

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4889505号  
(P4889505)

(45) 発行日 平成24年3月7日(2012.3.7)

(24) 登録日 平成23年12月22日(2011.12.22)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 14/61	(2006.01)	C 07 K 14/61
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P 21/02 C
A 61 K 38/27	(2006.01)	A 61 K 37/36
A 61 P 5/06	(2006.01)	A 61 P 5/06

請求項の数 5 (全 160 頁)

(21) 出願番号	特願2006-551499 (P2006-551499)
(86) (22) 出願日	平成17年1月28日 (2005.1.28)
(65) 公表番号	特表2007-519420 (P2007-519420A)
(43) 公表日	平成19年7月19日 (2007.7.19)
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/002724
(87) 国際公開番号	W02005/074546
(87) 国際公開日	平成17年8月18日 (2005.8.18)
審査請求日	平成19年12月10日 (2007.12.10)
(31) 優先権主張番号	60/541,528
(32) 優先日	平成16年2月2日 (2004.2.2)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/581,314
(32) 優先日	平成16年6月18日 (2004.6.18)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506117057 アンブレツクス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア・920 37、ラ・ホーヤ、ノース・トレイ・パイ ンズ・ロード・10975、スイート・1 OO
(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】被修飾されたヒト成長ホルモンポリペプチドおよびこれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列の 35、92、143 および 145 から成る群より選択されるいづれか 1 つの位置で置換された単一の非天然アミノ酸に、共有オキシム結合を介して水溶性ポリマーが連結しているヒト成長ホルモン(hGH)ポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記水溶性ポリマーが、ポリ(エチレングリコール)分子である請求項 1 に記載の hGH ポリペプチド。

## 【請求項 3】

前記ポリ(エチレングリコール)分子が、1kDa と 100kDa の間の分子量を有する請求項 2 に記載の hGH ポリペプチド。 10

## 【請求項 4】

前記ポリ(エチレングリコール)分子が分岐鎖又は直鎖である請求項 2 に記載の hGH ポリペプチド。

## 【請求項 5】

前記水溶性ポリマーが、30kDa の分子量を有する直鎖ポリ(エチレングリコール)分子である請求項 1 に記載の hGH ポリペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の記載)

本出願は、2004年2月2日出願の米国特許仮出願番号60/541,528、2004年6月18日出願の米国特許仮出願番号60/581,314、2004年6月18日出願の米国特許仮出願番号60/581,175、2004年6月18日出願の米国特許仮出願番号60/580,885、および2004年12月22日出願の60/638,616と題する米国特許開出願への優先権を主張するものである。これらの明細書は、これら全文、本明細書に組み込まれている。

【0002】

本発明は、少なくとも1つの天然にはコードされないアミノ酸で修飾された成長ホルモンポリペプチドに関する。

10

【背景技術】

【0003】

成長ホルモン(GH)超遺伝子ファミリー(Bazan, F. Immunology Today 11:350-354(1991); Mott, H. R. および Campbell, I. D. Current Opinion in Structural Biology 5:114-121(1995); Silvennoinen, O. および Ihle, J. N. (1996) SIGNALING BY THE HEMATopoietic CYTOKINE RECEPTORS)は、類似した構造特性を有する一組のタンパク質を表す。タンパク質のこのファミリーの各メンバーは、4つのヘリックスバンドルを含む。この一般構造を図1に示す。まだ同定されていないこのファミリーのさらに多くのメンバーが存在するが、このファミリーの一部のメンバーとしては、次のものが挙げられる：成長ホルモン、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、エリスロポイエチン(EPO)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン-2(IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35サブユニット)、IL-13、IL-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子、白血病抑制因子、アルファインターフェロン、ベータインターフェロン、ガンマインターフェロン、オメガインターフェロン、タウインターフェロン、イプシロンインターフェロン、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)およびカルジオトロフィン-1(CT-1)(「GH超遺伝子ファミリー」)。GH超遺伝子ファミリーのメンバーは、限られたアミノ酸またはDNA配列同一性を一般に有するという事実にもかかわらず、類似した二次および三次構造を有する。これらの共有される構造的特徴により、この遺伝子ファミリーの新たなメンバーを容易に同定することができる。ファミリーメンバーhGH、EPO、IFN-2、およびG-CSFの一般構造を図2、3、4および5にそれぞれ示す。

20

【0004】

GH超遺伝子ファミリーの1つのメンバーは、ヒト成長ホルモン(hGH)である。ヒト成長ホルモンは、正常なヒトの成長および発育の調節の多くに関与している。この自然発生1本鎖下垂体ホルモンは、191のアミノ酸残基から成り、約22kDaの分子量を有する。hGHは、数ある中でも線形成長(体形成)、乳汁分泌、マクロファージの活性化、インスリン様作用および糖尿病誘発作用をはじめとする、多数の生物学的作用を示す(Chawla, R. ら、Ann. Rev. Med. 34:519-547(1983); Isaksson, O. ら、Ann. Rev. Physiol., 47:483-499(1985); Hughes, J. および Friesen, H., Ann. Rev. Physiol., 47:469-482(1985))。

30

【0005】

hGHの構造は、周知であり(Goeddele, D. ら、Nature 281:544-548(1979))、hGHの三次元構造は、X線結晶学により解明されている(de Vos, A. ら、Science 255:306-312(1992))。このタンパク質は、N末端から始まってAからDと名づけられた4つの両親媒性アルファヘリック

40

50

スバンドルを含み、これらのバンドルが、ループにより継ぎ合わされている緻密球形構造を有する。hGHは、4つのシスティン残基も含有し、これらは、2つの分子間ジスルフィド結合に関与する：C53は、C165と対になり、C182が、C189と対になる。このホルモンは、グリコシリ化されず、大腸菌(*E. coli*)における分泌形で発現された(Chang, C.ら、Gene 55: 189-196 (1987))。

## 【0006】

hGHの多数の自然発生突然変異体が、同定されている。これらには、hGH-V(Seeberg, DNA 1: 239 (1982)；米国特許第4,446,235号、同4,670,393号および第4,665,180号；これらは、本明細書に参照により組み込まれている)およびhGHの残基32から46の欠失を有する20-kDa hGH(Kostyola、Biochem. Biophys. Acta 925: 314 (1987)；Lewis, U.ら、J. Biol. Chem., 253: 2679-2687 (1978))が挙げられる。加えて、後転写、後翻訳、分泌、代謝プロセッシングおよび他の生理プロセスから生じる非常に多数のhGH変異体が、報告されている(Baumann, G.、Endocrine Reviews 12: 424 (1991))。

## 【0007】

hGHの生物学的作用は、特異的細胞受容体とのこの相互作用に由来する。ホルモンは、胎盤性ラクトゲンおよびプロラクチンを含む相同タンパク質のファミリーのメンバーである。しかし、hGHは、このファミリーメンバーの間では、広範な種特異性を示す点、およびクローニングされた体細胞原性受容体(Leung, D.ら、Nature 330: 537-543 (1987))またはプロラクチン受容体(Boutin, J.ら、Cell 53: 69-77 (1988))のいずれかに結合する点で珍しい。構造および生化学的研究を基に、乳腺刺激性および体細胞原性結合ドメインについての官能性マップが報告されている(Cunningham, B.およびWells, J.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3407 (1991))。hGH受容体は、造血性/サイトカイン/成長因子受容体ファミリーの1メンバーであり、このファミリーは、幾つかの他の成長因子受容体、例えばインターロイキン(IL)-3、-4および-6受容体、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)受容体、エリスロポエチン(EPO)受容体、ならびにG-CSF受容体を含む。Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6934-6938 (1990) 参照。前記サイトカイン受容体ファミリーのメンバーは、4つの保存システィン残基と、膜貫通領域のすぐ外側に位置するトリプトファン-セリン-X-トリプトファン-セリンモチーフを含有する。保存配列は、タンパク質-タンパク質相互作用に関与すると考えられる。例えば、Chibaら、Biochim. Biophys. Res. Comm. 184: 485-490 (1992) 参照。hGHとこの受容体の細胞外ドメイン(hGHbp)の間の相互作用は、中でも、最もよく理解されているホルモン-受容体相互作用である。高分解能X線結晶学データ(Cunningham, B.ら、Science, 254: 821-825 (1991))により、hGHは、2つの受容体結合部位を有し、2つの受容体分子にこれらの分子上の別個の部位を利用して逐次的に結合することが証明された。これらの2つの受容体結合部位は、Site IおよびSite IIと呼ばれる。Site Iは、ヘリックスDのカルボキシ末端、ヘリックスAの一部およびこのA-Bループの一部を含み、これに対してSite IIは、ヘリックスAのアミノ末端領域およびヘリックスCの一部を包含する。GHのこの受容体への結合は、最初にSite Iから始まって逐次的に発生する。この後、Site IIが、第二のGH受容体に係合し、この結果、受容体の二量体化と、ホルモンに対する細胞応答を導く細胞内シグナル伝達経路の活性化とが生じる。G120R置換がSite IIに導入されたhGH突然変異タンパク質は、単一のhGH受容体に結合することができるが、2つの受容体を二量体化することはできない。この突然変異タンパク質は、おそらく、細胞内シグナル伝達経路を活性化することなく受容体部位を占有することにより、インビトロでhGH拮抗薬として作用する(Fuh, G.ら、Science 256: 1677-1680 (1992))。

10

20

30

40

50

## 【0008】

組換えhGHは、治療薬として用いられており、多数の適応症の治療用に承認されている。hGH欠損は、例えば小人症を導き、これは、このホルモンの外因性投与により、10年より長きにわたりうまく治療されている。hGH欠損に加えて、hGHは、腎不全(子供におけるもの)、ターナー症候群、およびAIDS患者の悪液質の治療用にも承認されている。最近、米国食品医薬局(the Food and Drug Administration(FDA))は、非GH依存性低身長の治療用にhGHを承認した。現在、hGHは、老化、老人の虚弱、短小腸症候群、およびうつ血性心不全の治療用にも調査されている。

## 【0009】

組換えhGHは、1日1回の注射用製品として現在販売されており、5つの主要製品が、現在市販されている: Humatropin(商標)(Eli Lilly & Co.)、Nutropin(商標)(Genentech)、Norditropin(商標)(Novo-Nordisk)、Genotropin(商標)(Pfizer)およびSaizen/Serostim(商標)(Serono)。しかし、治療薬としての成長ホルモンの使用の有意な問題は、このタンパク質のインビボ半減期が短く、このため、有効性を最大にするには毎日、皮下注射により投与しなければならないということである(Mac Gillivrayら、J.Clin.Endocrinol.Metab.81:1806-1809(1996))。相当な努力が、生産コストを下げること、患者にとって投与がより容易になること、効力および安全性プロフィールを改善すること、ならびに競争できる利点をもたらす他の特性を生じさせることによる、hGH作動薬および拮抗薬の投与改善手段に向かっている。例えば、GenentechおよびAlkermesは、以前、小児の成長ホルモン欠損症用のNutropin Depot(商標)、hGHのデポー製剤を販売していた。このデポーは、より少ない投薬頻度(1日1回ではなく、2から3週間に1回)を可能にするが、望ましくない副作用、例えば、バイオアベイラビリティの低下および注射部位の痛みも随伴し、2004年に販売が中止された。もう一つの製品、Pegvisomant(商標)(Pfizer)も、最近、FDAにより承認された。Pegvisomant(商標)は、先端巨大症の治療に指示される高選択的成長ホルモン受容体拮抗薬として機能する、hGHの遺伝子操作類似体である(van der Lelyら、The Lancet 358:1754-1759(2001))。Pegvisomant(商標)の幾つかのアミノ酸残基は、ポリエチレンギリコール(PEG)ポリマーで誘導体化されているが、この製品は、やはり1日1回投与される。これは、この薬学的特性が最適でないことを示唆している。PEG化およびデポー製剤に加えて、hGHの吸入および経口剤形をはじめとする他の投与経路が、初期前臨床および臨床開発中であり、FDAからの承認を受けたものは未だない。従って、成長ホルモン活性を示すが、より長い血清半減期および従ってより最適な治療レベルのhGHおよび治療的半減期の増加ももたらすポリペプチドが、必要とされている。

## 【0010】

親水性ポリマー(エチレングリコール)(PEGと略記する)の共有結合による取り付けは、水溶性、バイオアベイラビリティを増大させる、血清半減期を増加させる、治療的半減期を増加させる、免疫原性を調節する、生物活性を調節する、またはタンパク質、ペプチドおよび特に疎水性分子をはじめとする多数の生物活性分子の循環時間を延長する1つの方法である。PEGは、医薬において、人工インプラントに対して、おならびに生体適合性、毒性欠如および免疫原性欠如が重要となる他の用途において、広範に使用されている。所望のPEG特性を最大にするために、生物活性分子に取り付けられるPEGポリマー(1つまたは複数)の全分子量および水和状態は、PEGポリマー取り付けに一般に付隨する有利な特徴、例えば水溶性および循環半減期の増加をもたらすために十分な高さでなければならないが、この親分子の生物活性に悪影響を及ぼすほどの高さであってはならない。

