; 4℃), 상청액을 경사 분리하였다. IB 펠릿을 추가분의 IB 완충액 I(50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 4℃)에 재현탁시켜 세척하고, 재현탁된 물질을 마이크로플루이다이저에 총 2회 통과시킨 후, 원심분리하고(10,000 g; 15분; 4℃), 상청액을 경사 분리하였다. IB 펠릿을 1배 부피의 완충액 II(50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁시킨 후, 원심분리하고(10,000 g; 15분; 4℃), 상청액을 경사 분리하였다. 그 후, IB 펠릿을 1/2 부피의 완충액 II(50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁시켰다. IB를 적절한 용기에 분액한 후, 원심분리하고(10,000 g; 15분; 4℃), 상청액을 경사 분리하였다. 봉입체를 가용화하였다(이때가 후속 사용시까지 -80℃에서 저장할 수 있는 시점임).

[1134] 봉입체 가용화

[1135] 봉입체를 가용화 완충액(20 mM Tris, pH 8.0; 8 M 요소; 10 mM β-ME)에 최종 농도가 10~15 mg/mL가 되도록 가용화하고 가용화된 IB를 실온에서 일정하게 혼합하면서 1시간 동안 항온처리하였다. 여과(0.45 μm PES 필터)에 의해 불용물을 제거하고, (단백질 농도가 높을 경우) 추가분의 가용화 완충액으로 희석하여 단백질 농도를 조절하였다(항상 필요한 것은 아님).

[1136] 재폴딩

[1137] 4℃의 20 mM Tris(pH 8.0)에 최종 단백질 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 희석하여 재폴딩하였다. 4℃에서 18~24시간 동안 재폴딩하였다.

[1138] 정제

[1139] 재폴딩 반응물을 0.45 μm PES 필터를 통해 여과하였다. 완충액 A(20 mM Tris, pH 7.5)로 평형화한 Q HP 컬럼(GE Healthcare)에 물질을 로딩하였다. 20CV 내지 100% 완충액 B(20 mM Tris, pH 7.5; 250 mM NaCl)의 선형 구배로 FGF-21을 용리시켰다. 단량체 FGF-21을 모았다.

[1140] PEG화 및 정제

[1141] Q HP 폴을 취하여, 완충액을 20 mM Tris(pH 8.0); 2 M 요소; 1 mM EDTA로 교환하였다. 50% 빙초산을 사용하여 pH를 4.0으로 떨어뜨렸다. 시료를 4.0±1.0 mg/mL까지 농축시킨다. 12:1 몰 과량의 PEG를 첨가하고, 최종 농도가 1%가 되도록 시료에 아세트 하이드라이드(pH 4.0)를 첨가한다. 28℃에서 48~72시간 동안 항온처리한다. PEG 반응물에 최종 농도 50 mM의 Tris 염기를 첨가하고 RO 수로 10배 희석한다. 전도율 < 1 mS/cm, pH 8.0~9.0으로 맞춘다. 완충액 A(20 mM Tris, pH 8.0)로 평형화한 Source 30Q 컬럼(GE Healthcare)에 물질을 로딩한다. 20CV 내지 100% 완충액 B(20 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl)의 선형 구배로 PEG-FGF-21을 용리시켰다. 단량체 PEG-FGF-21을 모아서, 완충액을 20 mM Tris(pH 7.4); 150 mM NaCl로 교환한다. PEG 물질을 1~2 mg/mL로 농축시키고, 0.22 μm PES 필터를 사용하여 필터 멸균한다. 4℃에 저장한다. 장기간 저장을 위해, 급속 냉동시켜 -80℃에 저장한다.

[1142] 실시예 28

[1143] 라트에서의 FGF-21 화합물의 약동학적 특성

[1144] 이 프로토콜을 이용하여, 카테터 삽입 라트에서 Ambrx 독점 기술에 의해 제조된 천연 및 PEG 변형 FGF-21 화합물의 약동학적 특성에 대한 데이터(도 11~23에 나타냄)를 제공하였다. 테스트 물질의 약동학적 특성은 약물 투여 후의 특정 시점에 얻은 혈청 시료의 인간 FGF-21에 대해 특이적인 ELISA에 의해 분석하였다.

[1145] 테스트 물질:

[1146] 1. Ambrx 화합물 PEG-R77 FGF-21은 1× PBS에 희석된 0.25 mg/ml로 사용된다.

[1147] 2. Ambrx 화합물 PEG-Y104 FGF-21은 1× PBS에 희석된 0.25 mg/ml로 사용된다.

- [1148] 3. Ambrx 화합물 PEG-R126 FGF-21은 $1 \times$ PBS에 희석된 0.25 mg/ml로 사용된다.
- [1149] 테스트 물질 품질/제제:
- [1150] 저장 농도 =
- [1151] 1.0 mg/mL PEG-R77 FGF-21
- [1152] 1.16 mg/mL PEG-Y104 FGF-21
- [1153] 1.08 mg/mL PEG-R126 FGF-21
- [1154] 동물:
- [1155] Ambrx에 도착하기 전, 연구 초기에 체중이 약 250~275 g인 수컷 스프래그-돌리(SD) 래트 12마리에 경정맥 카테터를 수술로 삽입하였다. 양호한 조건에서 CRL로부터 동물을 입수하여 연구 시작 적어도 3일 동안 연구 장소에 순응시켰다. 테스트 물질 투여 당일 래트의 체중을 측정하였다. 동물은 병원균이 없는 표준 조건에서 사료와 물을 무제한 공급하여 사육하였다.
- [1156] 동물군: 모든 화합물은 피하 투여된다.
- [1157] 1군 (n=4): PEG-R77 SC 주사(0.25 mg/kg).
- [1158] 2군 (n=4): PEG-Y104 SC 주사(0.25 mg/kg).
- [1159] 3군 (n=4): PEG-R126 SC 주사(0.25 mg/kg).
- [1160] 테스트 물질 투여 전에 동물의 체중을 측정한다. $1 \times$ BW(μ l)로 투여되도록 화합물을 조제한다. 테스트 물질의 피하 투여는 등쪽 어깨 부분에 주사하여 실시한다. 동물에게 테스트 물질을 1회 주사한다(시점 = 0). 특정 시점(하기 참조)에, 동물로부터 전혈을 취하여 SST 마이크로테이너(microtainer) 수집 튜브에 모은다. 원심분리 전 30분 동안 혈청을 응고시킨다. 혈청을 폴리프로필렌 적정 튜브로 옮겨서, 마이크로스트립으로 밀봉하고, FGF-21 혈청 농도를 측정하기 위해 ELISA로 분석하기 전까지 -80°C 에 저장한다.
- [1161] 데이터 수집/중점:
- [1162] 각각의 동물이 전체 PK 시간 코스에 사용된다. 경정맥 카테터로부터 전혈 약 0.25 mL를 취한다. 혈액 수집 직후, 카테터를 0.1 mL의 염수로 수세한다. 테스트 물질의 예상 약동학적 프로필에 기초할 때, 테스트 물질을 투여받은 동물에 대해 하기 수집 시점이 필요하다:
- [1163] 채혈 전, 투여 후 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72 및 96시간째.
- [1164] 종료:
- [1165] 연구 완료 후 모든 동물을 마취시킨다.
- [1166] 결과:

[1167] 결과는 하기 표 및 본 출원에 첨부된 도면에 제시된다.

FGF21 PEG 이성질체 PK 특성 - IV

PEG 30K 이성질체	정맥내 0.25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
람다 _z	1/hr	0.057		0.043			0.044		0.052
람다 _{z_lower}	hr	8		8			8		8
람다 _{z_upper}	hr	48		48			48		48
HL_람다 _z	hr	12.27		16.44			15.61		13.67
Tmax	hr	0.25		0.25			0.25		0.3125
Cmax	ng/mL	5998.6		5802.3			7821.4		8655.8
C0	ng/mL	6861.4		6662.5			9280.1		9149.9
AUCINF_obs	hr·ng mL	53714.9		52962.1			69435.8		86554.6
Vz_obs	mL/kg	82.46		113.10			81.65		58.06
Cl_obs	mL/hr/kg	4.65		4.74			3.61		2.92
MRTINF_obs	hr	14.49		13.81			16.18		14.83
Vss_obs	mL/kg	67.46		65.53			58.53		43.48

FGF21 PEG 이성질체 PK 특성 - SC

PEG 30K 이성질체	피하 0.25 mg/kg								
		R72	R77	H87	E91	Y104	E110	R126	P146
람다 _z	1/hr	0.049		0.043	0.035				0.0317
람다 _{z_lower}	hr	24		24	24				24
람다 _{z_upper}	hr	96		90	96				96
HL_람다 _z	hr	14.72		16.14	19.93				22.01
Tmax	hr	24		24	22				24
Cmax	ng/mL	254.5		174.3	229.7				321.3
AUCINF_obs	hr·ng mL	11824.7		8206.7	12177.2				15908.4
Vz_obs	mL/kg	458.9		731.1	606.2				503.4
Cl_obs	mL/hr/kg	21.92		31.67	20.91				15.86
MRTINF_obs	hr	36.52		36.31	40.35				40.07

[1168]

[1169] PEG화 화합물의 증가된 T_{max}

[1170] PEG화 화합물의 증가된 T_{1/2}

[1171] PEG화 화합물의 증가된 AUC

[1172] PEG화 부위 의존적 PK 특성

[1173] 실시예 29

[1174] PEG화 FGF-21의 생체내 연구

[1175] PEG-FGF-21, 비변형 FGF-21 및 완충제 용액을 마우스 또는 래트에게 투여한다. 결과는 비변형 FGF-21에 비해 본 발명의 PEG화 FGF-21이 활성이 우수하고 반감기가 길다는 것을 보여준다. 유사하게, 변형 FGF-21, 비변형 FGF-21 및 완충제 용액을 마우스 또는 래트에게 투여한다.

[1176] 약동학적 분석

[1177] WO 2005/091944는 본 발명의 FGF-21 화합물을 사용하여 수행할 수 있는 약동학적 연구에 관해 기재한다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는 마우스에 정맥 또는 피하 경로로 투여한다. 투여 전과 투여 후 시점에 동물로부터 채혈을 실시한다. 각 시료로부터 혈장을 수집하여 방사능 면역분석법으로 분석한다. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 FGF-21 및 야생형 FGF-21 또는 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드의 다양한 형태들의 제거 반감기를 계산하여 서로 비교할 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드를 사이노물거스 원숭이에게 투여할 수 있다. 투여 전과 투여 후 시점에 동물로부터 채혈을 실시한다. 각 시료로부터 혈장을 수집하여 방사능 면역분석법으로 분석한다.

[1178] 본 발명의 폴리펩티드는 ZDF 수컷 래트(당뇨병 비만 래트; 연구 시작시 8주령, Charles River-GMI)에게 투여할 수 있다. 래트에게 Purina 5008 사료를 무제한 공급하였다. 하기 테스트 군을 셋팅한다: 염수; 인슐린 4 U/일; FGF-21, 500 µg/일 급성(급성 투여군에는 1회 투여하고, 투여 후 T = 0, 2, 4, 8 및 24시간째 채혈함); FGF-21, 100 µg/일; FGF-21, 250 µg/일; FGF-21, 500 µg/일; FGF-21(1일 1회) 500 µg/ml; 비비만용(lean) 염수; 비비만용 인슐린 4 U/일; 비비만용 FGF-21 500 µg/일. 비비만 군은 비당뇨병의 비비만 ZDF 래트를 나타낸다.