## 【0011】

10

20

30

40

50

P E G誘導体は、反応性化学官能基、例えば、リシン、システインおよびヒスチジン残基、このN末端および炭水化物部分により生物活性分子に連結されることが多い。タンパク質および他の分子が有するポリマーの取り付けに利用できる反応性部位の数は限られている。多くの場合、ポリマー取り付けによる修飾に最も適する部位は、受容体結合に有意な役割を果たし、この分子の生物活性の維持に必要である。結果として、生物活性分子上のこうした反応性部位へのポリマー鎖の無差別な取り付けは、多くの場合、このポリマー変性分子の生物活性の有意な減少または全損失さえも導く。R . C l a r k ら、( 1 9 9 6 ) , J . B i o l . C h e m . , 2 7 1 : 2 1 9 6 9 - 2 1 9 7 7 。ターゲット分子に所望の利点を付与するために十分なポリマー分子量を有するコンジュゲートを形成するための先行アプローチは、この分子への多数のポリマーアームの無作為な取り付けを一般に含んでおり、この結果、親分子の生物活性が減少するまたは全て損われる危険性さえ増加させるものであった。

## 【 0 0 1 2 】

タンパク質にP E G誘導体を取り付けるための座を形成する反応性部位は、このタンパク質の構造に左右される。タンパク質（酵素を含む）は、一般構造H<sub>2</sub>N--C H R --C O O Hを有するアルファ-アミノ酸の様々な配列から成る。1つのアミノ酸のアルファアミノ部分(H<sub>2</sub>N--)が、隣接するアミノ酸のカルボキシル部分(--C O O H)につながってアミドリンクエージを形成し、これは、--(N H --C H R --C O )<sub>n</sub>--(この式中、下付き文字「n」は、数百または数千に相当し得る)と表すことができる。Rによって表されるフラグメントは、タンパク質の生物活性のための、およびP E G誘導体の取り付けのための反応性部位を含有しうる。

## 【 0 0 1 3 】

例えば、アミノ酸リシンの場合、イプシロン位ならびにアルファ位に--N H<sub>2</sub>部分が存在する。このイプシロン--N H<sub>2</sub>は、塩基性p Hの条件下では自由に反応できる。P E Gでのタンパク質誘導体化の分野における技術の多くが、タンパク質中に存在するリシン残基のイプシロン--N H<sub>2</sub>部分に取り付けるためのP E G誘導体の開発に向けられてきた。「高度なP E G化のためのポリエチレングリコールおよび誘導体(Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation)」, Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17。しかし、これらのP E G誘導体のすべてが、タンパク質の表面に、多くの場合、非常に多数のリシン残基が存在する中、選択的に取り付けることができないという共通の制限を有する。これは、リシン残基が、例えば、酵素活性部位に存在するタンパク質活性に重要である事例、またはリシン残基がこのタンパク質と他の生体分子の相互作用の媒介に一定の役割を果たす場合、例えば受容体結合部位の場合、有意な制限となり得る。

## 【 0 0 1 4 】

既存のタンパク質P E G化方法の第二の、同様に重要な複雑化要因は、P E G誘導体が、所望のもの以外の残基との望ましくない副反応を受け得ることである。ヒスチジンは、構造的には--N(H)--と表される反応性イミノ部分を含有するが、イプシロン--N H<sub>2</sub>と反応する多くの化学反応性種も、--N(H)--と反応し得る。同様に、アミノ酸システインの側鎖は、構造的には-S Hと表される遊離スルフヒドリル基を有する。一部の事例では、リシンのイプシロン--N H<sub>2</sub>基に向けられたP E G誘導体が、システイン、ヒスチジンまたは他の残基とも反応する。これは、P E G誘導体化生物活性分子の複合、異種混合物、およびターゲットとなる生物活性分子の活性を壊す危険性を生じさせることがある。十分に定義されてもおり予測可能でもあるタンパク質表面上の特異的部位における生物活性分子への1つ以上のP E Gポリマーの選択的カップリングを可能にする、このタンパク質の中の単一の部位に化学官能基を導入することができる、P E G誘導体の開発が望まれるであろう。

## 【 0 0 1 5 】

リシン残基に加えて、当該技術分野では、システイン、ヒスチジンおよびこのN末端を

10

20

30

40

50

含む他のアミノ酸側鎖をターゲットにする活性化PEG試薬の開発に、相当な努力が向けてきた。例えば、米国特許第6,610,281号（これは、本明細書に参照により組み込まれている）、および「高度なPEG化のためのポリエチレングリコールおよび誘導体（Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation）」, Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17 参照。部位特異的突然変異誘発および当該技術分野において公知である他の技法を使用して、システイン残基をタンパク質の構造に部位選択的に導入することができ、結果として生じた遊離スルフヒドリル部分を、チオール反応性官能基を有するPEG誘導体と反応させることができる。しかし、このアプローチは、遊離スルフヒドリル基の導入により、結果として生じるタンパク質の発現、フォールディングおよび安定性が複雑化し得る点で、複雑である。  
従って、タンパク質への1つ以上PEGポリマーの選択的カップリングを可能にする一方で、それと同時に、スルフヒドリルおよびタンパク質において一般に見出せる他の化学官能基と相溶性である（すなわち、これらとの望ましくない副反応に関与しない）生物活性分子に、化学官能基を導入する手段を有することが望まれるであろう。

## 【0016】

当該技術分野のサンプリングからわかるように、タンパク質の側鎖、特に、リシンアミノ酸側鎖上の - - NH<sub>2</sub> 部分およびシステイン側鎖上の - SH 部分に取り付けるために開発されたこれらの誘導体の多くは、これらの合成および使用に問題があることが立証されている。加水分解され、この結果、分解、減成されるか、水性環境の中、例えば血流中で別様に不安定である、タンパク質との不安定なリンクエージを形成するものもある。より安定なリンクエージを形成するが、このリンクエージ形成前に加水分解を受けるものもある。これは、PEG誘導体上の反応性基を不活性化させた後、このタンパク質を取り付けることができるることを意味する。多少毒性であり、このためインビボでの使用にあまり適さないものもある。反応が遅すぎて、事実上、有用でないものもある。タンパク質の活性に責任を負う部位に取り付けることが、このタンパク質活性を失わせることもある。これらが付く部位が特異的でないものもあり、これらも望ましい活性を失い、結果の再現性をなくすことになり得る。ポリ(エチレングリコール)部分でのタンパク質の修飾に付随する問題を克服するために、より安定なPEG誘導体（例えば米国特許第6,602,498号、これは本明細書に参照により組み込まれている）または分子および表面上のチオール部分と選択的に反応するPEG誘導体（例えば米国特許第6,610,281号、これは本明細書に参照により組み込まれている）が、開発された。選択的に反応して安定な化学結合を形成するように求められるまでは生理環境で化学的に不活性であるPEG誘導体が、当該技術分野において明確に必要とされている。

## 【0017】

最近、タンパク質の部位特異的修飾に付随する制限の多くを克服する見込みがある、タンパク質科学に関する全く新しい技術が報告された。具体的には、新たな成分が、原核生物大腸菌（Escherichia coli (E. coli)）（例えば、Wangら、(2001), Science 292: 498 - 500）および真核生物サッカロミセス・セレビジエ（Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)）（例えば、Chinら、Science 301: 964 - 7 (2003)）のタンパク質合成機構に追加され、それにより、遺伝的にコードされないアミノ酸をインビボでタンパク質に組み込むことが可能になった。この方法論を用いて、光親和性ラベルおよび光異性化性アミノ酸、ケトイミノ酸およびグリコシル化アミノ酸をはじめとする、新規化学的、物理的および生物学的特性を有する多数の新たなアミノ酸が、アンバーコドン、TAGに応答して、大腸菌および酵母菌中のタンパク質に、効率的に、および高忠実度で組み込まれた。例えば、J.W.Chinら、(2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026 - 9027; J.W.Chin, & P.G.Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135 - 1137; J.W.Chinら、(2002), P

10

20

30

40

50

N A S   U n i t e d   S t a t e s   o f   A m e r i c a   9 9 : 1 1 0 2 0 - 1 1  
0 2 4 ; および L . W a n g , & P . G . S c h u l t z , ( 2 0 0 2 ) , C h e m .  
C o m m . , 1 - 1 0 参照。タンパク質中では見出せない、20の共通の、遺伝的にコードされたアミノ酸において見出される官能基のすべてに対して化学的に不活性である；および効率的および選択的に反応させて安定な二重結合を形成するために使用することができる化学官能基、例えばケトン基、アルキン基およびアジド部分を、選択的および日常的に導入することが可能であることが、これらの研究により実証された。

## 【 0 0 1 8 】

遺伝的にはコードされないアミノ酸をタンパク質に組み込むことにより、自然発生官能基、例えば、リシンのイプシロン - N H<sub>2</sub>、システインのスルフヒドリル - S H、ヒスチジンのイミノ基などに対する価値のある代替を提供することができる化学官能基の導入が可能となる。一定の化学官能基は、20の共通の、遺伝的にコードされるアミノ酸において見出される官能基に対して不活性であるが、明らかにおよび効率的に反応して、安定な結合を形成することがわかっている。例えば、アジドおよびアセチレン基は、触媒量の銅の存在下、水性条件で、H u i s g e n [ 3 + 2 ] 付加環化を受けることが、当該技術分野において公知である。例えば、T o r n o e ら、( 2 0 0 2 ) O r g . C h e m . 6 7 : 3 0 5 7 - 3 0 6 4 ; および R o s t o v t s e v ら、( 2 0 0 2 ) A n g e w . C h e m . I n t . E d . 4 1 : 2 5 9 6 - 2 5 9 9 参照。例えば、タンパク質構造へのアジド部分の導入により、タンパク質において見出されるアミン、スルフヒドリル、カルボン酸、ヒドロキシル基に対して化学的に不活性であるが、アセチレン部分と円滑におよび効率的に反応して付加環化生成物を形成することもできる官能基を組み込むことができる。重要なこととして、アセチレン部分の不在下、アジドは、他のタンパク質側鎖の存在下および生理条件下で、化学的に不活性および非反応性のままである。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 1 9 】

本発明は、数あるなかでも、G Hポリペプチドの活性および生産に関連した問題に対処し、ならびに改善された治療的半減期などの改善された生物学的または薬理学的特性を有するh G Hポリペプチドの生産にも対処する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 2 0 】

## ( 発明の簡単な要約 )

本発明は、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を含む、h G HポリペプチドをはじめとするG H超遺伝子ファミリーメンバーを提供する。

## 【 0 0 2 1 】

一部の実施態様において、前記h G Hポリペプチドは、1つ以上の後翻訳修飾を含む。一部の実施態様において、前記h G Hポリペプチドは、リンカー、ポリマーまたは生物活性分子に連結されている。一部の実施態様において、前記h G Hポリペプチドは、二官能性ポリマー、二官能性リンカー、または少なくとも1つの追加のh G Hポリペプチドに連結されている。

## 【 0 0 2 2 】

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)部分を含む。一部の実施態様において、前記ポリ(エチレングリコール)分子は、二官能性ポリマーである。一部の実施態様において、前記二官能性ポリマーは、第二のポリペプチドに連結されている。一部の実施態様において、前記第二ポリペプチドは、h G Hポリペプチドである。

## 【 0 0 2 3 】

一部の実施態様において、前記h G Hポリペプチドは、ポリ(エチレングリコール)部分を含む水溶性ポリマーに連結されている少なくとも2つのアミノ酸を含む。一部の実施

10

20

30

40

50

態様において、少なくとも 1 つのアミノ酸は、天然にはコードされないアミノ酸である。

**【0024】**

hGH の領域は、次のように説明することができる（この場合、hGH のアミノ酸位置は、真ん中の列に示す）：

**【0025】**

**【表1】**

ヘリックスA [1-5] - [6-33]	ヘリックスB A-Bループ [34-74] - [75-96]	ヘリックスC B-C ループ [97-105] - [106-129]	ヘリックスD C-D ループ [130-153] - [154-183]	[184-191] C-末端
N-末端				

10

**【0026】**

一部の実施態様では、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸が、hGH の二次構造に対応する次の領域（下記のとおり）のうちの1つ以上の領域内のいずれかの位置で組み込まれる：配列番号2または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの、1-5（N末端）、6-33（Aヘリックス）、34-74（AヘリックスとBヘリックスの間の領域、A-B ループ）、75-96（Bヘリックス）、97-105（BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B-C ループ）、106-129（Cヘリックス）、130-153（CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C-D ループ）、154-183（Dヘリックス）、184-191（C末端）。他の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、配列番号2または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの残基：1-5、32-46、97-105、132-149および184-191から成る群より選択される位置で置換される。一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、hGH における次の位置の1つ以上において組み込まれる：位置1の前（すなわち、N末端位置）、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、カルボキシル末端位置）（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）。

20

**【0027】**

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次の位置：29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上で置換される。

30

**【0028】**

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次の位置：29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、161、168、172、183、184、185、186、187（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上で置換される。

40

50

## 【0029】

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次の位置：35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、131、133、134、135、136、139、140、143、145、および155（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上で置換される。

## 【0030】

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次の位置：30、74、103（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上で置換される。一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次の位置：35、92、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上で置換される。10

## 【0031】

一部の実施態様において、これらの位置（下記の位置を含むが、これらに限定されない）の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される：位置1の前（すなわち、N末端位置）、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、カルボキシ末端位置）（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）。一部の実施態様において、これらの位置：30、35、74、92、103、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施態様において、これらの位置：35、92、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。2030

## 【0032】

ヒトGH拮抗薬としては、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、および127における置換もしくは位置1（すなわちN末端）における付加またはこれらのあらゆる組合せ（配列番号2、または配列番号1、3もしくは他のいずれかのGH配列の対応するアミノ酸）を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0033】