- [1179] 연구 기간(7일) 동안 매일 1회 주사를 투여받은 500 $\mu\text{g}/\text{일}$ 의 제2 군을 제외하고 화합물을 피하 주사한다(b.i.d.). 대조군 래트에게는 비이클(PBS; 0.1 ml)을 주사한다. 투여 7일 후, 동물에 대해 경구 당불내성 검사를 실시한다. 마취제 없이 꼬리 클립 채혈로 글루코스 및 중성 지방을 테스트하기 위한 혈액을 수집한다. FGF-21 폴리펩티드는 용량 의존적으로 혈장 글루코스 수치를 낮출 수 있다. 비비만 ZDF 래트는 인슐린을 투여한 래트와 비교할 때 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드에 노출된 후 저혈당이 되지 않을 수 있다.
- [1180] ob/ob 비만 모델
- [1181] ob/ob 마우스 모델은 고혈당증, 인슐린 내성 및 비만에 대한 동물 모델이다. 비이클 및 인슐린 대조군과 비교해서 FGF-21 폴리펩티드로 처리한 후의 혈장 글루코스 수치를 ob/ob 마우스에서 측정할 수 있다. 이 비만 모델에서, 수컷 ob/ob 마우스(7 주령)의 테스트 군에 비이클 단독(PBS), 인슐린(4 U/일) 또는 FGF-21 폴리펩티드(5 $\mu\text{g}/\text{일}$ 및 25 $\mu\text{g}/\text{일}$)을 7일 동안 피하 주사한다(0.1 ml, b.i.d.). 제1 화합물 주사 후 1일, 3일 및 7일째 꼬리 클립 채혈에 의해 혈액을 수집하고, 표준 프로토콜을 이용하여 혈장 글루코스 수치를 측정한다. 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드는, 이것이 비이클 대조군에 비해 혈장 글루코스 수치를 줄일 수 있다면, 글루코스 흡수를 촉진한다. 다른 분자와 비교하여 본 발명의 FGF-21 폴리펩티드로 처리한 후 중성 지방 수치를 비교할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 다회 투여, 연속 주입 또는 1회 투여 등의 방식으로 마우스에게 투여될 수 있다.
- [1182] 실시예 30
- [1183] FGF21 유사체의 약동학적 평가: 다양한 PEG 접합 부위를 갖는 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 유사체의 약동학적 특성을 래트에서 평가하였다. 연구된 다른 파라미터는 PEG MW 및 투여된 화합물의 용량이었다. 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 변이체의 퍼센트 생체이용률을 측정하였다.
- [1184] 동물: 모든 동물들은 실험 동물 사용 관리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. 수컷(175~300 g) 스프래그-돌리 래트를 찰스 리버 레보라토리로 부터 입수하였다. 래트를 실내의 우리 안에 넣어 12시간의 명/암 주기로 개별적으로 사육하였고, 적어도 실험 전 3일 동안 Ambrx 동물 사육실에 순응시켰다. 동물에게 품질보증 푸리나(Purina) 설치류 사료 5001과 물을 무제한 공급하였다.
- [1185] 투여 및 혈청 수집: 운송 전에 CRL에 의한 혈액 수집을 위해 경정맥에 카테터를 외과적으로 삽입하였다. 성공적인 카테터 개방 후, 투여 전에 동물들을 처리군에 할당하였다. 1회 용량의 화합물을 1 mL/kg의 용량으로 정맥내 또는 피하 투여하였다. 허가 증명서(Certificate of Release)에 지정된 저장 농도를 이용하여 PBS에 희석하여 화합물 용량 농도를 만들었다. 삽입된 카테터를 통해 다양한 시점에 혈액 시료를 수집하여 SST 마이크로튜브 튜브에 넣었다. 원심분리 후 혈청을 수집하고, 분석시까지 -80°C 에 저장하였다.
- [1186] 약동학적 분석: 스프래그-돌리 래트 혈청 중 PEG-FGF-21의 정량을 위한 분석은 미국 캘리포니아주 라 호야 소재의 Ambrx Inc.에서 개발하였다. 마이크로플레이트 웰을, 포획제로서 사용되는 염소 항인간 FGF-21 IgG 다클론 항체(PAb; RnD Systems, 클론 AF2539)로 코팅한다. 표준(STD) 및 품질 관리(QC) 시료(둘 다 PEG-FGF-21 유사체를 100% 스프래그-돌리 래트 혈청에 스파이킹해서 제조함) 및 연구 시료를, I-블록 완충액으로 1:100으로 전처리한 후 웰에 로딩한다. STD, QC 및 연구 시료 중의 FGF-21은 고정화된 PAb에 의해 포획된다. 비결합 물질은 웰을 세척하여 제거한다. 바이오틴 염소 항인간 FGF-21 IgG PAb(RnD Systems, 클론 BAF2539)를 웰에 첨가한 후, 세척 단계를 실시하고, 포획된 PEG-FGF-21의 검출을 위해 스트렙타비딘 호스래디쉬 퍼옥시다제(SA-HRP; RnD Systems, 카탈로그 번호 DY998)를 첨가한다. 추가 세척 단계 후, 테트라메틸벤지딘(TMB, Kirkegaard Perry Laboratories) 기질 용액을 웰에 첨가한다. TMB는 HRP 존재하에 퍼옥시드와 반응하여 초기 단계에서 포획제에 결합된 PEG-FGF-21 유사체의 양에 비례하여 비색계 신호를 생성한다. 색 발현은 2 N 황산을 첨가하여 중단시키고, 450 nm에서 색 강도(흡광도, OD)를 측정한다. 연구 시료 및 QC에 대한 OD 단위의 농도로의 전환은, 동일한 플레이트에서 표준 곡선에 대한 컴퓨터 소프트웨어 매개 비교를 통해 행하고, 이것을 Softmax Pro v5 데이터 축소 패키지를 사용하여 5-파라미터 로지스틱 회귀 모델에 따라 회귀 분석을 한다. 결과는 ng/mL 농도 단위로 기록한다.
- [1187] 또한, 이중 항체 샌드위치 분석 또는 당업자에게 알려져 있는 다른 방법에 의해 농도를 측정할 수 있다. 농도는 해당 투여 화합물로부터 생성된 표준 곡선을 이용하여 계산하였다. 약동학적 파라미터는 모델링 프로그램 WinNonlin(Pharsight, 버전 4.1)을 이용하여 추정하였다. 리니어 업/로그 다운 사다리꼴 적분을 이용한, 개별 동물 데이터에 대한 비구획 분석을 이용하였고, 농도 데이터에는 균일하게 가중치를 두었다.
- [1188] 결론: WT N6-His FGF21의 약동학적 특성은 문헌[Kharitononkov et al., 2005]에 보고된 것과 일치하였으며, 비

태깅 WT FGF21 단백질과 유사하였다.

[1189] 30KPEG-pAF(N6-His)FGF21 이성질체의 약동학적 프로파일은, WT(비PEG화) FGF21로부터 얻은 결과와 비교할 때 30 kDa PEG 분자를 첨가하는 것에 의해 현저히 증가하였다.

[1190] PEG화 화합물은, 0.25 mg/kg의 수준으로 피하 투여될 때 현저히 상이한 PK 프로파일을 나타내었다. H87 및 L86은 다른 이성질체와 비교할 때 하위의 PK 특성을 갖는 경향이 있었다. 또한, R131 및 Q108 PEG30 화합물은 차등적으로 우수한 PK 특성을 나타내었다. 더 구체적으로, 이들 화합물은 AUC, C_{max} 및 종말 반감기를 향상시켰다. 심층(in-depth) 구조-활성 분석은 각각의 이성질체의 다양한 PK 특성에 대한 구조적 설명을 제공할 수 있다.

[1191] PEG 분자량의 비교는 30KPEG-pAF91(N6-His)FGF21이 20KPEG-pAF91(N6-His)FGF21보다 약간 더 긴 순환 지속성을 갖는다는 것을 나타내었다. 그러나, 20 kDa 이성질체가 더 높은 C_{max} 값을 가졌기 때문에, 두 화합물에 대한 총 AUC_{inf}는 유사하였다. 20 kDa 동형체에 대한 생체이용률은 30%로서 20%인 30 kDa 변이체보다 약간 더 우수하였다.

[1192] [표 3] 래트에 있어서 0.25 mg/kg으로 피하 투여된 화합물에 대한 약동학적 파라미터값

0.25 mg/kg SC	종말 $t_{1/2}$ hr	Tmax hr	Cmax ng/mL	AUC _{all} hr·ng/mL	AUC _{INF} hr·ng/mL	Vz/f mL/kg	Cl/f mL/hr/kg	MRT _{INF} hr
N6His WT	1.26	0.9	92.1	261.6	297.3	1768.9	971.2	2.52
PP WT	1.19	1.5	96.6	259.8	294.7	1576.2	910.4	2.53
R72	14.72	24	254.5	NE	11824.7	458.9	21.9	36.52
R77	32.30	22	237.0	14571.9	17687.8	655.8	14.4	59.18
L86	33.90	27	52.2	3215.7	3928.8	3153.3	66.0	59.27
H87	16.14	24	174.3	NE	8206.7	731.1	31.7	36.31
E91	19.93	22	229.7	NE	12177.2	606.2	20.9	40.35
Y104	12.37	24	321.9	19085.8	21188.1	416.3	11.9	47.63
Q108	27.31	24	590.3	31837.4	36387.1	272.4	7.0	51.71
R126	16.48	20	248.1	13238.3	15033.4	643.0	16.8	49.57
R131	26.13	24	545.4	27373.4	30786.0	315.0	8.3	50.41
P146	22.01	24	321.3	NE	15908.4	503.4	15.9	40.07

[1193]

[1194] 비구획 분석(Pharsight, 버전 4.1)에 의해 혈청 농도 대 시간 곡선을 평가하였다. 화합물당 래트수 3~4. ND: 수행하지 않음; NE: 평가하지 않음.

[1195] T_{max} : C_{max} 에 도달하는 데 걸리는 시간; C_{max} : 최고 농도; 종말 $t_{1/2}$: 종말 반감기; AUC_{last}: 마지막 혈장 시료/시점까지의 농도-시간 곡선 아래의 면적; AUC_{inf}: 무한대까지 외삽한 농도-시간 곡선 아래의 면적; MRT: 평균 체류 시간; Cl/f: 겉보기 총 혈장 제거율; Vz/f: 종말기 동안의 겉보기 분포 부피.

[1196] [표 4] 래트에 있어서 0.25 mg/kg으로 피하 투여된 20KPEG-pAF91(N6-hHis)FGF21에 대한 약동학적 파라미터값

		래트 #1	래트 #2	래트 #3	래트 #4
종말 $t_{1/2}$	hr	22.6	24.4	17.3	16.9
Tmax	hr	8	8	8	24
Cmax	ng/mL	163.0	182.1	155.7	88.8
AUC _{all}	hr·ng/mL	7629.1	7659.1	6461.4	4375.4
AUC _{INF}	hr·ng/mL	8232.0	8333.8	6661.2	4521.7
Vz/f	mL/kg	989.8	1054.2	937.3	1347.7
Cl/f	mL/hr/kg	30.4	30.0	37.5	55.3
MRT _{INF}	hr	39.9	41.0	32.5	34.3

[1197]

[1198] 비구획 분석(Pharsight, 버전 4.1)에 의해 농도 대 시간 곡선을 평가하였다. ND: 수행하지 않음; NE: 평가할 수 없었음. T_{max} : C_{max} 에 도달하는 데 걸리는 시간; C_{max} : 최고 농도; 종말 $t_{1/2}$: 종말 반감기; AUC_{last}: 마지막 혈장 시료/시점까지의 농도-시간 곡선 아래의 면적; AUC_{inf}: 무한대까지 외삽한 농도-시간 곡선 아래의 면적; MRT: 평균 체류 시간; Cl/f: 겉보기 총 혈장 제거율; Vz/f: 종말기 동안의 겉보기 분포 부피.

[1199] 실시예 31

- [1200] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21의 안전성 및/또는 효능의 인간 임상 시험
- [1201] 목적
- [1202] 피하 투여된, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 재조합 인간 FGF-21의 안전성 및 약동학적 특성을 관찰하는 것이다.
- [1203] 환자
- [1204] 20~40세이고 체중이 60~90 kg인 18명의 건강한 지원자들을 이 연구에 등록시킨다. 이 피험체들은 혈액 검사 또는 혈청 화학 검사, 및 음성 노 독성 스크린, HIV 스크린 및 B형 간염 표면 항원에 대해 임상적으로 유의한 비정상적인 실험값을 나타내지 않는다. 이들은 다음 중 어느 하나에도 해당되지 않아야 한다: 고혈압; 임의의 원발성 혈액 질환의 병력; 심각한 간, 신장, 심혈관, 위장관, 비뇨생식기, 대사, 신경 질환의 병력; 빈혈 또는 발작 장애의 병력; 박테리아 또는 포유동물 유래 제품, PEG, 또는 인간 혈청 알부민에 대해 알려진 감수성; 카페인 함유 음료의 상습적 다량 소비자; 연구 시작 전 30일 이내에 임의의 다른 임상 시험에 참가했거나 혈액을 수혈받았거나 헌혈한 적이 있는 자; 연구 시작 전 3개월 이내에 FGF-21에 노출된 자; 연구 시작 전 7일 이내에 질환을 앓은 적이 있는 자; 및 연구 시작 전 14일 이내에 연구 전 신체 검사 또는 임상 시험 평가에서 유의한 이상을 나타낸 자. 모든 피험체에 대해 안전성을 평가할 수 있고, 계획대로 약동학적 분석을 위한 모든 채혈을 실시한다. 모든 연구는 윤리 위원회의 승인과 환자의 동의하에 수행된다.
- [1205] 연구 디자인
- [1206] 이 연구는 건강한 남성 지원자들을 대상으로 한 I 기, 단일 센터, 공개, 무작위, 두 기간 교차 연구이다. 18명의 피험체를 2개의 치료 순서 군 중 하나(군당 9명의 피험체)에 무작위로 배정한다. 독립된 두 투여 기간에 걸쳐, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21 및 시판되는 제품 중 선택된 것을 동량으로 사용하여 상대투부에 볼투스 피하 주사로서 FGF-21을 투여한다. 시판되는 제품의 투여량 및 투여 빈도는 포장 라벨에 표시된 것과 같다. 추가의 피험체 군을 포함시킴으로써, 시판되는 제품을 사용하여, 추가 투여량, 투여 빈도, 또는 필요에 따라, 다른 파라미터를 연구에 포함시킬 수 있다. 각각의 투여 기간 사이에 14일간의 워시아웃(washout) 기간을 둔다. 피험체들은 두 투여 기간 각각에 대해 적어도 투여 전 12시간에서 투여 후 72시간까지만 연구 센터에 있고 투여 기간 사이에는 그렇지 않다. 또한 PEG화 FGF-21에 대해 테스트할 추가 투여량, 투여 빈도 또는 다른 파라미터가 존재할 경우, 추가의 피험체 군을 연구에 포함시킬 수 있다. FGF-21의 실험 제제는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21이다.
- [1207] 채혈
- [1208] FGF-21 투여 전과 투여 후에 직접 정맥 천자를 통해 연속적으로 채혈하였다. 혈청 FGF-21 농도 측정을 위해 정맥혈 시료(5 mL)를 투여 전 약 30분, 20분 및 10분째에 입수하고(3개의 기저선 시료), 투여 후 대략 30분, 1시간, 2시간, 5시간, 8시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간째 입수한다. 각각의 혈청 시료를 2개의 분액으로 나눈다. 모든 혈청 시료를 -20℃에 저장한다. 혈청 시료는 드라이 아이스에 넣어 운송한다. 금식 임상 검사실 검사(혈액 검사, 혈청 화학 검사 및 노 검사)는 제1일에 최초 투여 직전, 제4일 아침, 제16일 투여 직전 및 제19일 아침에 수행한다.
- [1209] 생물학적 분석 방법
- [1210] 혈청 FGF-21 농도를 측정하는 데 ELISA 키트를 사용한다.
- [1211] 안전성 측정
- [1212] 매회 투여 직전(제1일 및 제16일)과, 매회 투여 후 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간째 바이탈 사인을 기록한다. 안전성 판단은 유해 사례의 발생률 및 유형과 임상 검사실 검사에 있어서 기저선으로부터의 변화에 기초한다. 또한, 혈압을 비롯한 바이탈 사인 측정 및 신체 검사 결과에 있어서 연구 전으로부터의 변화를 평가한다.
- [1213] 데이터 분석
- [1214] 투여 후 혈청 농도값은, 투여 후의 각각의 값으로부터, 투여 전 30분, 20분 및 10분째 수집된 3개 시료의 FGF-21 수치를 평균내어 결정한 평균 기저선 FGF-21 농도를 뺀으로써, 투여 전 기저선 FGF-21 농도에 대해 보정한다. 투여 전 혈청 FGF-21 농도가 분석의 정량 수치 미만인 경우, 이 농도는 평균값 계산에 포함시키지 않는다. 약동학적 파라미터는 기저선 FGF-21 농도에 대해 보정된 혈청 농도 데이터로부터 결정된다. 약동학적 파

라미터는 최신 버전의 BIOAVL 소프트웨어를 사용하여 Digital Equipment Corporation VAX 8600 컴퓨터 시스템에서 모델 독립적 방법에 의해 산출한다. 하기 약동학적 파라미터를 결정한다: 최고 혈청 농도(C_{max}); 최고 혈청 농도까지 걸리는 시간(t_{max}); 선형 사다리꼴 법칙을 이용하여 계산한 0시간 내지 마지막 채혈 시간(AUC_{0-72})의 농도-시간 곡선 아래의 면적(AUC); 및 제거율 상수로부터 산출된 종말 제거 반감기($t_{1/2}$). 제거율 상수는 로그-선형 농도-시간 플롯의 종말 선형 영역에서의 연속 데이터 점의 선형 회귀에 의해 추정한다. 각각의 처리군에 대해 약동학적 파라미터의 평균, 표준 편차(SD) 및 변동 계수(CV)를 산출한다. 파라미터 평균의 비(보존 제제/비보존 제제)를 산출한다.

[1215] 안전성 결과

[1216] 유해 사례 발생률은 처리군 전반에 동일하게 분포한다. 기저선 또는 연구 전 임상 검사실 검사 또는 혈압으로부터 임상적으로 유의한 변화는 없고, 신체 검사 결과 및 바이탈 사인 측정에 있어서도 연구 전으로부터 뚜렷한 변화가 없다. 두 처리군에 대한 안전성 프로파일은 유사한 것으로 보인다.

[1217] 약동학적 결과

[1218] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21을 투여한 후 18명의 피험체 모두에 대해 평균 혈청 FGF-21 농도-시간 프로파일(기저선 FGF-21 수치에 대해 보정하지 않음)을 각각의 시점에서 측정하였다. 모든 피험체들은 정상적인 생리학적 범위 내의 투여 전 기저선 FGF-21 농도를 나타내어야 한다. 약동학적 파라미터는 투여 전 평균 기저선 FGF-21 농도에 대해 보정된 혈청 데이터로부터 결정되고, C_{max} 및 t_{max} 가 결정된다. 선택된 임상 비교 대상(들)에 대한 평균 t_{max} 는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21에 대한 t_{max} 보다 현저히 더 짧다. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21에 대한 종말 반감기와 비교할 때, 테스트된 임상 전 비교 대상(들)의 종말 반감기 값이 현저히 더 짧다.

[1219] 본 연구는 건강한 남성 피험체를 대상으로 수행되었지만, 다른 환자 집단, 예를 들면 암 또는 만성 신부전증을 앓고 있는 남성 또는 여성 환자, 소아 신부전증 환자, 자가조직 예치(autoologous predeposit) 프로그램의 환자, 또는 선택 수술이 예정된 환자에 있어서도 유사한 흡수 특징 및 안전성 프로파일 예상된다.

[1220] 결론적으로, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21의 단일 용량 피하 투여는 건강한 남성 피험체에 있어서 안전하고 허용성이 좋다. 유해 사례의 상대 발생률, 임상 검사값, 바이탈 사인 및 신체 검사 결과에 기초할 때, 시판되는 형태의 FGF-21과 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21의 안전성 프로파일은 동등하다. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화 FGF-21은 환자와 건강 관리 제공자에게 잠재적으로 큰 임상적 유용성을 제공한다.

[1221] 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시를 위해 제공된 것이고, 이들의 다양한 변형 또는 변경은 당업자에게 시사되는 것으로서 본 출원의 기술 사상 및 범위와 첨부된 청구의 범위 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌이 모든 목적을 위해 개별적으로 참고 문헌으로 포함된다고 하는 것과 같은 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 포함된다.

[1222] [표 5] 인용된 서열

서열 번호	서열명
1	리더가 없는 FGF-21의 아미노산 서열 (P형) HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPE SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRELLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPNGKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGI LAPQPPDVGSDDLPSMVGPSQGRSPSYAS
2	리더가 없는 FGF-21의 아미노산 서열 (P형) - His 태깅 MHHHHHSHSGGHPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFD PEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPSMVGPSQGRSPSYAS
3	리더가 있는 FGF-21의 아미노산 서열 (P형) - 3 루신을 갖는 리더 (209 아미노산 P형) MDSDETFGEHSGLVWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS RFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNG KSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPSMVGPSQ GRSPSYAS
4	리더가 있는 FGF-21의 아미노산 서열 (P형) - 2 루신을 갖는 리더 MDSDETFGEHSGLVWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY TDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR FLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGK SPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPSMVGPSQ RSPSYAS
5	리더가 없는 FGF-21의 아미노산 서열 (L형) His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
6	리더가 있는 FGF-21의 아미노산 서열 (L형) - 3 루신을 갖는 리더 (209 아미노산 L형) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

[1223]

	Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
7	리더가 있는 FGF-21의 아미노산 서열 (L형) - 2 루신을 갖는 리더 (208 아미노산 L형) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Ser Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
8	리더가 없는 FGF-21의 뉴클레오티드 서열 (P형) CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTC CGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCA CCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGA GCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATG GGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCTGAGGCCTGCAGCTTCC GGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTACCAAGTCCGAAGCCCC ACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGAC CTTGCACCCCGAGGACCAAGCTCGCTTCTCTGCCACTACCAGGCCTGCCC CCCGCACCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGAT GTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGA AGCCCCAGCTACGCTTCCTGA
9	리더가 없는 FGF-21의 뉴클레오티드 서열 (P형) - His 태깅 ATGCATCATCATCATCATCATAGCGGGCGGCCACCCATCCCTGACTCC AGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC ACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGA TGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGC AGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAG ACATCCAGGTTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCG CTCCACTTTGACCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAG GACGGATACAATGTTTACCAAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCAC CTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCTGCACCCCGAGGACC AGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAGGCC ACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCC TCTGAGCATGGTGGGACCTTCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTC CTGA
10	리더가 있는 FGF-21의 뉴클레오티드 서열 (P형) - 3 루신을 갖는 리더 ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCT

[1224]

	GACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTAC CTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAG GGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTC TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAG TCAAGACATCCAGGTTCTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTC TTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGC TGCACTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACGGGACCCTGCACCCCGA GGACCAGCTCGCTTCCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCG GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCG GACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTAC GCTTCCTGA
11	리더가 있는 FGF-21의 뉴클레오타이드 서열 (P형) - 2 루신을 갖는 리더 ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCATCCCTGAC TCCAGTCCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGTACCTC TACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGA GGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCC TGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCA AGACATCCAGGTTCTCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGAT CGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTG AGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGC ACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACGGGACCCTGCACCCCGAGGA CCAGCTCGCTTCTGTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACCCCGGAG CCACCCGGAATCCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT TCCTGA
12	리더가 없는 FGF-21의 뉴클레오타이드 서열 (L형) CACCCCATCC CTGACTCCAG TCCTCTCCTG CAATTCGGGG GCCAAGTCCG GCAGCGGTACCTCTACACAG ATGATGCCCA GCAGACAGAA GCCCACCTGG AGATCAGGGA GGATGGGACGGTGGGGGGCG CTGCTGACCA GAGCCCCGAA AGTCTCCTGC AGCTGAAAGC CTTGAAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGG AGTCAAGACA TCCAGGTTCC TGTGCCAGCG GCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCA CTTTGACCCT GAGGCCTGCA GCTTCCGGGA GCTGCTTCTTGAGGACGGAT ACAATGTTTA CCAGTCCGAA GCCACGGCC TCCGCTGCA CCTGCCAGGGAACAAGTCCC CACACGGGA CCCTGCACCC CGAGGACCAG CTCGCTTCCT GCACTACCAGGCCTGCCCC CCGCACTCCC GGAGCCACCC GGAATCCTGG CCCCCAGCC CCCCGATGTGGGCTCCTCGG ACCCTCTGAG CATGGTGGGA CCTTCCCAGG GCCGAAGCCAGCTACGCTTCCTGA
13	리더가 있는 FGF-21의 뉴클레오타이드 서열 (L형) - 3 루신을 갖는 리더 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC

[1225]

	CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
14	리더가 있는 FGF-21의 뉴클레오타이드 서열 (L형) - 2 루신을 갖는 리더 ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
34	FGF-21의 아미노산 서열 (라투스 노르베기쿠스 - ref NP_570108.1 [18543365]) Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
35	FGF-21의 아미노산 서열 (무스 무스쿨루스 - ref NP_064397.1 [9910218]) Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp

[1226]

	Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
36	FGF-21의 아미노산 서열 (다니오 레리오 -refNP_001038789.1[[113671792]) Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr Lys Lys
37	클로토 베타의 아미노산 서열 (호모 사피엔스 - refNP_783864.1[[28376633]) MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYNTMSNGGLQRSVLSALILLRAVT GFGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWK KDGKGPSIWDHFIHTLKNVSSSTNGSSDSYIFLEKDLSDDFIGVSFYQFSI SWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTYHWDLPALQE KYGGWKNDTHIDFNDYATYCFQMFGDRVKYWITHNPYLVAWHGYGTG MHAPGEKGNLAAYYTVGHNLIKASHKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLG SHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNREAL NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD EIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYY KQIRENGFSLKESTPDVQGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPOFSDPHL YVWNATGNRLLRHVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYR FALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTA HLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRL SDIYNRSGNDTYGAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHAD WAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKH RRGLSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDS RDIQLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKRLRWVRRNYGDMDIYTASGIDDQ ALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRKGYAFKLAEEKSKPRFGFF TSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL IFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQROKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS
38	클로토 베타의 아미노산 서열 (무스 무스쿨루스 -refNP_112457.1 GI:13626032)

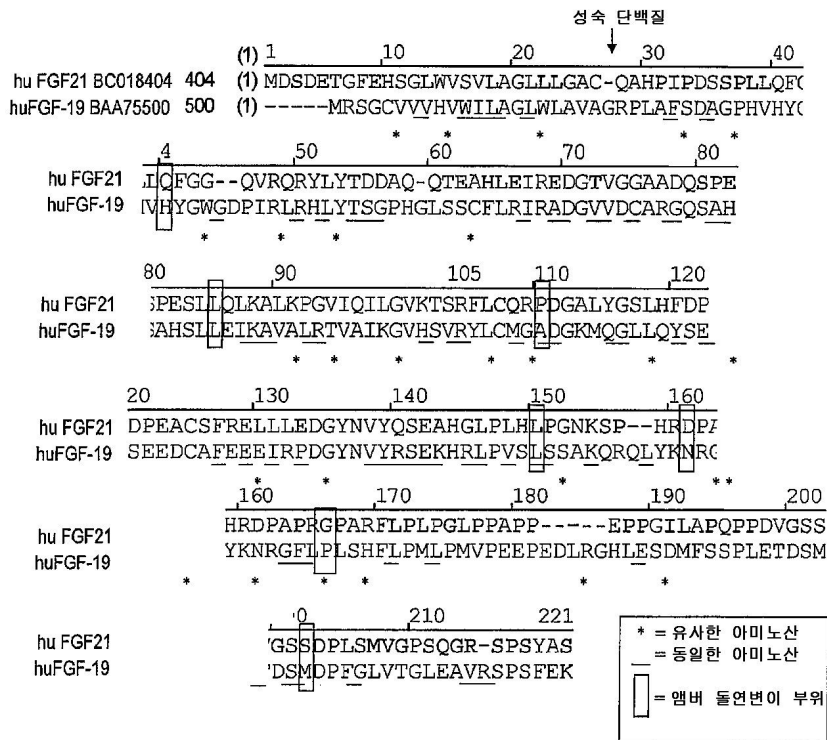
[1227]

	MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRA VTGFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEG SWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDYIFLEKDLLALDFLGVSF YQFSISWPRLF PNGTVAAVNAQGLRYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDL PLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAW HGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKG WLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSVVGWVFANPIHGDGDYPEF MKTGAMPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNFRPSNTVVKMGQNVSLN LRQVLNWKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQ AIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSS AHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPDFSWGVTSVLKPEFTVSSPQFT DPHLVYVWVNTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKV THYQFALDWTSLPTGNLSKVNQVLRYYRCVVSEGLKLGVPFPMVTLYH PTHSHLGLPLLLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVLVKLWITNE PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLS LHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDPSPVMKEYI ASKNQRLSSSVLPRTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHQNLNTR SVADRVDVQLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRLKLAWIRRNRYRDRDIYTAN GIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKEP RFGFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLV EKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQ NIPLKKGHSRVFS
39	OmpA 뉴클레오타이드 리더 서열 atgaaaaaaactgctatcgcatcgctgtagctctgctggtttcgcgaccgtagctaacgct
40	OmpA 아미노산 리더 서열 M K K T A I A I A V A L A G F A T V A N A
41	MalE 뉴클레오타이드 리더 서열 atgaaaaataaaacaggtgcacgcacatcctcgcatatccgcatgaacgacgatggtttccgcctcgctctcgcc
42	MalE 아미노산 리더 서열 M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A
43	StII 뉴클레오타이드 리더 서열 atgaaaaagaataatcgcaattcttcttgcacatctatgttcgtttttctattgctacaaatgcctatgca
44	StII 아미노산 리더 서열 M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A

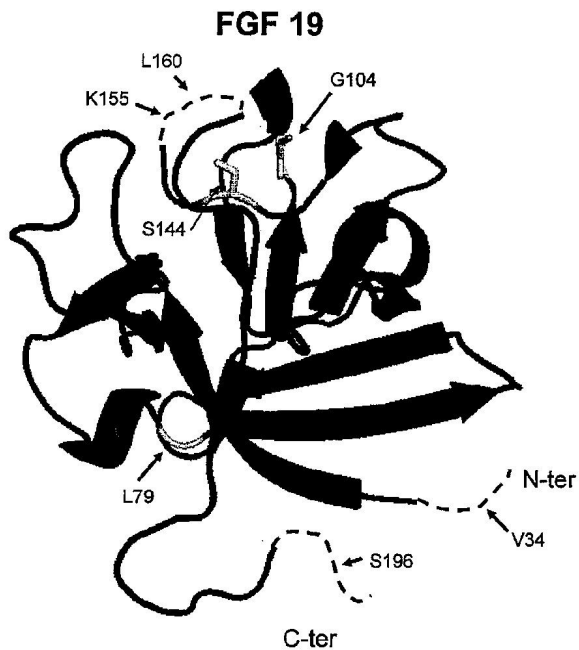
[1228]