一部の実施態様において、本hGHポリペプチドは、hGHポリペプチド受容体に対するこのhGHポリペプチドの親和性を調節する置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、本hGHポリペプチドは、このhGHポリペプチドの安定性を増大させる置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、本hGHポリペプチドは、hGH配列番号2におけるF10A、F10H、F10I；M14W、M14Q、M14G；H18D、H21N；G120A；R167N；D171S；E174S；F176Y、I179Tまたはこれらのあらゆる組合せから成る群より選択されるアミノ酸置換を含む。一部の実施態様において、本hGHポリペプチドは、このhGHポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、本hGHポリペプチドは、このhGHポリペプチドの血清半減期または循環時間を調節する置換、付加または欠失を含む。40

## 【0034】

一部の実施態様において、本 hGH ポリペプチドは、この hGH ポリペプチドの水溶性を増大させる置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、前記 hGH ポリペプチドは、宿主細胞において生産されたこの hGH ポリペプチドの溶解性を増大させる置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、本 hGH ポリペプチドは、宿主細胞におけるこの hGH ポリペプチドの発現またはインピトロで合成されるこの hGH ポリペプチドの発現を増加させる置換、付加または欠失を含む。一部の実施態様において、本 hGH ポリペプチドは、アミノ酸置換 G120A を含む。この置換を含む hGH ポリペプチドは、作動薬活性を保持し、宿主細胞における発現レベルを維持または改善する。一部の実施態様において、本 hGH ポリペプチドは、この hGH ポリペプチドのプロテアーゼ耐性を増大させる置換、付加または欠失を含む。

10

## 【0035】

一部の実施態様において、前記 hGH ポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、自然発生アミノ酸での置換であってもよいし、自然には発生しないアミノ酸での置換であってもよいが、但し、少なくとも 1 つの置換は、天然にはコードされないアミノ酸での置換であることを条件とする。

## 【0036】

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含む。

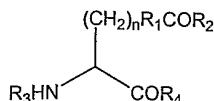
## 【0037】

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、カルボニル基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、構造：

20

## 【0038】

## 【化4】



(この場合、n は、0 から 10 であり； R<sub>1</sub> は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであり； R<sub>2</sub> は、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリールであり； R<sub>3</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり； ならびに R<sub>4</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である) を有する。

30

## 【0039】

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、アミノオキシ基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、ヒドラジド基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、ヒドラジン基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸残基は、セミカルバジド基を含む。

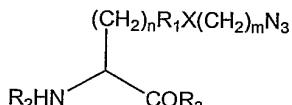
## 【0040】

40

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸残基は、アジド基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、構造：

## 【0041】

## 【化5】



(この場合、n は、0 から 10 であり； R<sub>1</sub> は、アルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、存在せず； X は、O、N、S であるか、存在せず； m は、0 から 1

50

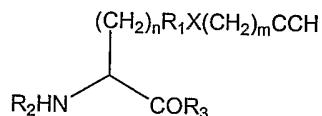
0であり；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）を有する。

【0042】

一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、アルキン基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、構造：

【0043】

【化6】



10

（この場合、nは、0から10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであり；Xは、O、N、Sであるか、存在せず；mは、0から10であり；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）を有する。

【0044】

一部の実施態様において、前記ポリペプチドは、hGHポリペプチド作動薬、部分作動薬、拮抗薬、部分拮抗薬、または逆作動薬である。一部の実施態様において、前記hGHポリペプチド作動薬、部分作動薬、拮抗薬、部分拮抗薬、または逆作動薬は、水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含む。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーは、ポリ（エチレンギリコール）部分を含む。一部の実施態様において、前記hGHポリペプチド作動薬、部分作動薬、拮抗薬、部分拮抗薬、または逆作動薬は、天然にはコードされないアミノ酸、および1つ以上の後翻訳修飾、リンカー、ポリマーまたは生物活性分子を含む。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸は、hGHポリペプチドのSite II領域（ACヘリックスバンドル面、ヘリックスAのアミノ末端領域、およびヘリックスCの一部を包含する、タンパク質の領域）内に存在する。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、このhGHポリペプチド拮抗薬が第二のhGHポリペプチド受容体分子に結合することを防止することにより、このhGHポリペプチド受容体の二量体化を防止する。一部の実施態様では、グリシン以外のアミノ酸により、配列番号2（hGH）におけるG120が置換される。一部の実施態様では、アルギンにより、配列番号2におけるG120が置換される。一部の実施態様では、天然にはコードされないアミノ酸により、配列番号2におけるG120が置換される。

20

30

【0045】

本発明は、少なくとも1つのセレクターコドンを含むポリヌクレオチドであって、ストリンジメントな条件下で配列番号21または22にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸も提供する。一部の実施態様において、前記セレクターコドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドン、および四塩基コドンから成る群より選択される。

40

【0046】

本発明は、水溶性ポリマーに連結されているhGHポリペプチドを作製する方法も提供する。一部の実施態様において、この方法は、天然にはコードされないアミノ酸を含む単離されたhGHポリペプチドを、この天然にはコードされないアミノ酸と反応する部分を含む水溶性ポリマーと接触させることを含む。一部の実施態様において、前記hGHポリペプチドに組み込まれている前記天然にはコードされないアミノ酸は、20の共通アミノ酸のいずれに対しても別様に非反応性である水溶性ポリマーに対して反応性である。一部

50

の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに組み込まれている天然にはコードされないアミノ酸は、20の共通アミノ酸のいずれに対しても別様に非反応性であるリンカー、ポリマーまたは生物活性分子に対して反応性である。

#### 【0047】

一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結されている h G H ポリペプチドは、カルボニル含有アミノ酸を含む h G H ポリペプチドと、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基を含むポリ(エチレングリコール)分子とを反応させることにより作製される。一部の実施態様において、前記アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基は、アミドリンクージにより前記ポリ(エチレングリコール)分子に連結される。

10

#### 【0048】

一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結されている h G H ポリペプチドは、カルボニル基を含むポリ(エチレングリコール)分子と、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド基を含む天然にはコードされないアミノ酸を含むポリペプチドとを反応させることにより作製される。

#### 【0049】

一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結されている h G H ポリペプチドは、アルキン含有アミノ酸を含む h G H ポリペプチドとアジド部分を含むポリ(エチレングリコール)分子とを反応させることにより作製される。一部の実施態様において、前記アジドまたはアルキン基は、アミドリンクージにより前記ポリ(エチレングリコール)分子に連結される。

20

#### 【0050】

一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに連結されている h G H ポリペプチドは、アジド含有アミノ酸を含む h G H ポリペプチドとアルキン部分を含むポリ(エチレングリコール)分子とを反応させることにより作製される。一部の実施態様において、前記アジドまたはアルキン基は、アミドリンクージにより前記ポリ(エチレングリコール)分子に連結される。

#### 【0051】

一部の実施態様において、前記ポリ(エチレングリコール)分子は、約 0.1 kDa と約 100 kDa の間の分子量を有する。一部の実施態様において、前記ポリ(エチレングリコール)分子は、0.1 kDa と 50 kDa の間の分子量を有する。

30

#### 【0052】

一部の実施態様において、前記ポリ(エチレングリコール)分子は、分枝ポリマーである。一部の実施態様において、前記ポリ(エチレングリコール)分枝ポリマーの各枝は、1 kDa と 100 kDa の間、または 1 kDa と 50 kDa の間の分子量を有する。

#### 【0053】

一部の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに連結されている水溶性ポリマーは、ポリアルキレングリコール部分を含む。一部の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに組み込まれている天然にはコードされないアミノ酸残基は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含む。一部の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに組み込まれている天然にはコードされないアミノ酸残基は、カルボニル部分を含み、前記水溶性ポリマーは、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基またはセミカルバジド基を含む。一部の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに組み込まれている天然にはコードされないアミノ酸残基は、アルキン部分を含み、前記水溶性ポリマーは、アジド部分を含む。一部の実施態様において、前記 h G H ポリペプチドに組み込まれている天然にはコードされないアミノ酸残基は、アジド部分を含み、前記水溶性ポリマーは、アルキン部分を含む。

40

#### 【0054】

本発明は、天然にはコードされないアミノ酸を含む h G H ポリペプチドおよび医薬的に許容される担体を含む組成物も提供する。一部の実施態様において、前記天然にはコード

50

されないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。

【0055】

本発明は、セレクターコドンを含むhGHポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞も提供する。一部の実施態様において、前記細胞は、天然にはコードされないアミノ酸をhGHポリペプチドに置換するために、直交性RNAシンセターゼおよび／または直交性tRNAを含む。

【0056】

本発明は、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドを作製する方法も提供する。一部の実施態様において、この方法は、hGHポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（単数または複数）、直交性RNAシンセターゼおよび／または直交性tRNAを含む細胞を、このhGHポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養すること；ならびにこの細胞および／または培地からこのhGHポリペプチドを精製することを含む。

10

【0057】

本発明は、hGHポリペプチドの治療的半減期、血清半減期または循環時間を増加させる方法も提供する。本発明は、hGHポリペプチドの免疫原性を調節する方法も提供する。一部の実施態様において、この方法は、自然発生hGHポリペプチドにおけるいずれか1つもしくはそれ以上のアミノ酸を天然にはコードされないアミノ酸で置換すること、および／またはこのhGHポリペプチドをリンカー、ポリマー、水溶性ポリマーもしくは生物活性分子に連結させることを含む。

20

【0058】

本発明は、本発明のhGH分子の有効量でこうした治療が必要な患者を治療する方法も提供する。一部の実施態様において、この方法は、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドおよび医薬的に許容される担体を含む医薬組成物の治療有効量を患者に投与することを含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。

30

【0059】

本発明は、少なくとも1つのアミノ酸が、天然にはコードされないアミノ酸により置換されていることを除き、配列番号1、2、3に示す配列または他のあらゆるGHPolypeptide配列を含むhGHポリペプチドも提供する。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)部分を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドロジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、配列番号3(hGH)からの残基1-5、82-90、117-134および169-176から成る群より選択される位置で置換される。

【0060】

本発明は、医薬的に許容される担体、および少なくとも1つのアミノ酸が、天然にはコードされないアミノ酸により置換されている、配列番号1、2、3または他のあらゆるGHPolypeptide配列を含む、hGHポリペプチドを含む、医薬組成物も提供する。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、糖部分を含む。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーは、糖部分により前記ポリペプチドに連結されている。一部の実施態様において、リンカー、ポリマーまたは生物活性分子が、糖部分により前記hGHポリペプチドに連結されている。

40

【0061】

本発明は、共有結合によってこのhGHポリペプチドの单一のアミノ酸に連結されている水溶性ポリマーを含む、hGHポリペプチドも提供する。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)部分を含む。一部の実施態様において、前記水溶性ポリマーに共有結合により連結されているアミノ酸は、前記ポリペプチド中

50

に存在する、天然にはコードされないアミノ酸である。一部の実施態様において、天然にはコードされていないアミノ酸は位置 35 から 145 で置換される。

#### 【0062】

本発明は、少なくとも 1 つのリンカー、ポリマーまたは生物活性分子を含む hGH ポリペプチドを提供し、前記リンカー、ポリマーまたは生物活性分子は、前記ポリペプチドにリボソームにより組み込まれた天然にはコードされないアミノ酸の官能基によって、前記ポリペプチドに取り付けられている。一部の実施態様において、前記ポリペプチドは、モノPEG 化されている。本発明は、1 つ以上の天然にはコードされないアミノ酸に取り付けられているリンカー、ポリマーまたは生物活性分子を含む hGH ポリペプチドも提供し、この場合、前記天然にはコードされないアミノ酸は、予め選択された部位でこのポリペプチドにリボソームにより組み込まれている。

#### 【0063】

##### 定義

本発明は、本明細書に記載する特定の方法論、プロトコル、細胞系、構築物および試薬に限定されず、それなりに変化し得ることは、理解されるはずである。本明細書において用いる専門用語は、単に特定の実施態様を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するとは解釈されず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることも、理解されるはずである。

#### 【0064】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる単数形「a」、「a n」および「the」は、この文脈が明確に別様に指示していない限り、言及しているものの複数形を包含する。従って、例えば、「hGH」への言及は、1 つ以上のこうしたタンパク質への言及であり、当業者に公知であるこの等価物などを包含する。

#### 【0065】

別様に定義しない限り、本明細書において用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の通常の技術者に一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書において説明するものと同様または等価のあらゆる方法、装置および材料を、本発明の実施および検査において使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をこれから説明する。

#### 【0066】

本明細書において言及するすべての出版物および特許は、今説明している発明と共に使用されることがある、例えばこれらの出版物に記載されている構築物および方法論を説明および開示するために、参照により本明細書に組み込まれている。本明細書において論じる出版物は、本出願の出願日より前のこれらの開示についてのみ提供する。本発明者らが、先行発明により、またはあらゆる他の理由のために、こうした開示より前の日付を付ける権利がないものと承認されるものは、本明細書にはない。

#### 【0067】

用語「実質的に精製された」は、この自然発生環境（すなわち、天然細胞、または組換え生産 hGH ポリペプチドの場合には宿主細胞）において見出されるようなタンパク質に、通常、随伴する、またはこれらと相互作用する成分が、実質的にまたは本質的ないであろう、hGH ポリペプチドを指す。細胞材料が実質的ないであろう hGH ポリペプチドとしては、（乾燥重量で）約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、または約 1% 未満の汚染タンパク質を有する、タンパク質の調製物が挙げられる。hGH ポリペプチドまたはこの変異体が、宿主細胞により組換え生産される場合、このタンパク質は、これらの細胞の乾燥重量の約 30%、約 25%、約 20%、約 15%、約 10%、約 5%、約 4%、約 3%、約 2% もしくは約 1% またはそれ未満で存在し得る。hGH ポリペプチドまたはこの変異体が、宿主細胞により組換え生産される場合、このタンパク質は、この細胞の乾燥重量の約 5 g / L、約 4 g / L、約 3 g / L、約 2 g / L、約 1 g / L、約 750 mg / L、約 500 mg / L、約 250 mg / L、約 100 mg / L、約 50 mg / L、約 1

10

20

30

40

50

0 mg / L、もしくは約 1 mg / L、またはそれ未満で、培地中に存在し得る。従って、本発明の方法により生産される場合の「実質的に精製された」hGHポリペプチドは、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SECおよびキャピラリー電気泳動などの適切な方法により判定して、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70% の純度レベル、とりわけ、少なくとも約 75%、80%、85% の純度レベル、さらにとりわけ、少なくとも約 90% の純度レベル、少なくとも約 95% の純度レベル、少なくとも約 99% またはそれ以上の純度レベルを有する。

## 【0068】

10

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」は、挿入のために使用される方法（例えば、直接取り込み、導入、f - マッチング、または組換え宿主細胞を生じさせることが当該技術分野において公知である他の方法）にかかわらず、外在性ポリヌクレオチドを含む細胞を指す。外在性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター、例えばプラスミドとして維持されることもあり、または宿主ゲノムに組み込まれることもある。

## 【0069】

ここで用いる用語「培地（単数または複数）」は、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、CHO細胞または大腸菌はじめとするいずれかの宿主細胞および細胞内容物を支持または含有することができる、あらゆる培養基、溶液、固体、半固体、または剛性支持体を包含する。従って、この用語は、宿主細胞を成長させた培地、例えば、増殖段階前または後、いずれかの培地を含む、hGHポリペプチドが分泌された培地を包含する。この用語は、hGHポリペプチドが細胞内で生産される場合、および宿主細胞が溶解または破壊されて、hGHポリペプチドを放出する場合のような、宿主細胞溶解産物を含有する緩衝液または試薬も包含する。

20

## 【0070】

タンパク質リフォールディングに関してここで用いる「還元剤」は、スルフヒドリル基を還元状態で維持し、分子内または分子間ジスルフィド結合を減少させる、あらゆる化合物または材料と定義する。適する還元剤としては、ジチオトレイイトール (DTT)、2-メルカプトエタノール、ジチオエリトリトール、システイン、システアミン (2-アミノエタンチオール)、および還元グルタチオンが挙げられるが、これらに限定されない。多種多様な還元剤が、本発明の方法および組成物での使用に適することは、通常の当業者には容易にわかる。

30

## 【0071】

タンパク質リフォールディングに関してここで用いる「酸化剤」は、酸化される化合物から電子を除去することができるあらゆる化合物または材料と定義する。適する酸化剤としては、酸化グルタチオン、シスチン、シスタミン、酸化ジチオトレイイトール、酸化エリトレイイトール、および酸素が挙げられるが、これらに限定されない。多種多様な酸化剤が、本発明の方法および組成物での使用に適することは、通常の当業者には容易にわかる。

## 【0072】

40

ここで用いる「変性作用因子 (Denaturing agent)」または「変性剤 (denaturant)」は、タンパク質の可逆的アンフォールディングを生じさせるであろう化合物または材料と定義する。変性作用因子または変性剤の強さは、この特定の変性作用因子または変性剤の特性と濃度の両方により決まるだろう。適する変性作用因子または変性剤は、カオトロープ、界面活性剤、有機溶媒、水混和性溶媒、リン脂質、またはこうした作用因子 2 つまたはそれ以上の組合せであり得る。適するカオトロープとしては、尿素、グアニジン、およびチオシアニン酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。有用な界面活性剤としては、強界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムまたはポリオキシエチレンエーテル（例えば、Tween もしくは Triton 界面活性剤）、Sarkosyl、弱非イオン性界面活性剤（例えば、ジギトニン）、弱力チオン性界面活性剤 [ 例えば、N->2,3-(ジオレイオキシ)-プロピル-N,N,N-トリメ

50

チルアンモニウム]、弱イオン性界面活性剤(例えば、コール酸ナトリウムもしくはデオキシコール酸ナトリウム)または両性イオン性界面活性剤[スルホベタイン(Zwittargent)、硫酸3-(3-クロロアミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパン(CHAPS)、およびスルホン酸3-(3-クロロアミドプロピル)ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパン(CHAPSO)を含むが、これらに限定されない]が挙げられるが、これらに限定されない。有機、水混和性溶媒、例えばアセトニトリル、低級アルカノール(とりわけ、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>アルカノール、例えば、エタノールもしくはイソプロパノール)または低級アルカンジオール(とりわけ、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>アルカンジオール、例えば、エチレン-グリコール)は、変性剤として使用することができる。本発明において有用なリン脂質は、天然リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトール、または合成リン脂質誘導体もしくは変異体、例えば、ジヘキサノイルホスファチジルコリンもしくはジヘプタノイルホスファチジルコリンであり得る。10

#### 【0073】

ここで用いる「リフォールディング」は、ジスルフィド結合含有ポリペプチドを、不適切にフォールドされた、またはアンフォールドされた状態から、本来の配座またはジスルフィド結合を基準にして適切にフォールドされた配座に変換する、あらゆるプロセス、反応または方法を記述するものである。

#### 【0074】

ここで用いる「コフォールディング」は、互いに相互作用する少なくとも2つのポリペプチドを利用し、アンフォールドされたまたは不適切にフォールドされたポリペプチドを本来の適切にフォールドされたポリペプチドに変換させる、リフォールディングプロセス、反応または方法を特に指す。20

#### 【0075】

ここで用いる「成長ホルモン」または「GH」は、これらの生物活性にかかわらず、およびさらにこれらの合成または製造方法[組換え法(cDNAから生産されるものであろうと、ゲノムDNAから生産されるものであろうと、合成DNAからの生産されるものであろうと、または他の形態の核酸から生産されるものであろうと)、合成法、トランスジェニック法、および遺伝子活性化法を含むが、これらに限定されない]にかかわらず、ヒト成長ホルモンの少なくとも1つの生物活性を有するポリペプチドおよびタンパク質、ならびにGH類似体、GHアイソフォーム、GH模擬体、GHフラグメント、ハイブリッドGHタンパク質、融合タンパク質オリゴマーおよび多量体、相同体、グリコシリ化ペプチド変異体、およびこれらの突然変異タンパク質を包含するものとする。30

#### 【0076】

用語「hGHポリペプチド」は、1つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失を含むhGHポリペプチドを包含する。置換の具体例としては、例えば、天然hGHの位置41におけるリシンの置換または位置176におけるフェニルアラニンの置換が挙げられる。場合により、この置換は、位置41での置換であるならば、イソロイシンもしくはアルギニン残基であり得、または位置が176であるならば、チロシン残基である。位置F10は、例えばA、HまたはIで置換することができる。位置M14は、例えばW、QまたはGで置換することができる。置換の他の具体例としては、40

R167N、D171S、E174S、F176Y、I179T；

R167E、D171S、E174S、F176Y；

F10A、M14W、H18D、H21N；

F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171S、E174S、F176Y、I179T；

F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171A、E174S、F176Y、I179T；

F10H、M14G、H18N、H21N；

F10A、M14W、H18D、H21N、R167N、D171A、T175T、I

50

179T；または

F10I、M14Q、H18E、R167N、D171S、I179T

を含む（しかし、これらに限定されない）、いずれかの置換またはこれらの組合せが挙げられる。例えば、米国特許第6,143,523号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。

#### 【0077】

作動薬活性を増大させる置換、プロテアーゼ耐性を増大させる置換、ポリペプチドを拮抗薬に変換する置換などを含む、自然発生hGHの多種多様なアミノ酸位置における置換の具体例が、記載されており、これらは、用語「hGHポリペプチド」に包含される。

#### 【0078】

作動薬hGH配列としは、例えば、次の修飾を含む自然発生hGH配列が挙げられる：H18D、H21N、R167N、D171S、E174S、I179T。例えば、米国特許第5,849,535号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。さらなる作動薬hGH配列としては、

H18D、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174S；

H18A、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174S；または

H18D、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174A

が挙げられる。例えば、米国特許第6,022,711号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。H18A、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174Aにおける置換を含むhGHポリペプチドは、Site IにおけるhGH受容体に対する親和性を強化する。例えば、米国特許第5,854,026号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。プロテアーゼに対する耐性を増大させたhGH配列としては、このC-Dループ内における1つ以上のアミノ酸置換を含むhGHポリペプチドが挙げられるが、これに限定されない。一部の実施態様において、置換としては、R134D、T135P、K140Aおよびこれらのあらゆる組合せが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Alamra (1998) J. Biotechnol. 65: 183-190参照。

#### 【0079】

ヒト成長ホルモン拮抗薬としては、例えば、G120（例えば、G120R、G120K、G120W、G120Y、G120F、またはG120E）における置換を有するもの、および時として次の置換：H18A、Q22A、F25A、D26A、Q29A、E65A、K168A、E174Aをさらに含むものが挙げられる。例えば、米国特許第6,004,931号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、G Hを拮抗薬として作用させる領域106から108または127から129における置換を少なくとも1つ含む。例えば、米国特許第6,608,183号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、hGH分子のSite II結合領域内に存在する水溶性ポリマーに連結されている天然にはコードされないアミノ酸を含む。一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、G120における置換と共に次の置換：H18D、H21N、R167N、K168A、D171S、K172R、E174S、I179T、をさらに含む（例えば、米国特許第5,849,535号参照）。

#### 【0080】

完全長自然発生G Hアミノ酸配列ならびに成熟自然発生G Hアミノ酸配列および自然発生突然変異体については、本明細書における配列番号1、配列番号2および配列番号3をそれぞれ参照のこと。一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、配列番号1、配列番号2もしくは配列番号3、または成長ホルモンポリペプチドの他のいずれかの配列と実質的に同一である。hGHの多数の自然発生突然変異体が、同定されている。これらと

10

20

30

40

50

しては、hGH-V (Seeger, DNA 1 : 239 (1982) ; 米国特許第4,446,235号、同第4,670,393号および同第4,665,180号(これらは、本明細書に参照により組み込まれている)) および hGH の残基 32 から 46 の欠失を有する 20-kDa hGH (配列番号 3) (Kostyola, Biochem. Biophys. Acta 925 : 314 (1987); Lewis, U.ら、J. Biol. Chem., 253 : 2679 - 2687 (1978)) が挙げられる。胎盤成長ホルモンは、Igout, A. ら、Nucleic Acids Res. 17 (10) : 3998 (1989) に記載されている。加えて、タンパク質溶解性切断変異体または 2 本鎖変異体をはじめとする、後転写プロセス、後翻訳プロセス、分泌プロセス、代謝プロセッシングプロセス、および他の生理プロセスから生じた多数の hGH 変異体が、報告されている (Baumann, G., Endocrine Reviews 12 : 424 (1991))。Cys-Cysジスルフィドリンクージにより直接連結している hGH 二量体は、Lewis, U. J. ら、J. Biol. Chem. 252 : 3697 - 3702 (1977); Brostedt, P. and Roos, P., Prep. Biochem. 19 : 217 - 229 (1989) に記載されている。hGH 突然変異体および突然変異 hGH ポリペプチドをコードする核酸分子は周知であり、こうした核酸分子としては、米国特許第 5,534,617 号; 同第 5,580,723 号; 同第 5,688,666 号; 同第 5,750,373 号; 同第 5,834,250 号; 同第 5,834,598 号; 同第 5,849,535 号; 同第 5,854,026 号; 同第 5,962,411 号; 同第 5,955,346 号; 同第 6,013,478 号; 同第 6,022,711 号; 同第 6,136,563 号; 同第 6,143,523 号; 同第 6,428,954 号; 同第 6,451,561 号; 同第 6,780,613 号および米国特許出願公開第 2003/0153003 号(これらは、本明細書に参照により組み込まれている)に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0081】

hGH の市販製剤は、次の名前で販売されている: Humatrop (商標) (Eli Lilly & Co.)、Nutropin (商標) (Genentech)、Norditropin (商標) (Novo-Nordisk)、Genotropin (商標) (Pfizer) および Saizen/Serostim (商標) (Serono)。

#### 【0082】

用語「hGH ポリペプチド」は、自然発生 hGH の医薬的に許容される塩およびプロドラッグ、これらの塩のプロドラッグ、多形、水和物、溶媒和物、生物活性フラグメント、生物活性変異体および立体異性体、ならびに自然発生 hGH およびこのポリペプチド融合体の作動薬変異体、模倣変異体および拮抗薬変異体も包含する。追加のアミノ酸をこのアミノ末端、カルボキシ末端または両方に含む融合体は、用語「hGH ポリペプチド」に包含される。融合体の具体例としては、例えば、組換え発現の結果としてメチオニンが hGH の N 末端に連結されているメチオニル成長ホルモン；精製のための融合体（ポリ-ヒスチジンもしくは親和性エピトープを含むが、これらに限定されない）；血清アルブミン結合ペプチドとの融合体；および血清アルブミンなどの血清タンパクとの融合体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0083】