도면

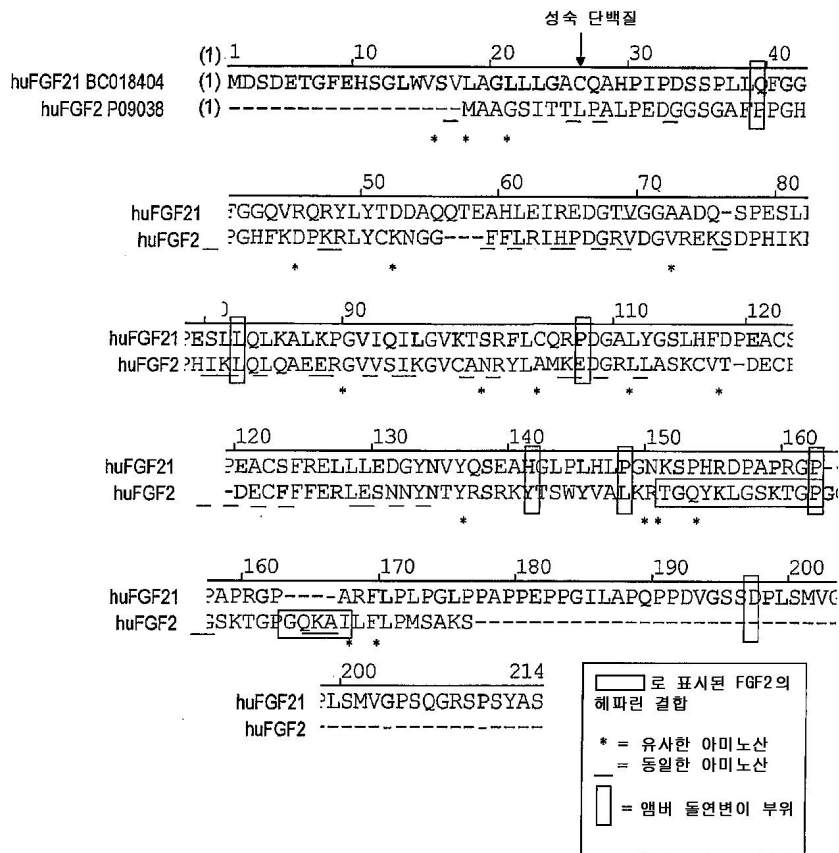
도면1



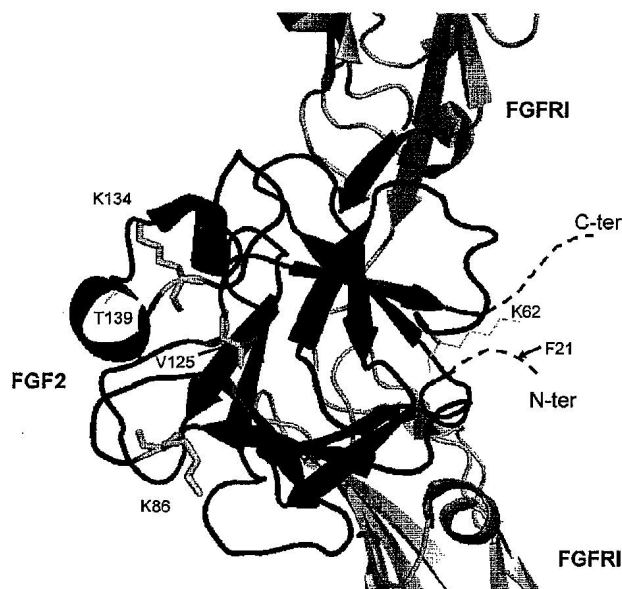
도면2



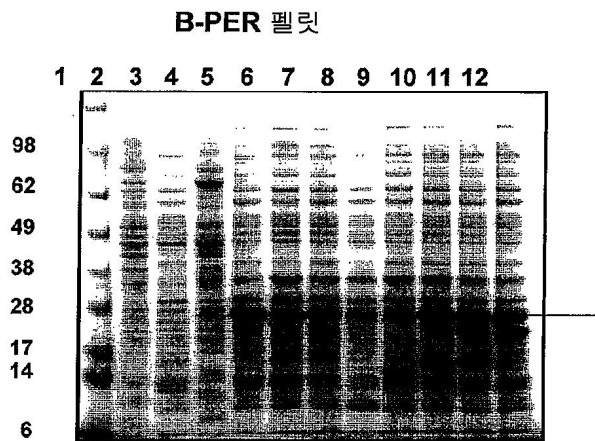
도면3



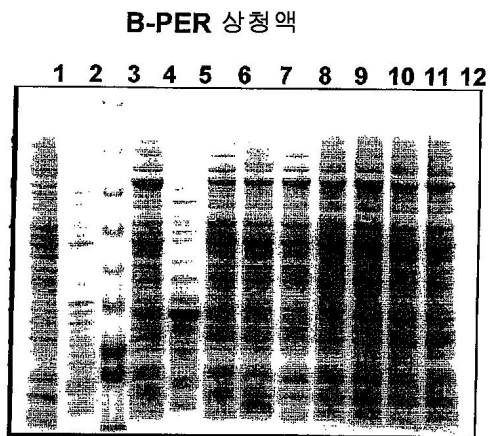
도면4



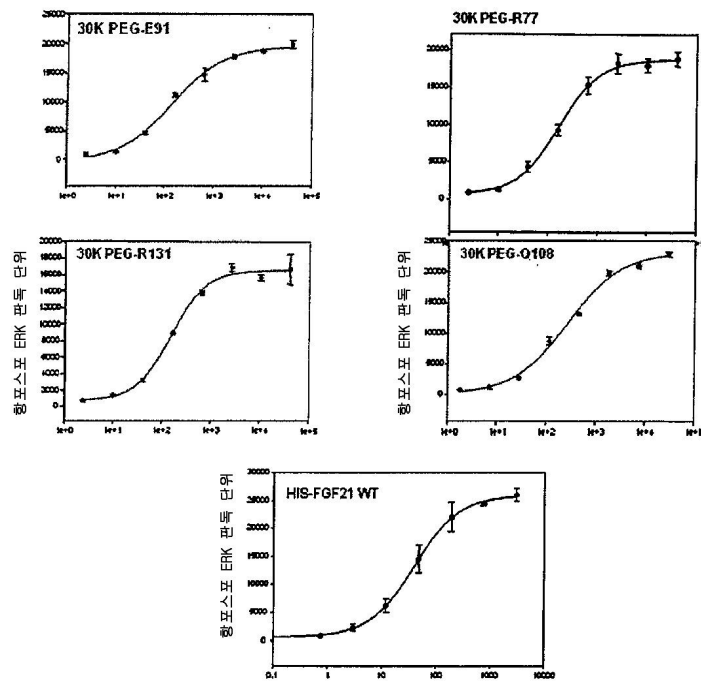
도면5



도면6



도면7a

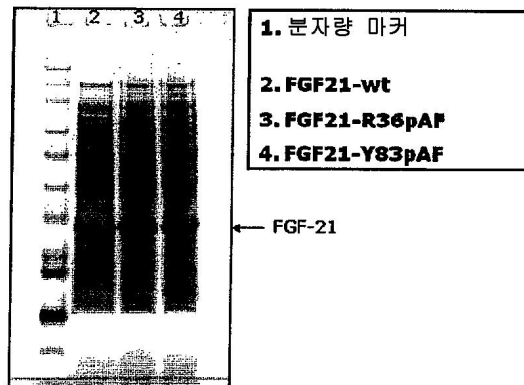


도면7b

단백질	활성 손실 배수
HIS-FGF21	1
30KPEG-E91	4
30KPEG R131	4
30KPEG-Q108	6
30KPEG R77	6
30KPEG-R72	14
30KPEG H87	19
30KPEG L86	10
30KPEG R126	11
30KPEG E110	16
30KPEG Y83	17
30KPEG-P146	22
30KPEG R135	26
30KPEG R96	47
30KPEG R36	47
30KPEG Y104	효현제 활성 없음
30KPEG L99	효현제 활성 없음
30KPEG K56	효현제 활성 없음
30KPEG Y22	효현제 활성 없음

도면8

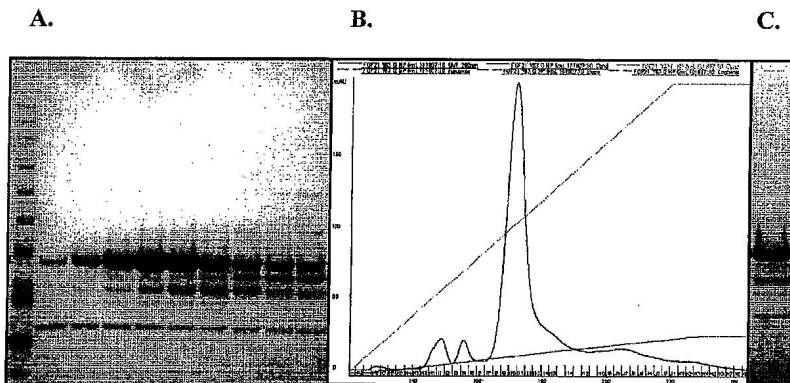
비태깅 FGF-21의 발현



이. 콜라이에서 발현된 FGF-21의 SDS-PAGE 분석

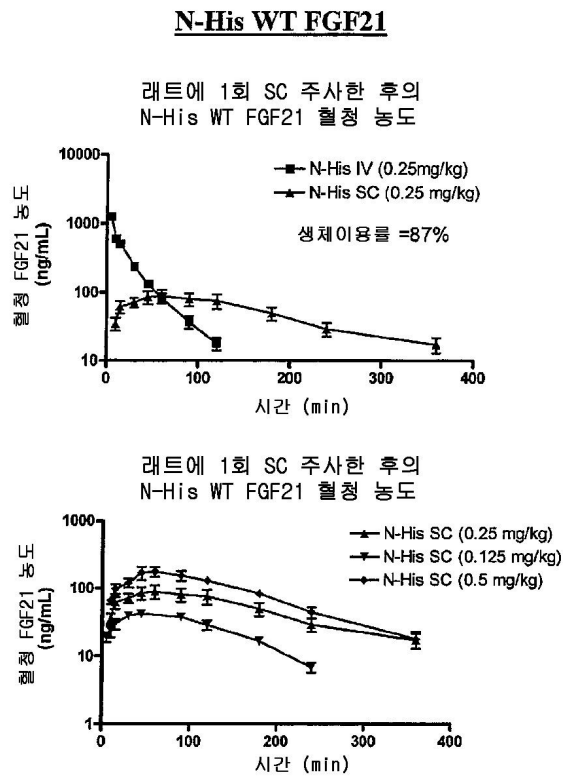
도면9

정제: 비태깅 FGF-21-Y83pAF

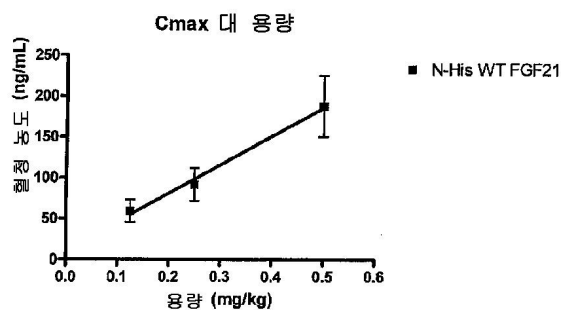


비태깅 FGF-21-Y83pAF의 정제. A. Q HP 용리의 크로마토그램.
B. FGF-21-Y83pAF 용리 분석의 SDS-PAGE 분석.
C. FGF-21-Y83pAF Q HP 용리 풀의 SDS-PAGE 분석.

도면10



도면11



N-His WT FGF21

Best-fit values

Slope 348.5 ± 91.22

Y-intercept when $X=0.0$ 11.55 ± 30.17

X-intercept when $Y=0.0$ -0.03315

$1/\text{slope}$ 0.002870

95% Confidence Intervals

Slope 145.2 to 551.7

Y-intercept when $X=0.0$ -55.67 to 78.77

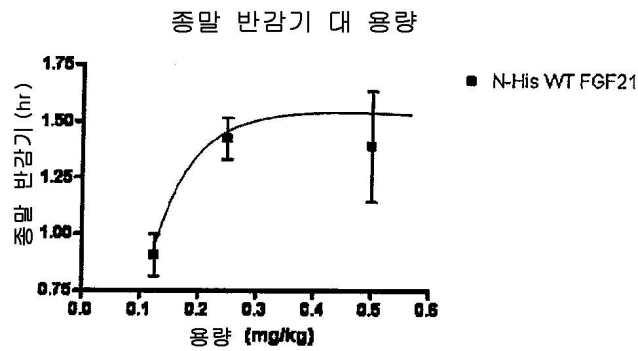
X-intercept when $Y=0.0$ -0.5647 to 0.1635

Goodness of Fit

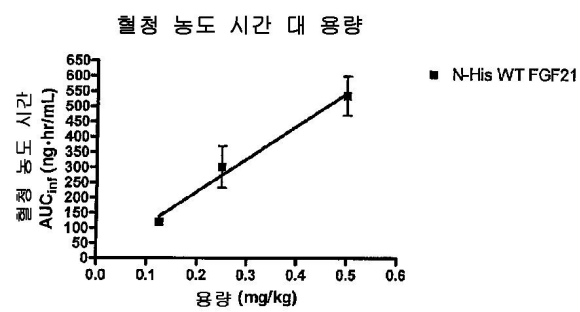
r^2 0.5934

$Sy.x$ 49.27

도면12



도면13



N-His WT FGF21

Best-fit values

Slope 1079 ± 194.1

Y-intercept when $X=0.0$ 4.274 ± 64.19

X-intercept when $Y=0.0$ -0.003959

$1/\text{slope}$ 0.0009265

95% Confidence Intervals

Slope 646.9 to 1512

Y-intercept when $X=0.0$ -138.7 to 147.3

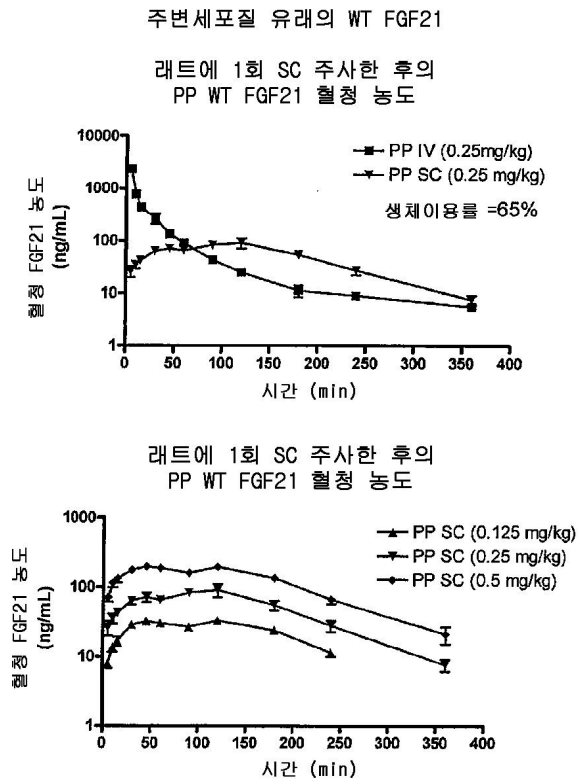
X-intercept when $Y=0.0$ -0.2567 to 0.1357