様々な参考文献により、ポリマーのコンジュゲーションまたはグリコシル化によるポリペプチドの修飾が開示されている。用語「hGH ポリペプチド」は、PEG などのポリマーにコンジュゲートしたポリペプチド、およびシステイン、リシンまたは他の残基の 1 つ以上の追加の誘導体化から成り得るポリペプチドを包含する。加えて、hGH ポリペプチドは、リンカーまたはポリマーを含むことができ、この場合、このリンカーまたはポリマーがコンジュゲートしているアミノ酸は、本発明の天然でないアミノ酸であってもよく、または当該技術分野において公知である技法、例えば、リシンもしくはシステインへのカップリングを利用して天然にコードされたアミノ酸にコンジュゲートさせることができる

10

20

30

40

50

。

## 【0084】

hGHポリペプチドのポリマーコンジュゲーションが報告されている。例えば、5, 849, 535号、同第6, 136, 563号および同第6, 608, 183号参照（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）。米国特許第4, 904, 584号には、少なくとも1つのリシン残基が欠失しているか、他のいずれかのアミノ酸残基で置換されている、PEG化リシン枯渇ポリペプチドが開示されている。国際公開第99/67291号には、タンパク質をPEGとコンジュゲートさせるプロセスが開示されており、この場合、このタンパク質上の少なくとも1つのアミノ酸残基は、欠失しており、このタンパク質をPEGと、このタンパク質へのコンジュゲーションを達成するために十分な条件下で接触させる。国際公開第99/03887号には、成長ホルモンスーパーファミリーに属するポリペプチドのPEG化変異体が開示されており、この場合、システイン残基が、このポリペプチドの指定領域内に位置する非必須アミノ酸で置換されている。国際公開第00/26354号は、対応する親ポリペプチドと比較して、少なくとも1つの追加グリコシル化部位を含む、アレルゲン性が低減されたグリコシル化ポリペプチドの生産方法が開示されている。10

## 【0085】

用語「hGHポリペプチド」は、N連結またはO連結型グリコシル化形態のポリペプチドも包含する。単一のヌクレオチド変更を有する変異体もhGHポリペプチドの生物活性変異体と見なされる。加えて、スプライス変異体も包含される。用語「hGHポリペプチド」は、化学的手段により連結された、もしくは融合タンパク質として発現された、いずれか1つ以上のhGHポリペプチドまたは他のあらゆるポリペプチド、タンパク質、炭水化物、ポリマー、小分子、リガンドもしくはあらゆるタイプの他の活性分子のhGHポリペプチドヘテロ二量体、ホモ二量体、ヘテロ多量体またはホモ多量体も包含し、ならびに例えば特異的欠失または他の修飾を有するポリペプチド類似体は、生物活性をなお維持する。20

## 【0086】

本明細書に記載するhGHに関するアミノ酸および位置へのすべての言及は、特に別の指定が（すなわち、この比較が、配列番号1、3または他のhGH配列に基づくと述べられている場合で）ない限り、配列番号2における位置に基づく。配列番号1、2、3または他のあらゆるGH配列における位置に対応するアミノ酸位置をhGH融合体、変異体、フラグメントなどの他のあらゆるhGH分子において容易に同定できることは、当業者には理解されるだろう。例えば、BLASTなどの配列アラインメントプログラムは、配列番号1、2、3または他のいずれかのGH配列における位置と一致するタンパク質内の特定の位置をアラインおよび同定するために使用することができる。配列番号1、2、3または他のいずれかのGH配列を参照して本明細書に記載されているアミノ酸の置換、欠失または付加は、本明細書に記載されている、または当該技術分野において知られている、および本発明に明白に包含される、hGH融合体、変異体、フラグメントなどの対応する位置における置換、欠失または付加も指すと解釈する。30

## 【0087】

用語「hGHポリペプチド」は、1つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失を含むhGHポリペプチドを包含する。本発明のhGHポリペプチドは、1つ以上の天然でないアミノ酸修飾と共に、1つ以上の天然アミノ酸での修飾から成り得る。作動薬活性を増大させる、このポリペプチドの溶解性を増大させる、このポリペプチドを拮抗薬に変換するなど（しかし、これらに限定されない）hGHポリペプチドの1つ以上の生物活性を調節する置換をはじめとする（しかし、これらに限定されない）自然発生hGHポリペプチドにおける多種多様なアミノ酸位置での典型的な置換は記載されており、これらはこの用語「hGHポリペプチド」に包含される。40

## 【0088】

ヒトGH拮抗薬としては、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、150

9、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、および127における置換もしくは位置1での（すなわち、N末端での）付加、またはこれらのあらゆる組合せを有するもの（配列番号2、または配列番号1、3もしくは他のいずれかのGH配列における対応するアミノ酸）が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、GHを拮抗薬として作用させる、領域1-5（N末端）、6-33（Aヘリックス）、34-74（AヘリックスとBヘリックスの間の領域、A-Bループ）、75-96（Bヘリックス）、97-105（BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B-Cループ）、106-129（Cヘリックス）、130-153（CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C-Dループ）、154-183（Dヘリックス）、184-191（C末端）における少なくとも1つの置換を含む。他の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸が組み込まれる部位の具体例としては、ヘリックスAのアミノ末端領域およびヘリックスCの一部の中の残基が挙げられる。もう一つの実施態様では、p-アジド-L-フェニルアラニンまたはO-プロパルギル-L-チロシンなどの天然にはコードされないアミノ酸でのG120置換。他の実施態様では、上に挙げた置換を、hGHポリペプチドをhGH拮抗薬にさせる追加の置換と組み合わせる。例えば、天然にはコードされないアミノ酸を本明細書において特定する位置の1つで置換し、G120（例えば、G120R、G120K、G120W、G120Y、G120F、またはG120E）における同時置換を導入する。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、hGH分子の受容体結合領域内に存在する水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含む。  
10  
20

#### 【0089】

一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、hGHポリペプチドの生物活性を調節する付加、置換または欠失をさらに含む。例えば、前記付加、置換または欠失は、hGHポリペプチド受容体に対する親和性を調節することができ、受容体の二量体化を調節する（「増加させる」または「減少させる」を含むが、これらに限定されない）ことができ、受容体二量体を安定させることができ、循環半減期を調節することができ、治療的半減期を調節することができ、ポリペプチドの安定性を調節することができ、用量を調節することができ、放出もしくはバイオアベイラビリティを調節することができ、精製を助長することができ、または特定の投与経路を改善もしくは変更することができる。同様に、hGHポリペプチドは、このポリペプチドの検出（GFPを含むが、これに限定されない）、精製または他の特性を改善する、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合ドメイン（FLAGもしくはポリHisを含むが、これらに限定されない）もしくは他の親和性に基づく配列（FLAG、ポリHis、GSTなどを含むが、これらに限定されない）または連結された分子（ビオチンを含むが、これに限定されない）を含むことができる。  
30

#### 【0090】

用語「hGHポリペプチド」は、同じまたは異なる天然にはコードされないアミノ酸側鎖に連結されているか、天然にコードされるアミノ酸側鎖に連結されている（天然にはコードされないアミノ酸側鎖により直接連結されているものを含むが、これに限定されない）、またはリンカーにより間接的に連結されている、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体およびヘテロ多量体も包含する。リンカーの具体例としては、水溶性ポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）もしくはポリデキストラン、またはポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。  
40

#### 【0091】

「天然にはコードされないアミノ酸」は、20の共通アミノ酸またはピロリシンもしくはセレノシステインのうちの1つではないアミノ酸を指す。用語「天然にはコードされないアミノ酸」と同義に用いることができる他の用語は、「天然でないアミノ酸」、「非天然アミノ酸」、「自然には発生しないアミノ酸」ならびにこれらの様々にハイフンでつながれた、およびハイフンでつながれていないバージョンである。用語「天然にはコードされないアミノ酸」は、天然にコードされるアミノ酸（20の共通アミノ酸またはピロリシンおよびセレノシステインを含むが、これらに限定されない）の修飾（例えば、後翻訳修  
50

飾)により発生するが、これら自体がこの翻訳複合体により成長ペリペチド鎖に自然に組み込まれないアミノ酸を含むが、これらに限定されない。こうした自然には発生しないアミノ酸の例としては、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-トレオニンおよびD-ホスホチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0092】

「アミノ末端修飾基」は、ペリペチドのアミノ末端に取り付けることができるあらゆる分子を指す。同様に、「カルボキシ末端修飾基」は、ペリペチドのカルボキシ末端に取り付けることができるあらゆる分子を指す。末端修飾基には、様々な水溶性ポリマー、ペチドもしくはタンパク質、例えば血清アルブミン、またはペチドの血清半減期を増加させる他の部分が挙げられるが、これらに限定されない。10

#### 【0093】

用語「官能基」、「活性部分」、「活性化基」、「脱離基」、「反応性部位」、「化学反応性基」および「化学反応性部分」は、当該技術分野において用いられており、ここでは、分子の個別の定義できる部分または単位を指すために用いる。これらの用語は、化学技術分野ではやや同義であり、ここでは、何らかの機能または活性を果たし、他の分子と反応性である分子の部分を指すために使用する。

#### 【0094】

用語「リンクエージ」または「リンクカー」は、化学反応の結果として正常に形成され、一般には共有結合性リンクエージである基または結合を指すためにここでは用いる。加水分解安定性リンクエージは、このリンクエージが水中で実質的に安定であり、有用なpH値で水と反応しないことを意味し、前記「有用なpH値で」は、「長期間にわたって生理条件下で」を含み、おそらく「無期限に生理条件下で」さえも含むが、これらに限定されない。加水分解不安定性または分解性リンクエージは、これらのリンクエージが、水または水溶液(例えば血液を含む)中で分解し得ることを意味する。酵素安定性または分解性リンクエージは、このリンクエージが、1つ以上の酵素により分解され得ることを意味する。当該技術分野において理解されているように、PEGおよび関連ポリマーは、ポリマー主鎖に、またはポリマー主鎖とこのポリマー分子の1つもしくはそれ以上の末端官能基の間のリンクエージに、分解性リンクエージを含むことができる。例えば、PEGカルボン酸または活性PEGカルボン酸が生物活性因子上のアルコール基と反応することにより形成されるエステルリンクエージは、一般に、生理条件下で加水分解して、この因子を放出する。他の加水分解分解性リンクエージとしては、カルボネートリンクエージ;アミンとアルデヒドの反応から生じるイミンリンクエージ;アルコールをリンクエージと反応させることにより形成されるリンクエーステルリンクエージ;ヒドラジンとアルデヒドの反応生成物であるヒドラゾンリンクエージ;アルデヒドとアルコールの反応生成物であるアセタールリンクエージ;ギ酸塩とアルコールの反応生成物であるオルトエステルリンクエージ;PEGなどのポリマーの末端を含むがこれに限定されない位置のアミン基とペチドのカルボキシル基により形成されるペチドリンクエージ;およびポリマーの末端を含むがこれに限定されない位置のホスホルアミダイト基とオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基により形成されるオリゴヌクレオチドリンクエージが挙げられるが、これらに限定されない。3040

#### 【0095】

ここで用いる場合の用語「生物活性分子」、「生物活性部分」または「生物活性因子」は、ウイルス、細菌、真菌、植物、動物およびヒトを含むがこれらに限定されない生物体のいずれかの物理的または生化学的特性に作用することができるあらゆる物質を意味する。特に、ここで用いる生物活性分子としては、ヒトもしくは他の動物における疾病的診断、治癒、緩和、治療もしくは予防、またはヒトもしくは動物の肉体的もしくは精神的に良好な状態を別様に強化することを目的とするあらゆる物質が挙げられるが、これらに限定されない。生物活性分子の例としては、ペチド、タンパク質、酵素、小分子薬、色素、脂質、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、細胞、ウイルス、リボソーム、微粒子およびミセルが挙げられるが、これらに限定されない。本発明とともに使用するために適する生50

物活性因子のクラスとしては、抗生物質、殺真菌薬、抗ウイルス薬、抗炎症薬、抗腫瘍薬、心血管薬、抗不安薬、ホルモン、成長因子、ステロイド剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0096】

「二官能性ポリマー」は、他の部分（アミノ酸側鎖を含むが、これに限定されない）と特異的に反応して共有結合性または非二重結合性リンケージを形成することができる2つの別個の官能基を含むポリマーを指す。特定の生物活性成分上の基と反応する1つの官能基および第二の生体成分上の基と反応するもう1つの基を有する二官能性リンカーを使用して、第一の生物活性成分、二官能性リンカーおよび第二の生物活性成分を含むコンジュゲートを形成することができる。ペプチドに様々な化合物を取り付けるための多数の手順およびリンカー分子が公知である。例えば、欧州特許出願第188,256号；米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号、同第4,680,338号、同第4,569,789号、および同第4,589,071号参照（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）。「多官能性ポリマー」は、他の部分（アミノ酸測基を含むが、これらに限定されない）と特異的に反応して共有結合性または非共有結合性リンケージを形成することができる2つまたはそれ以上の別個の官能基を含むポリマーを指す。

#### 【0097】

置換基が、左から右に記載されたこれらの従来どおりの化学式により指定されているとき、これらは、右から左に構造を記載することにより得られる化学的に同一な置換基を同様に包含し、例えば、構造-CH<sub>2</sub>O-は、構造-OCH<sub>2</sub>-と等価である。

#### 【0098】

用語「置換基」は、「非干渉置換基」を含むが、これに限定されない。「非干渉置換基」は、安定な化合物を生じさせる基である。適する非干渉置換基またはラジカルとしては、ハロ、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アラルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルカリール、C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>シクロアルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>シクロアルケニル、フェニル、置換フェニル、トルオイル、キシレニル、ビフェニル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>アルコキシアルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>アルコキシアリール、C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>アリールオキシアルキル、C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>オキシアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルスルフィニル、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキルスルホニル、--(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>--O--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)（この場合のmは、1から8である）、アリール、置換アリール、置換アルコキシ、フルオロアルキル、複素環式ラジカル、置換複素環式ラジカル、ニトロアルキル、--NO<sub>2</sub>、--CN、--NRC(O)--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)、--C(O)--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキルチオアルキル、--C(O)O--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)、--OH、--SO<sub>2</sub>、=S、--COOH、--NR<sub>2</sub>、カルボニル、--C(O)--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)、--F<sub>3</sub>、--C(O)CF<sub>3</sub>、--C(O)NR<sub>2</sub>、-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アリール)-S--(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>アリール)、--C(O)--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アリール)、--(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>--O--(--(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>--O--(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル)（この場合のmは、1から8である）、--C(O)NR<sub>2</sub>、--C(S)NR<sub>2</sub>、--SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>、--NRC(O)NR<sub>2</sub>、--NRC(S)NR<sub>2</sub>、およびこれらの塩などが挙げられるが、これらに限定されない。ここで用いる各Rは、H、アルキルもしくは置換アルキル、アリールもしくは置換アリール、アラルキルまたはアルカリールである。

#### 【0099】

用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、ヨウ素、および臭素を包含する。

#### 【0100】

それ自体、または別の置換基の一部としての用語「アルキル」は、別様に明記していない限り、直鎖もしくは分枝鎖または環状炭化水素ラジカル、またはこれらの組合せを意味し、これらは、完全に飽和されていてもよいし、一置換されていてもよいし、または多置換されていてもよく、ならびに指定の炭素原子数を有する（すなわち、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>は、

10

20

30

40

50

1から10個の炭素原子を意味する)二価および多価ラジカルを包含し得る。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、s-ブチル、シクロヘキシル、(シクロヘキシル)メチル、シクロプロピルメチル、ならびに例えばn-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルの相同体および異性体などが挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペントジエニル、3-(1,4-ペントジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにより高次の相同体および異性体が挙げられるが、これらに限定されない。用語「アルキル」は、別様に述べていない限り、より詳細に下で定義するアルキルの誘導体、例えば「ヘテロアルキル」も包含するものと考える。炭化水素基に限定されるアルキル基は、「ホモアルキル」と呼ぶ。

## 【0101】

それ自体、または別の置換基の一部としての用語「アルキレン」は、構造-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-および-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-（しかし、これらに限定されない）により例示されるようなアルカンから誘導される二価ラジカルを意味し、「ヘテロアルキレン」として下で説明する基をさらに包含する。典型的に、アルキル（またはアルキレン）基は、1から24個の炭素原子を有するであろうが、10個またはそれ以下の炭素原子を有する基が、本発明では好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、より短い鎖のアルキルまたはアルキレン基、一般には8個またはそれ以下の炭素原子を有するアルキルまたはアルキレン基である。

## 【0102】

用語「アルコキシ」、「アルキルアミノ」および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）は、これらの従来どおりの意味で用いており、それぞれ酸素原子、アミノ基または硫黄原子によりこの分子の残りの部分に取り付けられているアルキル基を指す。

## 【0103】

それ自体、または別の用語との組合せでの用語「ヘテロアルキル」は、別様に明記していない限り、明記されている数の炭素原子と、O、N、SiおよびSから成る群より選択される少なくとも1つのヘテロ原子（この場合、前記窒素および硫黄原子は、場合により酸化されていてもよく、前記窒素原子は、場合により四級化されていてもよい）とから成る、安定な直鎖もしくは分枝鎖または環状炭化水素ラジカル、またはこれらの組合せ意味する。ヘテロ原子（複数を含む）O、NおよびSならびにSiは、このヘテロアルキル基のいずれかの内部位置で置換されていてもよいし、またはアルキル基がこの分子の残りの部分に取り付けられている位置で置換されていてもよい。例としては、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>、-CH=CH-O-CH<sub>3</sub>、-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-CH=N-OCH<sub>3</sub>、および-CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、-CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub>および-CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>のように、2個以下のヘテロ原子が連続していてもよい。同様に、それ自体、または別の置換基の一部としての用語「ヘテロアルキレン」は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-および-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-により例示される（しかし、これらに限定されない）ようなヘテロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基については、同じまたは異なるヘテロ原子が、この鎖の末端のいずれかまたは両方を占有していることがある（アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノ、アミノオキシアルキレンなどが挙げられるが、これらに限定されない）。なお、さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、この連結基の式に記載されている方向は、この連結基の配向を意味するものではない。例えば、式-C(O)<sub>2</sub>R' - は、-C(O)<sub>2</sub>R' - と-R' C(O)<sub>2</sub> - の両方を表す。

10

20

30

40

50

## 【0104】

これら自体、または他の用語との組合せでの用語「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」は、別様に明記していない限り、それぞれ「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状バージョンを表す。従って、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルは、飽和および不飽和環リンケージを含む。加えて、ヘテロシクロアルキルについてのヘテロ原子は、この複素環がこの分子の残りの部分に取り付けられる位置を占有することがある。シクロアルキルの例としては、シクロペンチル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキシル、3 - シクロヘキシル、シクロヘプチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例としては、1 - (1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジル)、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエン - 2 - イル、テトラヒドロチエン - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、この用語は、二環式および三環式環構造を包含する。同様に、それ自体、または別の置換基の一部としての用語「ヘテロシクロアルキレン」は、ヘテロシクロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味し、それ自体、または別の置換基の一部としての用語「シクロアルキレン」は、シクロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。

## 【0105】

ここで用いる用語「水溶性ポリマー」は、水性溶媒に可溶性であるあらゆるポリマーを指す。水性ポリマーのhGHポリペプチドへのリンケージは、未修飾形態を基準にして血清半減期の増加もしくは調節または治療的半減期の増加もしくは調節、免疫原性の調節、物理的会合特性、例えば凝集および多量体形成の調節、受容体結合の変更および受容体二量体化または多量体化の変更をはじめとする（しかし、これらに限定されない）変化を生じさせることができる。水溶性ポリマーは、それ独自の生物活性を有していてもよいし、または有していないてもよい。適するポリマーとしては、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、モノC1-C10アルコキシもしくはこのアリールオキシ誘導体（本明細書に参照により組み込まれている米国特許第5,252,714号に記載されているもの）、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸、無水マレイン酸ジビニルエーテル、N - (2 - ヒドロキシプロピル) - メタクリルアミド、デキストラン、デキストラン誘導体（硫酸デキストランを含む）、ポリプロピレングリコール、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリンフラグメント、多糖類、オリゴ糖類、グリカン、セルロースおよびセルロース誘導体（メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースを含むが、これらに限定されない）、デンプンおよびデンプン誘導体、ポリペプチド、ポリアルキレングリコールおよびこの誘導体、ポリアルキレングリコールのコポリマーおよびこれらの誘導体、ポリビニルエチルエーテルならびにアルファ - ベータ - ポリ [ (2 - ヒドロキシエチル) - DL - アスパルタミドなど、またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。こうした水溶性ポリマーの例としては、ポリエチレングリコールおよび血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0106】

ここで用いる用語「ポリアルキレングリコール」または「ポリ(アルケングリコール)」は、ポリエチレングリコール（ポリ(エチレングリコール)）、ポリブロピレングリコール、ポリブチレングリコール、およびこれらの誘導体を指す。用語「ポリアルキレングリコール」は、線状ポリマーと分枝ポリマーの両方を包含し、0.1kDaと100kDaの間の分子量を有する。他の具体例としての実施態様は、例えば、Shearwater Corporationのカタログ「Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications」(2001)などの市場の供給業者のカタログに載っている。

## 【0107】

10

20

30

40

50

別様に明記していない限り、用語「アリール」は、単一の環であってもよいし、または共に融合しているか共有結合により連結している多数の環（好ましくは1から3個の環）であってもよい、多不飽和芳香族炭化水素置換基を意味する。用語「ヘテロアリール」は、N、OおよびSから選択される1から4個のヘテロ原子（この場合、前記窒素および硫黄原子は場合により酸化されており、前記窒素原子は場合により四級化されている）を含有するアリール基（または環）を指す。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子によりこの分子の残りの部分に取り付けられていてもよい。アリールおよびヘテロアリール基の非限定的な例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンゾイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリニル、5-イソキノリニル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが挙げられる。上述のアリールおよびヘテロアリール環の各々についての置換基は、下で説明する許容可能な置換基の群より選択される。

## 【0108】

簡略のため、他の用語との組合せで用いるときの用語「アリール」（アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキルを含むが、これらに限定されない）は、上で定義したようなアリール環とヘテロアリール環の両方を包含する。従って、用語「アリールアルキル」は、炭素原子（メチレン基を含むが、これに限定されない）が例えれば酸素原子により置換されているもの（フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-（1-ナフチルオキシプロピルなどを含むが、これらに限定されない）をはじめとする、アリール基がアルキル基（ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなどを含むが、これらに限定されない）に取り付けられているラジカルを包含するものと考える。

## 【0109】

上の用語（「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」を含むが、これらに限定されない）の各々は、指示されているラジカルの置換形と非置換形の両方を包含するものと考える。各タイプのラジカルについての置換の具体例は、下で提供する。

## 【0110】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルと、多くの場合、呼ばれる基を含む）についての置換基は、ゼロから（ $2m' + 1$ ）（この式中、 $m'$ は、こうしたラジカル中の炭素原子の総数である）の範囲の数での、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CNおよび-NO<sub>2</sub>から選択される種々の基（しかし、これらに限定されない）の1つ以上であり得る。 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R''''$ は、各々独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール（1から3個のハロゲンで置換されているアリールを含むが、これに限定されない）、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が、例えば1つより多くのR基を含む場合、これらのR基の各々は、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R''''$ 基の1つより多くが存在するときの各 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R''''$ 基であるように、独立して選択される。 $R'$

10

20

30

40

50

'およびR"が、同じ窒素原子に取り付けられている場合、これらは、この窒素原子と組み合わさって、5、6または7員環を形成することができる。例えば、-NR'R"は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含む（しかし、これらに限定されない）ものと考える。置換基に関する上の論議から、用語「アルキル」を、水素原子以外の基に結合している基（炭素原子を含む）、例えば、ハロアルキル(-CF<sub>3</sub>および-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>を含むがこれらに限定されない）およびアシル（-C(O)CH<sub>3</sub>、-C(O)CF<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>などを含むがこれらに限定されない）を包含するものと考えることは、当業者には理解されるであろう。

## 【0111】

アルキルラジカルについて説明した置換基と同様に、アリールおよびヘテロアリール基についての置換基は様々であり、ゼロからこの芳香族環構造の開原子価の総数の範囲の数で、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R"、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R"R'"、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R"、-OC(O)NR'R"、-NR"C(O)R'、-NR'-C(O)NR"R'"、-NR"C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R")=NR"、-S(=O)R'、-S(=O)<sub>2</sub>R'、-S(=O)<sub>2</sub>NR'R"、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CNおよび-NO<sub>2</sub>、-R'、-N<sub>3</sub>、-CH(Ph)<sub>2</sub>、フルオロ(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルコキシ、およびフルオロ(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル（この場合、R'、R"、R'''およびR""は、水素、アルキル、ヘテロアルキル、アリールおよびヘテロアリールから独立して選択される）から選択されるが、これらに限定されない。本発明の化合物が、例えば1つより多くのR基を含む場合、これらのR基の各々は、R'、R"、R'''およびR""基の1つより多くが存在するときの各R'、R"、R'''、R""およびR""基であるように、独立して選択される。

## 【0112】

ここで用いる用語「調節された血清半減期」は、この未修飾形態を基準にした修飾された生物活性分子の循環半減期における正または負の変更を意味する。血清半減期は、生物活性分子の投与後、様々な時点で血液サンプルを採取し、各サンプル中のこの分子の濃度を判定することによって測定される。血清濃度と時間の相関関係により、この血清半減期を計算することができる。血清半減期増加は、望ましくは少なくとも約二倍の血清半減期増加を有するが、例えば、それによって満足な薬剤投与計画が可能となり、毒性効果が回避される場合には、それより少ない増加が有用であることもある。一部の実施態様において、この増加は、少なくとも約三倍、少なくとも約五倍、または少なくとも約十倍である。

## 【0113】

ここで用いる用語「調節された治療的半減期」は、この未修飾形態を基準にした修飾された活性分子の治療有効量の半減期における正または負の変更を意味する。治療的半減期は、投与後、様々な時点でこの分子の薬物動態特性および/または薬力学的特性を測定することによって測定される。治療的半減期増加により、特定の有益な薬剤投与計画、特定の有用な総用量が可能となり、または望ましくない作用が回避される。一部の実施態様において、治療的半減期増加は、効力増加、修飾された分子のこのターゲットに対する結合の増加もしくは減少、または未修飾分子の別のパラメータもしくは作用メカニズムの増加または減少から生じる。