Goodness of Fit

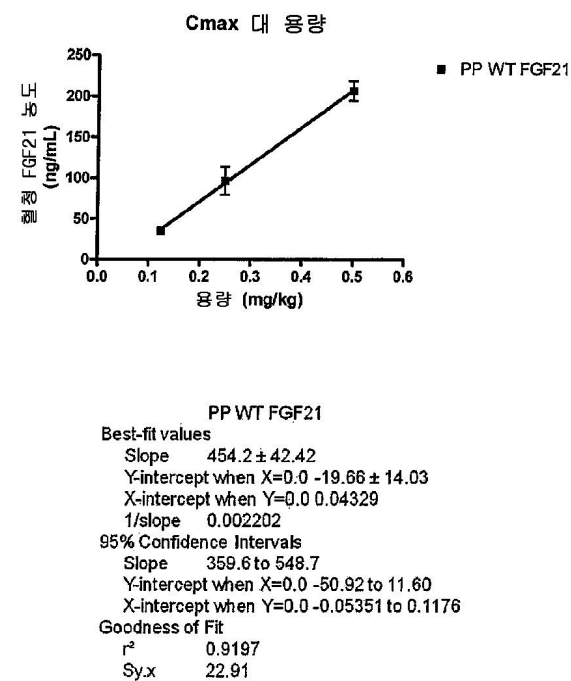
r^2 0.7556

Sy.x 104.8

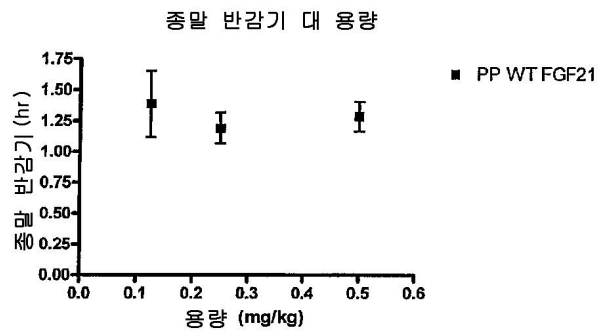
도면14



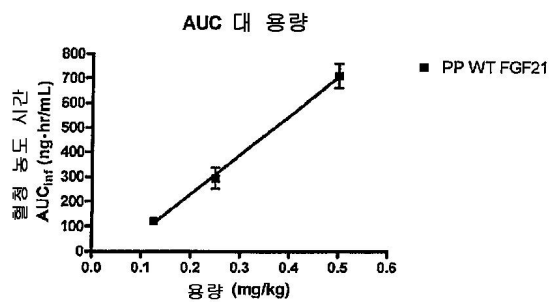
도면15



도면16

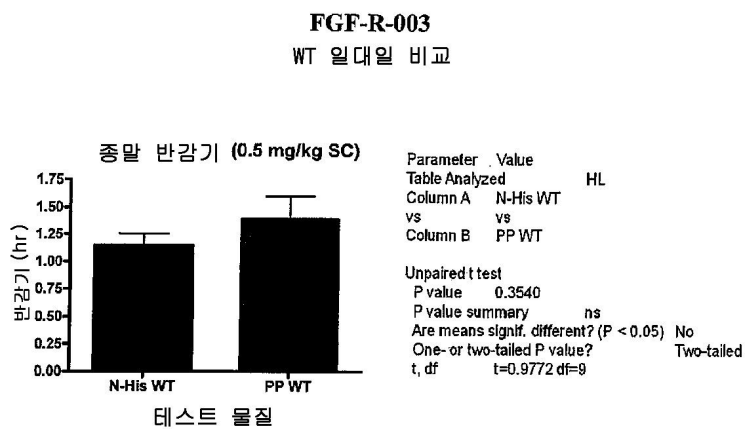


도면17

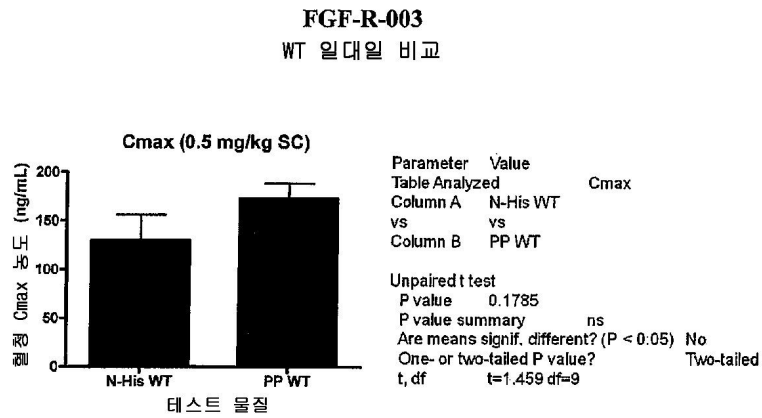


PP WT FGF21
Best-fit values
Slope 1585 ± 137.1
Y-intercept when X=0.0 -86.76 ± 45.33
X-intercept when Y=0.0 0.05474
1/slope 0.0006309
95% Confidence Intervals
Slope 1280 to 1890
Y-intercept when X=0.0 -187.8 to 14.25
X-intercept when Y=0.0 -0.03184 to 0.1230
Goodness of Fit
r² 0.9304
Syx 74.03