## 【0114】

核酸またはタンパク質に適用される場合の用語「単離された」は、この核酸またはタンパク質に、この天然の状態でそれに随伴する他の細胞成分が実質的ないことを示す。これは、均質状態であり得る。単離された物質は、乾燥もしくは半乾燥状態であり得るか、溶液（水溶液を含むが、これに限定されない）状態であり得る。純度および均質性は、一般に、分析化学技法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して判定される。調製物中に存在する最も優勢な化学種であるタンパク質が、実質的に精製される。特に、単離された遺伝子は、遺伝子に隣接し、対象となる遺

10

20

30

40

50

伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離されている。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲルにおいて実質的に1つのバンドを生じさせることを示す。特に、この核酸またはタンパク質が、少なくとも85%純粋、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも99%またはそれ以上純粋であることを意味する。

#### 【0115】

用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドまたはリボヌクレオチド、および1本鎖形態もしくは2本鎖形態いずれかでのこれらのポリマーを指す。特に制限がない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、自然発生ヌクレオチドと同様に代謝される天然ヌクレオチドの既知類似体を含有する核酸を包含する。特に他の制限がない限りこの用語は、PNA(ペプチド核酸)、アンチセンス法に使用されるDNAの類似体(ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、など)を含むオリゴヌクレオチド類似体も指す。他の指示がない限り、特定の核酸配列は、これらの保存的修飾変異体(縮重コドン置換を含むが、これらに限定されない)および相補配列ならびに明示される配列も暗黙に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(またはすべての)コドンの第三位が、混合塩基および/またはデオキシリノシン残基で置換されている配列を生じさせることにより達成することができる(Batzerら、Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); およびCassolら (1992); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994))。

#### 【0116】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すためにここでは交換可能に用いられている。すなわち、ポリペプチドに関する記載は、ペプチドの記載およびタンパク質の記載と同様にあてはまり、逆もまた同じである。これらの用語は、自然発生アミノ酸ポリマー、ならびに1つ以上のアミノ酸残基が天然にはコードされないアミノ酸であるアミノ酸ポリマーにあてはまる。ここで用いるこれらの用語は、アミノ酸残基がペプチド共有結合により連結されている完全長タンパク質(すなわち抗原)を含むあらゆる長さのアミノ酸鎖を包含する。

#### 【0117】

用語「アミノ酸」は、自然発生および自然には発生しないアミノ酸、ならびに自然発生アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然にコードされるアミノ酸は、20の共通アミノ酸(アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン)ならびにピロリシンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体は、自然発生アミノ酸と同じ塩基化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基(例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム)に結合している炭素、を有する化合物を指す。こうした類似体は、修飾されたR基(例えば、ノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有するが、自然発生アミノ酸と同じ塩基化学構造を保持する。

#### 【0118】

本明細書では、一般に公知である三文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)によって推奨されている一文字記号、いずれかによりアミノ酸に言及することがある。同様に、一般に認められている一文字コードによりヌクレオチドに言及することがある。

#### 【0119】

「保存的修飾変異体」は、アミノ酸配列と核酸配列の両方にあてはまる。特定の核酸配列に関しての「保存的修飾変異体」は、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸または本質的に同一の配列にアミノ酸配列をコードしない核酸を指す。遺伝子

10

20

30

40

50

コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が、いずれかの所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G および G C U は、すべて、アミノ酸アラニンをコードする。従って、アラニンがコドンにより指定されるすべての位置において、このコドンを、コードされたポリペプチドを変えることなく、記載の対応するコドンのいずれかに変えることができる。こうした核酸の変異形は、「沈黙変異形」であり、これは保存的修飾を受けた変異形の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書における核酸配列のすべてが、この核酸のすべての可能な沈黙変異形も示す。核酸中の各コドン（通常はメチオニンについての唯一のコドンである A U G、および通常はトリプトファンについての唯一のコドンである T G G を除く）が、機能的に同一の分子を生じさせるように修飾できることは、当業者には理解されるであろう。従って、ポリペプチドをコードする核酸の各沈黙変異形は、記載する各配列に必然的に含まれる。

## 【0120】

アミノ酸配列に関するかぎり、このコード配列内の单一のアミノ酸または低率のアミノ酸を変更、付加または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加は、この変更が化学的に類似したアミノ酸でのアミノ酸の置換を結果的に生じさせる場合、「保存的修飾変異体」であることは、当業者には理解されるであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野において周知である。こうした保存的修飾変異体は、本発明の多形変異体、種間相同体および対立遺伝子に加えてのものであり、これらを除外しない。

## 【0121】

次の 8 つのグループは、互いに保存的置換であるアミノ酸を各々含有する：

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

(例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (1993, 12月) 参照)。

## 【0122】

2 つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列に関連して、用語「同一」または「同一性」度は、同じである 2 つまたはそれ以上の配列または部分配列を指す。比較ウインドウを用いて、または以下の配列比較アルゴリズムのうちの 1 つを使用してもしくは手作業でのアラインメントおよび目視検査により測定されるような指定領域を用いて、最大応答について比較し、アラインしたとき、一定の百分率の同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチド（すなわち、特定領域に対する約 60 % 同一性、場合により約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 % または約 95 % 同一性）を有する場合、配列は、「実質的に同一」である。この定義は、被検配列の成分も指す。同一性は、少なくとも 50 のアミノ酸もしくはヌクレオチドの長さの領域にわたって、または 75 から 100 のアミノ酸もしくはヌクレオチドの長さの領域にわたって、または指定がない場合は全配列またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの全域に存在し得る。

## 【0123】

配列比較については、一般に、1 つの配列が参照配列としての役割を果たし、それを被検配列と比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、被検配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、または代替パラメータを指定することができる。次に、この配列比較アルゴリズムにより、ブ

10

20

30

40

50

ログラムパラメータを基に、参照配列を基準にして被検配列についての配列同一性度を計算する。

#### 【0124】

ここで用いる「比較ウインドウ」は、ある配列と連続位置数が同じである参照配列とを、これら2つの配列を最低にアラインした後、比較することができる、20から600、普通は約50から200、より普通には約100から150から成る群より選択される連続位置数のうちのいずれか1つの位置数のセグメントについての参照を含む。比較のための配列のアラインメント方法は、当該技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482cの局所的相同性アルゴリズムにより、Needlma 10 n and Wunsh (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アライメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性探索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実現 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA) により、または手作業でのアラインメントおよび目視検査 (例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) 参照) により、行うことができる。 20

#### 【0125】

配列同一性度および配列類似性度の判定に適するアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、Altschulら (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389 - 3402、およびAltschulら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410にそれぞれ記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (the National Center for Biotechnology Information) を通じて公的に入手することができる。BLASTアルゴリズムのパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTINプログラム (核酸配列用) は、デフォルトとして11の語長 (W)、10の期待値 (E)、M = 5、N = -4 および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列についてのBLASTPプログラムは、デフォルトとして3の語長、10の期待値 (E)、および50のBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) アライメント (B)、10の期待値 (E)、M = 5、N = -4 および両鎖の比較を用いる。BLASTアルゴリズムは、一般に、「低複雑性」フィルタを切って行われる。 30

#### 【0126】

BLASTアルゴリズムにより、二配列間の類似性の統計学的分析も行う (Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5787)。BLASTアルゴリズムにより提供されるもう一つの類似性測定は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間のマッチが偶然に起こる確率の指標を提供する最少合計確立 (P(N)) である。例えば、核酸は、被検核酸と参照核酸の比較における最少合計確立が約0.2より小さい、さらに好ましくは約0.01より小さい、最も好ましくは約0.001より小さい場合、参照配列に類似していると見なされる。 40

#### 【0127】

フレーズ「～に選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」は、この配列が複合混合物（全細胞またはライプラリDNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない）中に存在するときのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で特定のヌクレオチド配列のみへの分子の結合、二重化またはハイブリダイゼーションを指す。 50

## 【0128】

フレーズ「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」は、当該技術分野において公知であるような低イオン強度および高温の条件を指す。一般に、ストリンジエントな条件下では、プローブは、核酸の複合混合物（全細胞またはライプラリDNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない）中のこのターゲット部分配列にハイブリダイズするであろうが、この複合混合物中の他の配列にはハイブリダイズしない。ストリンジエントな条件は、配列依存性であり、様々な環境で、異なるであろう。長い配列ほど、高温で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションへの広範な指針が、*Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, 「ハイブリダイゼーションの原理の総説および核酸アッセイの戦略 (Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays)」(1993)*において見出せる。一般に、ストリンジエントな条件は、被定義イオン強度pHでの指定配列についての熱融解点( $T_m$ )より約5から10低くなるように選択される。 $T_m$ は、ターゲットに対して相補的なプローブの50%が平衡時にこのターゲット配列にハイブリダイズする（被定義イオン強度、pHおよび核酸濃度のもとでの）温度である（ターゲット配列が過剰に存在する場合、 $T_m$ では平衡時にプローブの50%が占有される）。ストリンジエントな条件は、pH 7.0から8.3で、ならびに短いプローブ（10から50のヌクレオチドを含むが、これに限定されない）については少なくとも約30の温度および長いプローブ（50より多いヌクレオチドを含むが、これに限定されない）については少なくとも約60で、塩濃度が、約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01から1.0Mのナトリウムイオン濃度（または他の塩）である条件であり得る。ストリンジエントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加で達成することもできる。選択的または特異的ハイブリダイゼーションのために、正のシグナルは、バックグラウンドの少なくとも2倍、場合によってはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍であり得る。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の具体例は、次のとおりであり得る：50%ホルムアミド、5X SCC、および1% SDS、42でのインキュベーション、または5X SCC、1% SDS、65でのインキュベーション、と0.2X SCCおよび0.1% SDS中、65での洗浄。こうした洗浄は、5、15、30、60、120またはそれ以上の分数にわたって行うことができる。

## 【0129】

本明細書で用いる用語「真核生物」は、系統発生的ドメイン真核生物（Eucarya）に属する生物、例えば、動物（哺乳類、昆虫、爬虫類、鳥類を含むが、これらに限定されない）、纖毛虫、植物（单子葉植物、双子葉植物、藻類などを含むが、これらに限定されない）、真菌、酵母、鞭毛虫、微胞子虫類、原生生物を指す。

## 【0130】

ここで用いる用語「非真核生物」は、真核生物でない生物を指す。例えば、真核生物でない生物は、Eubacteria（大腸菌、サーモス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）、バシラス・ステアロサーモフィラス（*Bacillus stearothermophilus*）、シュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、シュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）などを含むが、これらに限定されない）系統発生的ドメイン、またはArchaea（メタノコッカス・ヤナシイ（*Methanococcus jannaschii*））、メタロバクテリウム・サーモオートトロフィカム（*Methanobacterium thermoautotrophicum*）、ハロバクテリウム属（*Halobacterium*）、例えはハロフェラックス・ボラカニイ（*Haloferax volcanii*）およびハロバクテリウム属種NRC-I、好熱性硫黄細菌（*Archaeoglobus fulgidus*）、パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus*

10

20

30

40

50

*furiōsus*)、パイロコッカス・ホリコシ (*Pyrococcus horikoshii*)、エアロパイラム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*)などを含むが、これらに限定されない) 系統発生的ドメインに属すことができる。

#### 【0131】

ここで用いる用語「被験者」は、治療、観察、実験の対象である動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを指す。

#### 【0132】

ここで用いる用語「有効量」は、治療する疾病、状態または疾患の症状の1つ以上をある程度緩和するであろう、投与する(修飾された)天然でないアミノ酸ポリペプチドの量を指す。ここで説明する(修飾された)天然でないアミノ酸ポリペプチドを含有する組成物は、予防的処置、治療強化、および/または治療的処置のために投与することができる。  
10

#### 【0133】

用語「強化する」または「強化」は、効能または持続時間、いずれかの点で所望の効果を増加または延長することを意味する。従って、治療薬の効果の強化に関して、この用語「強化」は、系に対する他の治療薬の効果を、効能または持続時間、いずれかの点で増加または延長することができることを指す。ここで用いる「強化有効量」は、所望の系における別の治療薬の効果を強化するために妥当な量を指す。患者において使用する場合、この使用についての有効量は、この疾病、疾患または状態の重症度および経過、以前の治療法、この患者の健康状態および薬物への応答、ならびに治療する医師の判断に依存するであろう。  
20

#### 【0134】

ここで用いる用語「修飾された」は、ポリペプチドに対する後翻訳修飾が存在することを指す。「(修飾された)」形の用語は、論じているポリペプチドが、場合によっては修飾されている、すなわち、論じているポリペプチドが、修飾されていてもよいし、未修飾であってもよいことを意味する。

#### 【0135】

用語「後翻訳修飾された」および「修飾された」は、アミノ酸がポリペプチド鎖に組み込まれた後、こうしたアミノ酸に対して行われる天然または天然でないアミノ酸のあらゆる修飾を指す。この用語は、単なる例として、ただ共翻訳インビボ修飾、後翻訳インビボ修飾および後翻訳インビトロ修飾を包含する。  
30