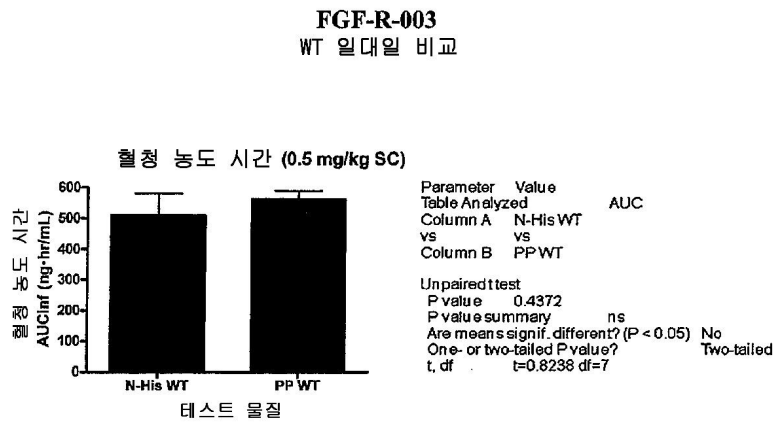
도면18



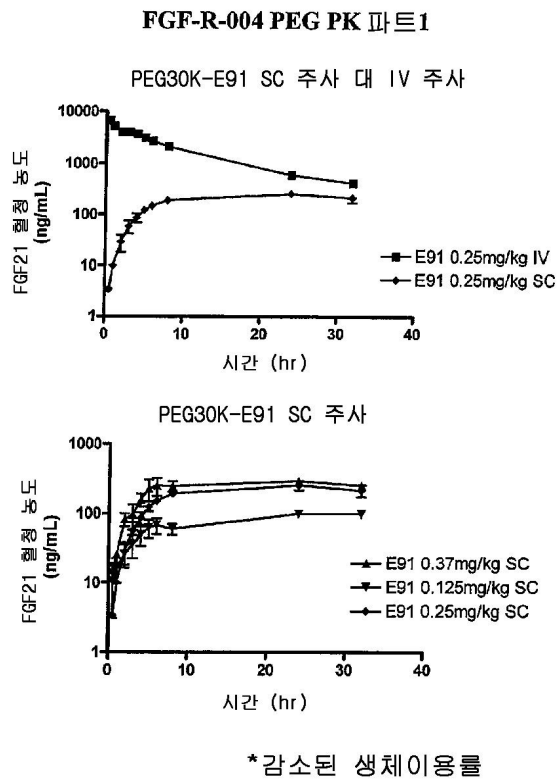
도면19



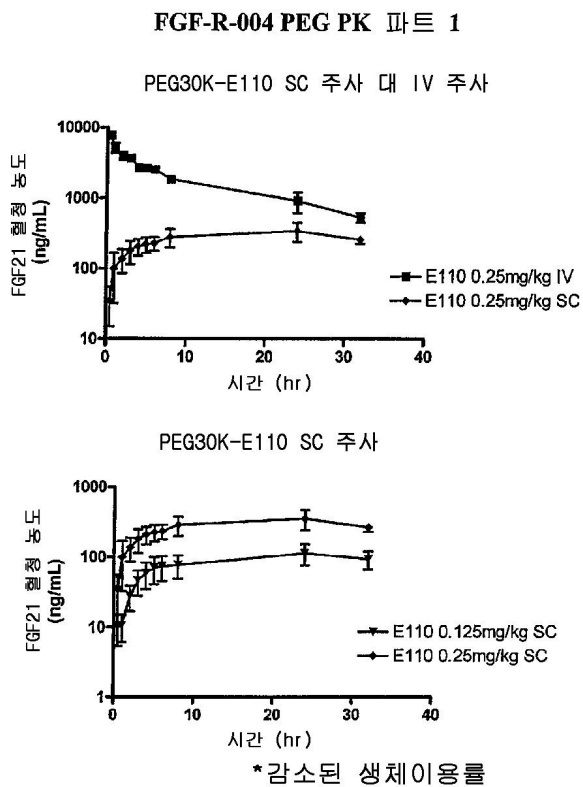
도면20



도면21

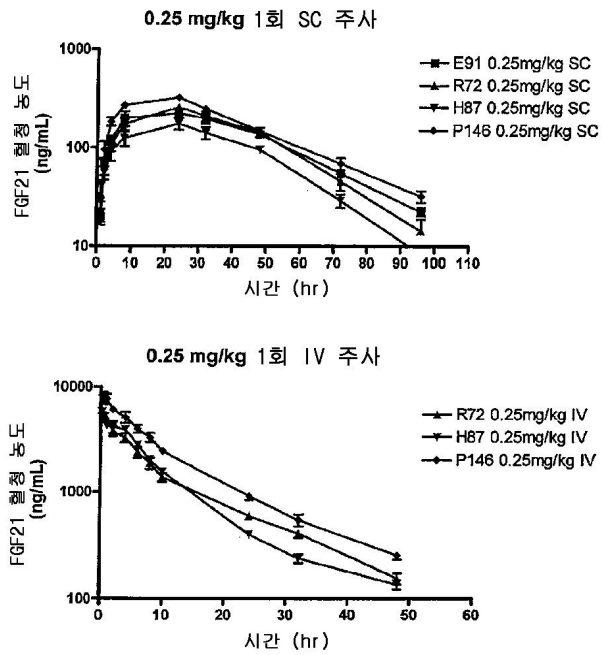


도면22

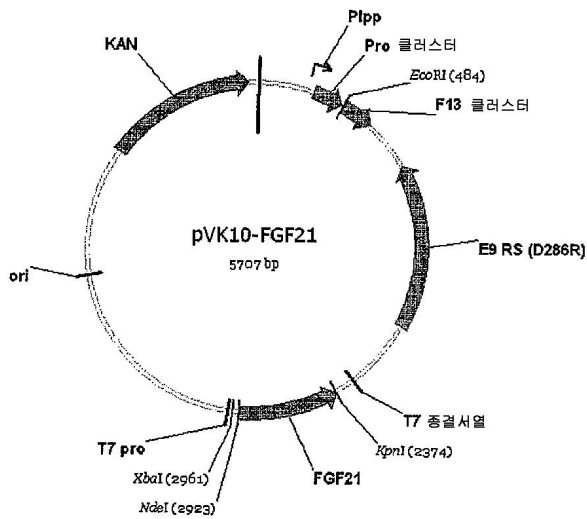


도면23

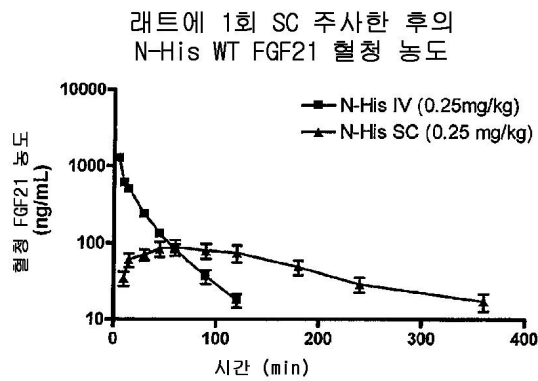
PEG PK 비교 파트 2



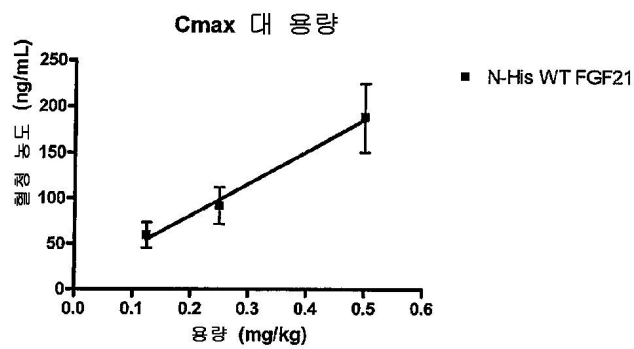
도면24



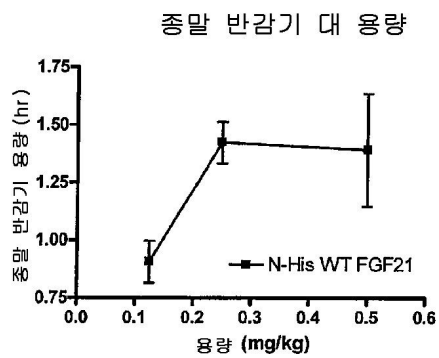
도면26b



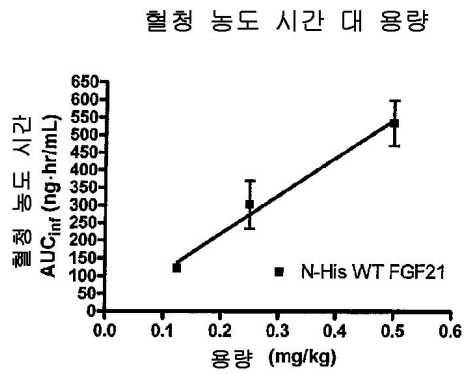
도면27a



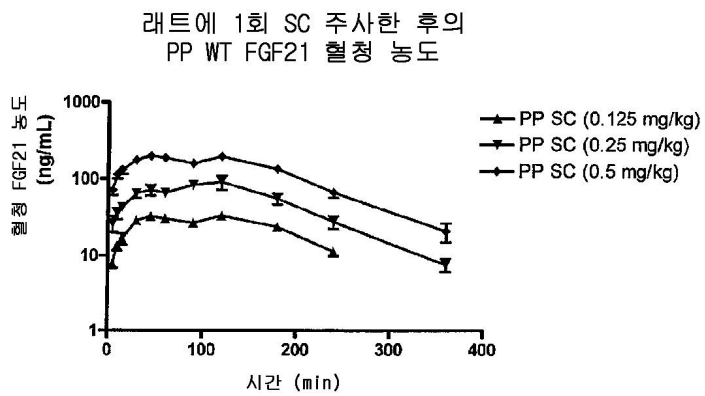
도면27b



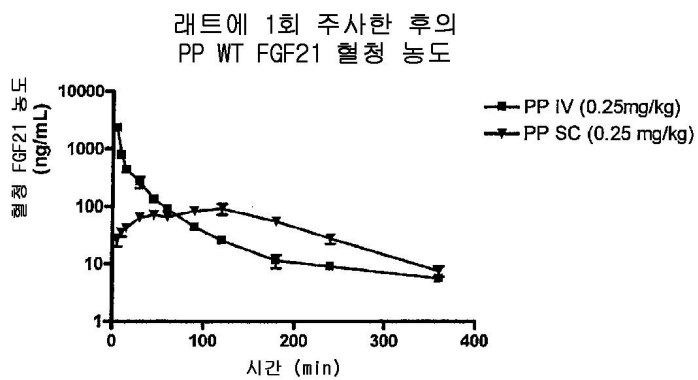
도면27c



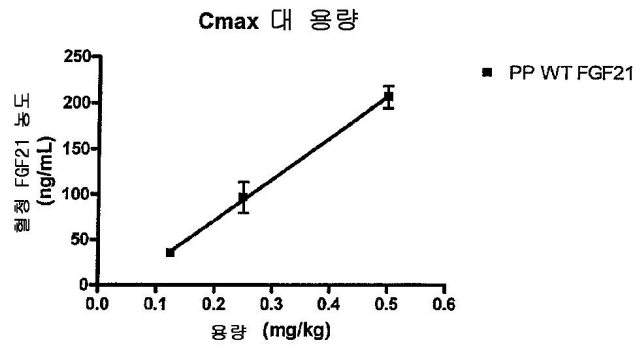
도면28a



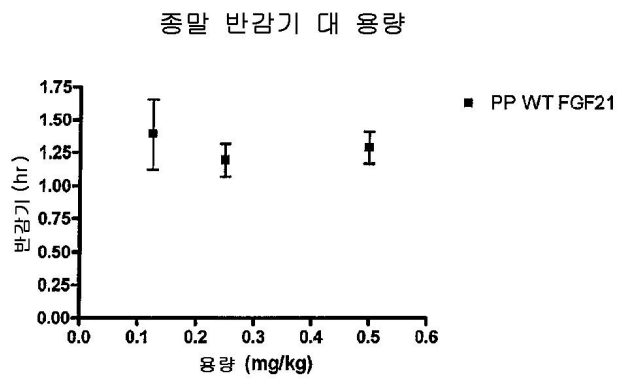
도면28b



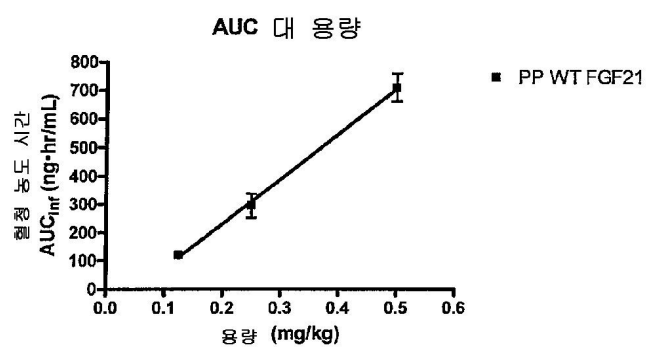
도면29a



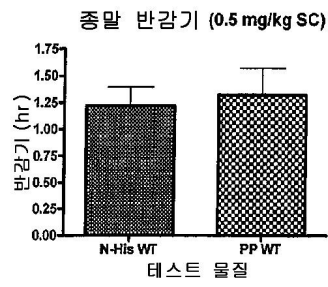
도면29b



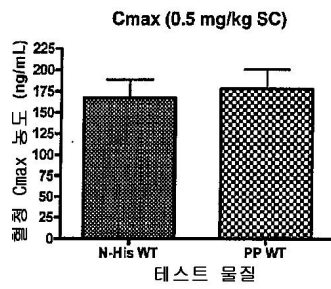
도면29c



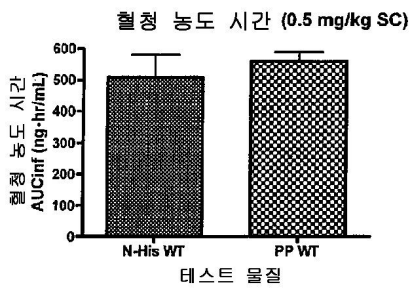
도면30a



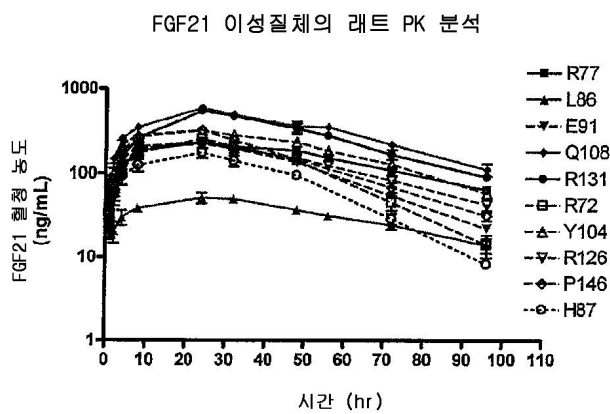
도면30b



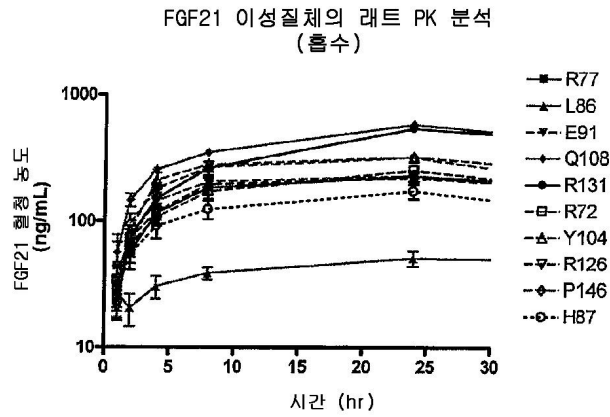
도면30c



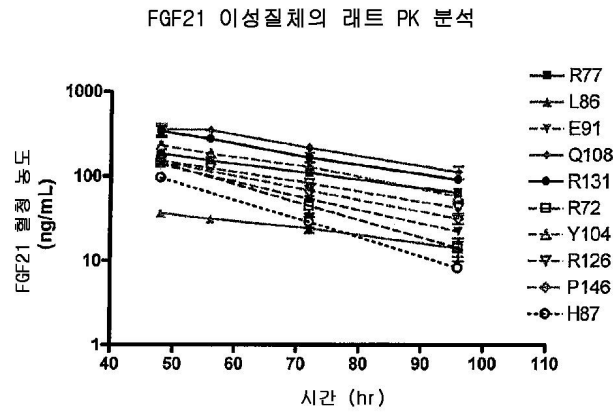
도면31a



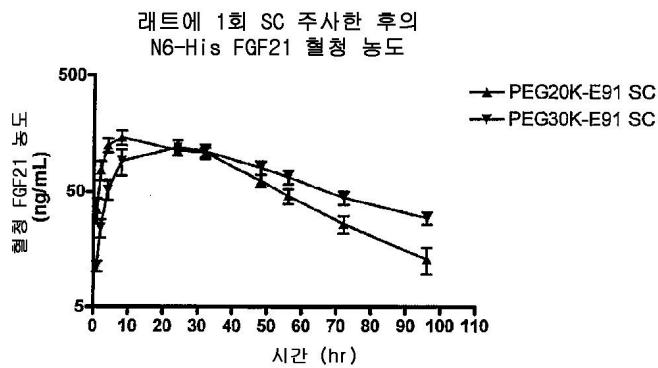
도면31b



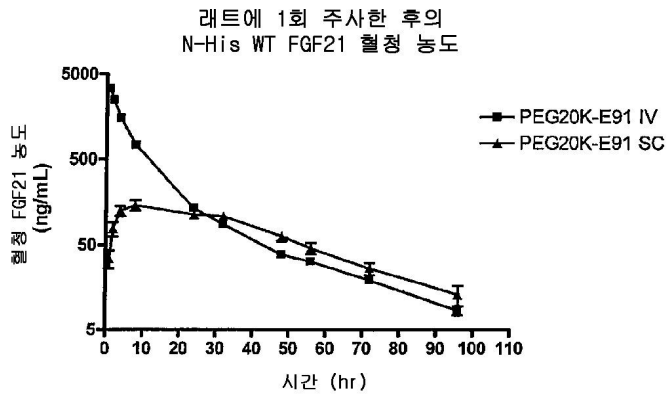
도면31c



도면32

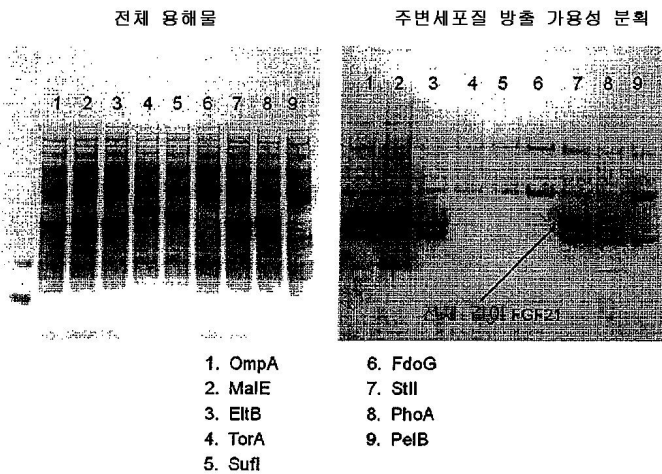


도면33



도면34

이. 콜라이에서의 FGF21의 분비



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Cujec, Thomas P.

Mariani, Roberto

Hays Putnam, Anna-Maria A.

Keefe, William M.

Knudsen, Nick

Ho, Lillian

Pinkstaff, Jason

Kraynov, Vadim

<120> Modified FGF-21 Polypeptides and Their Uses

<130> AMBX-0134.00PCT

<150> 60/921,297

<151> 2007-03-30

<150> 60/988,060

<151> 2007-11-14

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 <210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

 Met His His His His His His Ser Gly Gly His Pro Ile Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr
 20 25 30
 Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp
 35 40 45
 Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln
 50 55 60

 Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu
 85 90 95
 His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp
 100 105 110
 Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu
 115 120 125

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

180 185 190

<210> 3

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu

65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val

85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu

115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly

145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu

165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

195 200 205

Ser

<210> 4

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp

20 25 30

Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu

35 40 45

Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu

50 55 60

Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu

65 70 75 80

Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys

85 90 95

Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser

100 105 110

Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu

115 120 125

Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His

130 135 140

Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro

145 150 155 160

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro

165 170 175

Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro

180 185 190

Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

195 200 205

<210> 5

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val

1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 6

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

20 25 30
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

35 40 45
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

50 55 60
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu

65 70 75 80
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val

85 90 95
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

100 105 110
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu

115 120 125
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

130 135 140
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly

145 150 155 160
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu

165 170 175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

180 185 190
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

195 200 205
Ser

<210> 7

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp

20 25 30

Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu

35 40 45

Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu

50 55 60

Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu

65 70 75 80

Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys

85 90 95

Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser

100 105 110

Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu

115 120 125

Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His

130 135 140

Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro

145 150 155 160

Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro

165 170 175

Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro

180 185 190

Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

195 200 205

<210> 8

<211> 546

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

caccccatcc ctgactccag tctctctctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag	60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg	120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg	180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg	360
aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgcttctct gccactacca	420
ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg	480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct	540
tcctga	546

<210> 9

<211> 576

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgcatcatc atcatcatca tagcggcggc caccccatcc ctgactccag tctctctctg	60
caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag ctctacacag atgatgccca gcagacagaa	120
gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa	180
agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca	240
tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct	300
gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa	360
gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc	420
cgaggaccag ctgcttctct gccactacca ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc	480
ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg ggctcctcgg accctctgag catggtggga	540
ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct tcctga	576

<210> 10

<211> 630

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc	120
gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac	180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaactt tgggagtcaa gacatccagg	300
ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac	420
ggcctcccgc tgcacctgcc aggggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga	480
ccagctcgct tcttgccact accaggcctg cccccgcac ccccgagacc acccggaatc	540
ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttcctga	630

<210> 11

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgggag cctgccagcg acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg	120
ggccaagtcc ggcagcggta cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg	180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg	240
cagctgaaag ccttgaagcc gggagtattt caaatcttgg gactcaagac atccaggttc	300
ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacct tgaggcctgc	360
agcttccggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc	420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg acctgcacc ccgaggacca	480
gtcgccttcc tgccactacc aggctgccc cccgcacccc cggagccacc cggaatcctg	540
gccccccagc ccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatgggtggg accttcccag	600
ggccgaagcc ccagctacgc ttctctga	627

<210> 12

<211> 545

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 12

caccccatcc ctgactccag tcctctcttg caattcgggg gccaaagtcg gcagcggtag	60
ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg	120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctctg agctgaaagc cttgaagccg	180
ggagttatgc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg	240
gcccgtgatg gatcgtcca ctttgacctt gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtcgaa gccacaggcc tcccgtgca cctgccaggg	360
aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc caggaccag ctgcttctt gccactacca	420
ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg	480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga cttcccagg gccgaagccc agctacgctt	540
cctga	545

<210> 13

<211> 630

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc	120
gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg ccagcagac agaagccac	180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg	300
ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga cctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagccac	420
ggcctcccgc tgcacctgcc agggacaacg tccccacac gccacacctgc acccgagga	480
ccagctcgtt tctgccaact accaggcctg cccccgcac tcccgagcc acccggaatc	540
ctggcccccc agcccccca tgtgggctcc tcggacctc tgagcatggt gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctgta	630

<210> 14

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

atggactcgg acgagaccgg gttcagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt    60
cttctgggag cctgccaggc acaccccatc cctgactcca gtcctctcct gcaattcggg    120
ggccaagtcc ggccagcgga cctctacaca gatgatgccc agcagacaga agcccacctg    180
gagatcaggg aggatgggac ggtggggggc gctgctgacc agagccccga aagtctcctg    240

cagctgaaag ccttgaagcc gggagtattt caaatcttgg gagtcaagac atccaggttc    300
ctgtgccagc ggccagatgg ggccctgtat ggatcgctcc actttgacct tgaggcctgc    360
agcttcgggg agctgcttct tgaggacgga tacaatgttt accagtccga agcccacggc    420
ctcccgtgc acctgccagg gaacaagtcc ccacaccggg accctgcacc ccgaggacca    480
gtcgccttcc tgccactacc aggccctgcc cccgactcc cggagccacc cggaatcctg    540
gccccccagc ccccgatgt gggctcctcg gaccctctga gcatggtggg accttcccag    600
ggccgaagcc ccagctacgc ttcttga                                     627

```

<210> 15

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA

<400> 15

```

ccggcgtag ttacgcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa    60
tccagcccg cggacca                                     77

```

<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> Methanococcus jannaschii

<400> 17

ccggcggttag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccggcccg cggacca 77

<210> 18

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized amber supressor tRNA

<400> 18

cccagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60

gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 19

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA

<400> 19

gcgagggttag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttct aatccgttct ctaggagtt 60

cgagggttcg aatccctccc ctgcacca 89

<210> 20

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-L-phenylalanine

<400> 20

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

[illegible]

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> 22

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-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 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> 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 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> 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 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> 25

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-azido-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 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> 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 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> 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 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> 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 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> 29

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of
p-acetyl-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 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> 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 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> 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 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> 32
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-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 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> 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 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> 34
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 34
 Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys

1 5 10 15
 Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
 Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
 50 55 60
 Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser

 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
 85 90 95
 Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu
 115 120 125
 Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro

 130 135 140
 Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro
 145 150 155 160
 Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln
 165 170 175
 Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro
 180 185 190
 Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

 195 200 205
 <210> 35
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35
 Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
 Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
 35 40 45

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

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

 Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
 180 185 190
 Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
 195 200 205
 Ala Ser
 210
 <210> 36
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Danio rerio
 <400> 36
 Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu

1 5 10 15
 Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly

 20 25 30
 Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu
 35 40 45
 Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn
 50 55 60
 Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln
 65 70 75 80
 Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu

 85 90 95
 Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu
 100 105 110
 Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro
 115 120 125
 Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg
 130 135 140
 Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys

 145 150 155 160
 Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Gly Met
 165 170 175
 Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr
 180 185 190
 Lys Lys

<210> 37

<211> 1043

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe

1 5 10 15

 Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
 20 25 30
 Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
 35 40 45
 Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
 50 55 60
 Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
 65 70 75 80

 Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
 100 105 110
 Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
 115 120 125
 Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile
 130 135 140

 Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
 145 150 155 160
 Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser
 165 170 175
 Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Ile Val Thr Leu
 180 185 190
 Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp
 195 200 205

 Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys
 210 215 220
 Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn
 225 230 235 240
 Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro
 245 250 255

Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu
260 265 270

Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg
275 280 285

Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile
290 295 300

Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln Gln
305 310 315 320

Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp
325 330 335

Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu Pro
340 345 350

Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe
355 360 365

Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met
370 375 380

Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn
385 390 395 400

Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn
405 410 415

Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile
420 425 430

Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu
435 440 445

Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly
450 455 460

Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val
465 470 475 480

Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His
485 490 495

Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ser

500	505	510
Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val		
515	520	525
Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe		
530	535	540
Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu		
545	550	555
His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr		
565	570	575
Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys		
580	585	590
Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr		
595	600	605
Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys		
610	615	620
Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr Leu		
625	630	635
Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His		
645	650	655
Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala Tyr		
660	665	670
Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile		
675	680	685
Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly		
690	695	700
Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val Ala His Ala Leu		
705	710	715
Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala		
725	730	735
Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr		
740	745	750

Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile
755 760 765

Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala
770 775 780

Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser
785 790 795 800

Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr
805 810 815

Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His
820 825 830

Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe
835 840 845

Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile
850 855 860

Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly
865 870 875 880

Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu
885 890 895

Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu
900 905 910

Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr
915 920 925

Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe
930 935 940

Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val
945 950 955 960

Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser
965 970 975

Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln
980 985 990

Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val

995 1000 1005
 Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys
 1010 1015 1020
 Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly
 1025 1030 1035

 Lys Arg Val Val Ser
 1040
 <210> 38
 <211> 1043
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 38
 Met Lys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Asp Glu Arg Asn Thr Arg Ser Arg Lys Thr Met Ser Asn
 20 25 30
 Arg Ala Leu Gln Arg Ser Ala Val Leu Ser Ala Phe Val Leu Leu Arg
 35 40 45

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

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

Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg
165 170 175

Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
180 185 190

Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly
195 200 205

Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr
210 215 220

Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His
225 230 235 240

Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala
245 250 255

Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn
260 265 270

Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe
275 280 285

Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp
290 295 300

Ile Glu Pro Asn Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln
305 310 315 320

His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly
325 330 335

Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu
340 345 350

Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe
355 360 365

Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val
370 375 380

Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp
385 390 395 400

Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly

405 410 415
 Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr
 420 425 430

 Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp
 435 440 445
 Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe
 450 455 460
 Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
 465 470 475 480
 Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr
 485 490 495

 Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr
 500 505 510
 Pro Asp Met Lys Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr
 515 520 525
 Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro Gln Phe Thr
 530 535 540
 Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr
 545 550 555 560

 Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp
 565 570 575
 Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val
 580 585 590
 Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly
 595 600 605
 Asn Leu Ser Lys Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val
 610 615 620

 Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr
 625 630 635 640
 His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser
 645 650 655

Gly Gly Trp Leu Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala
 660 665 670
 Glu Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr
 675 680 685

 Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn
 690 695 700
 Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val
 705 710 715 720
 Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val
 725 730 735
 Ser Leu Ser Leu His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val
 740 745 750

 Asp Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala
 755 760 765
 Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met
 770 775 780
 Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val
 785 790 795 800
 Leu Pro Arg Phe Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val
 805 810 815

 Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys
 820 825 830
 Gln Leu Asn Thr Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu
 835 840 845
 Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro
 850 855 860
 Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp
 865 870 875 880

 Arg Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu
 885 890 895
 Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala

900 905 910
 Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala
 915 920 925
 Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr
 930 935 940

 Ser Asp Phe Arg Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile
 945 950 955 960
 Ser Ser Ser Gly Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln
 965 970 975
 Pro Ala Glu Asp Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val Glu Lys
 980 985 990
 Lys Pro Leu Ile Phe Phe Gly Cys Cys Phe Ile Ser Thr Leu Ala Val
 995 1000 1005

Leu Leu Ser Ile Thr Val Phe His His Gln Lys Arg Arg Lys Phe
 1010 1015 1020
 Gln Lys Ala Arg Asn Leu Gln Asn Ile Pro Leu Lys Lys Gly His
 1025 1030 1035
 Ser Arg Val Phe Ser
 1040

<210> 39

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 39

atgaaaaaaa ctgctatcgc gatcgctgta gctctggctg gtttcgcgac cgtagctaac 60

gct 63

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 40

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15

Thr Val Ala Asn Ala

20

<210> 41

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 41

atgaaaataa aaacaggtgc acgcatactc gcattatccg cattaacgac gatgatgttt 60

tccgcctcgg ctctcgcc 78

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 42

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr

1 5 10 15

Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala

20

25

<210> 43

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 43

atgaaaaaga atatcgcat tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat 60

gcctatgca 69

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FGF21 secretion constructs, cloned into pVK7ara (Nde/Eco)

<400> 44

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20