#### 【0136】

予防的用途において、前記(修飾された)天然でないアミノ酸ポリペプチドを含有する組成物は、特定の疾病、疾患または状態に罹患しやすいか、特定の疾病、疾患または状態のリスクを別様に有する患者に投与される。こうした量は、「予防有効量」と定義する。この使用における正確な量も、患者の健康状態、体重などに依存する。常用の実験(例えば、用量漸増臨床試験)によりこうした予防有効量を決定することは、十分に当業者の範囲内であると考えられる。

#### 【0137】

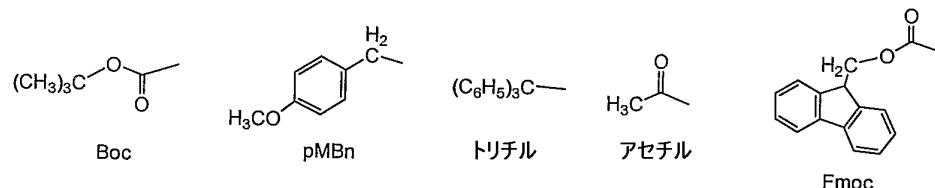
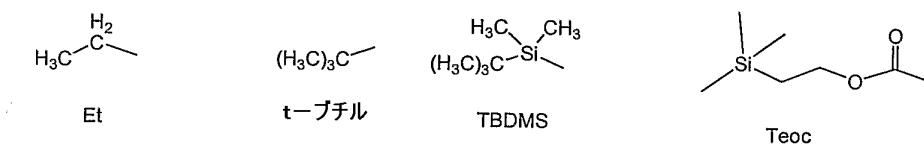
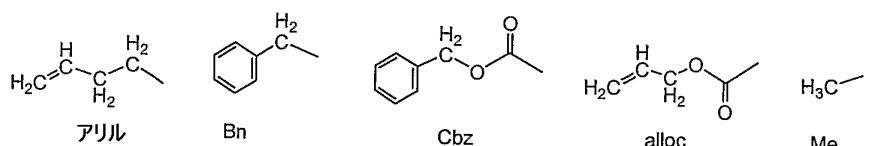
用語「保護された」は、「保護基」、または一定の反応条件下で化学反応性官能基の反応を防止する部分の存在を指す。保護基は、保護される化学反応基のタイプに依存して変わるであろう。例えば、この化学反応基が、アミンまたはヒドラジンである場合、反応基は、*t*-ブチルオキシカルボニル(*t*-Boc)および9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)から成る群より選択することができる。この化学反応基が、チオールである場合、保護基は、オルトピリジルジスルフィドである。この化学反応性基が、ブタン酸またはプロピオン酸などのカルボン酸、またはヒドロキシル基である場合、保護基は、ベンジルまたはアルキル基、例えばメチル、エチルもしくは*t*-ブチルであり得る。当該技術分野において公知である他の保護基も、ここに記載する方法および組成物において、またはここに記載する方法および組成物とともに使用することができる。  
40

#### 【0138】

単なる例として、プロッキング / 保護基は、

【0139】

【化7】



から選択することができる。

【0140】

他の保護基は、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999（これは、この全文、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。

【0141】

治療用途において、前記（修飾された）天然でないアミノ酸ポリペプチドは、疾病、状態または疾患に既に罹患している患者に、この疾病、疾患または状態の症状を治癒するか、少なくとも一部は阻止するために十分な量で投与される。こうした量を「治療有効量」と定義し、これは、この疾病、疾患または状態の重症度および経過、以前の治療法、この患者の健康状態および薬物への応答、ならびに治療する医師の判断に依存するであろう。常用の実験（例えば、用量漸増臨床試験）によりこうした治療有効量を決定することは、十分に当業者の範囲内であると考えられる。

【0142】

用語「治療」は、予防的および／または治療的処置のいずれかを指すために使用する。

【0143】

他に指示がない限り、当該技術分野の技術の範囲内の、質量分析、NMR、HPLC、タンパク質化学、生化学、組換えDNA法および薬理学の通常の方法を利用する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0144】

（詳細な説明）

## I. 序論

少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むhGH分子を本発明において提供する。本発明の一定の実施態様において、少なくとも1つの非天然アミノ酸を有するhGHポリペプチドは、少なくとも1つの後翻訳修飾を含む。一つの実施態様において、前記少なくとも1つの後翻訳修飾は、特定の反応性基に適することが通常の当業者に公知である化学方法論を利用して、第一の反応性基を含む少なくとも1つの非天然アミノ酸に、第二の反応性基を含む分子を取り付けることを含み、前記分子には、ラベル、色素、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、細胞毒性化合物、薬物、親和性ラベル、光親和性ラベル、反応性化合物、樹脂、第二タンパク質もしくはポリペプチドもし

10

20

30

40

50

くはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗原フラグメント、金属キレート化剤、補助因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、抑制リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピニラベル、蛍光体、金属含有部分、放射性部分、新規官能基、他の分子と共有結合性もしくは非共有結合性相互作用をする基、光ケージド部分、光異性体化性部分、ビオチン、ビオチンの誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込む部分、化学分解性の基、光分解性の基、延長された側鎖、炭素に連結した糖、レドックス活性剤、アミノチオ酸、毒性部分、同位元素で標識された部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、高電子密度の基、磁性を有する基、介在基、発色団、エネルギー変換因子、生物活性因子、検出可能ラベル、小分子、または上記のあらゆる組合せ、または他のいずれかの望ましい化合物もしくは物質が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、前記第一反応性基は、アルキニル部分（非天然アミノ酸p-プロパルギルオキシアラニン（この場合のプロパルギル基は、時としてアセチレン部分とも呼ばれる）を含むが、これに限定されない）であり、前記第二反応性基は、アジド部分であり、および[3+2]付加環化化学方法論を利用する。もう一つの例において、前記第一反応性基は、アジド部分（非天然アミノ酸p-アジド-L-フェニルアラニンを含むが、これに限定されない）であり、第二反応性基は、アルキニル部分である。本発明の修飾されたG Hポリペプチドの一定の実施態様では、少なくとも1つの後翻訳修飾を含む少なくとも1つの非天然アミノ酸（ケト官能基を含有する非天然アミノ酸を含むが、これに限定されない）を使用し、この場合の少なくとも1つの後翻訳修飾は、糖部分を含む。一定の実施態様において、前記後翻訳修飾は、真核細胞または非真核細胞においてインビボで行う。  
。

#### 【0145】

一定の実施態様において、前記タンパク質は、1つの宿主細胞によりインビボで行われる少なくとも1つの後翻訳修飾を含み、この場合の後翻訳修飾は、別の宿主細胞タイプによっては正常に行われない。一定の実施態様において、前記タンパク質は、真核細胞によってインビボで行われる少なくとも1つの後翻訳修飾を含み、この場合の後翻訳修飾は、非真核細胞によっては正常に行われない。後翻訳修飾の例には、アセチル化、アクリル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミテート付加、リン酸化、糖脂質リンケージ修飾などが挙げられるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、前記後翻訳修飾は、GlcNAc-アスパラギンリンケージによるアスパラギンへのオリゴ糖の取り付けを含む（前記オリゴ糖が、(GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAcを含む場合などを含むが、これらに限定されない）。もう一つの実施態様において、前記後翻訳修飾は、GalNAc-セリン、GalNAc-トレオニン、GlcNAc-セリン、またはGlcNAc-トレオニンリンケージによるセリンまたはトレオニンへのオリゴ糖（Gal-GalNAc、Gal-GlcNAcなど）を含むが、これらに限定されない）の取り付けを含む。一定の実施態様において、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、分泌もしくは局在配列、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジンタグおよび/またはGST融合などを含むことができる。

#### 【0146】

対象となるタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、もしくは少なくとも10またはそれ以上の非天然アミノ酸を含有することができる。前記非天然アミノ酸は、同じであってもよいし、異なっていてもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の異なる部位が存在し得る。一定の実施態様では、タンパク質の自然発生バージョンの中に存在する特定のアミノ酸の少なくとも1つ（しかし、すべてよりは少数）を非天然アミノ酸で置換する。

#### 【0147】

本発明は、少なくとも1つの天然にはコードされないアミノ酸を含むG H超遺伝子ファ  
。

ミリー、特に h G H のメンバーに基づく方法および組成物を提供する。G H 超遺伝子ファミリーメンバーへの少なくとも 1 つの天然にはコードされないアミノ酸の導入により、1 つ以上の天然にはコードされないアミノ酸とは反応するが、共通して発生する 20 のアミノ酸とは反応しない（これを含むが、これらに限定されない）特異的化学反応を含むコンジュゲーション化学の適用を可能ならしめることができる。一部の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸を含む G H 超遺伝子ファミリーメンバーを、この天然にはコードされないアミノ酸の側鎖により水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）に連結させる。本発明は、PEG 誘導体でタンパク質を選択的に修飾するための非常に効率的な方法を提供し、この方法は、20 の自然に組み込まれるアミノ酸においては見出せない官能基または置換基（ケトン、アジドまたはアセチレン部分を含むが、これらに限定されない）を含有するものをはじめとする（しかし、これらに限定されない）遺伝的にはコードされないアミノ酸の、セレクターコドンに応答するタンパク質への選択的組み込み、および続く安定した反応性のPEG 誘導体での修飾を含む。組み込んだら、これらのアミノ酸側鎖は、この天然にコードされるアミノ酸中に存在する特定の官能基または置換基に適することが通常の当業者に公知である化学方法論を利用することにより、修飾することができる。多種多様な公知化学方法論が、タンパク質に水溶性ポリマーを組み込むための本発明での使用に適する。こうした方法論としては、アセチレンまたはアジド誘導体（を含むが、これらに限定されない）それぞれでの Huisgen [3+2] 付加環化反応（例えば、Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069 - 1109；および Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1 - 176 参照）が挙げられるが、これに限定されない。

#### 【0148】

Huisgen [3+2] 付加環化法は、求核置換反応ではなく付加環化を伴うため、タンパク質を極めて高い選択性で修飾することができる。この反応は、反応混合物への触媒量の Cu (I) の添加により、室温で、水性条件で、卓越した位置選択性 (1, 4 > 1, 5) で行うことができる。例えば、Tornoe ら、(2002) Org. Chem. 67: 3057 - 3064；および Rostovtsev ら、(2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596 - 2599；および国際公開第 03/101972 号参照。[3+2] 付加環化により本発明のタンパク質に付加することができる分子としては、アジドまたはアセチレン誘導体をはじめとする（しかし、これらに限定されない）適する官能基または置換基を有する実質的にあらゆる分子が挙げられる。これらの分子を、アセチレン基 (p-プロパルギルオキシフェニルアラニンを含むが、これに限定されない) またはアジド基 (p-アジド-フェニルアラニンを含むが、これに限定されない) をそれぞれ有する非天然アミノ酸に、付加することができる。

#### 【0149】

Huisgen [3+2] 付加環化により生じる 5 員環は、一般に、還元環境下で可逆的ではなく、水性環境下では長期間にわたって加水分解に対して安定である。従って、多種多様な物質の物理的および化学的特性を、要求水準が高い水性条件下で、本発明の反応性 PEG 誘導体で修飾することができる。さらにもっと重要なこととして、アジドおよびアセチレン部分が互いに特異的である（および例えば、20 の共通の遺伝的にコードされたアミノ酸とは反応しない）ため、タンパク質を極めて高い選択性で 1 つ以上の特定部位において修飾することができる。

#### 【0150】

本発明は、1 つ以上のアセチレンまたはアジド部分を有する PEG 誘導体および関連親水性ポリマーの水溶性および加水分解安定性誘導体も提供する。アセチレン部分を含有する PEG ポリマーは、セレクターコドンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアジド部分とのカップリングに非常に選択性である。同様に、アジド部分を含有する PEG 誘

導体は、セレクターコドンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアセチレン部分とのカップリングに非常に選択的である。

#### 【0151】

さらに具体的には、前記アジド部分は、アルキルアジド、アリールアジドおよびこれらのアジドの誘導体を含むが、これらに限定されない。前記アルキルおよびアリールアジドの誘導体は、このアセチレン特異的反応性が維持されるならば、他の置換基を含むことができる。前記アセチレン部分は、アルキルおよびアリールアセチレンならびに各々の誘導体を含む。前記アルキルおよびアリールアセチレンの誘導体は、このアジド特異的反応性が維持されるならば、他の置換基を含むことができる。

#### 【0152】

本発明は、様々な官能基、置換基または部分を有する物質と他の物質とのコンジュゲートを提供し、前記他の物質としては、ラベル；色素；ポリマー；水溶性ポリマー；ポリエチレングリコールの誘導体；光架橋剤；細胞毒性化合物；薬物；親和性ラベル；光親和性ラベル；反応性化合物；樹脂；第二のタンパク質またはポリペプチドまたはポリペプチド類似体；抗体もしくは抗原フラグメント；金属キレート化剤；補助因子；脂肪酸；炭水化物；ポリヌクレオチド；DNA；RNA；アンチセンスポリヌクレオチド；抑制リボ核酸；生体材料；ナノ粒子；スピルラベル；蛍光体；金属含有部分；放射性部分；新規官能基；他の分子と共有結合性もしくは非共有結合性相互作用をする基；光ケージド部分；光異性体化性部分；ビオチン；ビオチンの誘導体；ビオチン類似体；重原子を組み込む部分；化学的に切断可能な基；光切断可能な基；延長された側鎖；炭素に連結した糖；レドックス活性剤；アミノチオ酸；毒性部分；同位元素で標識された部分；生物物理学的プローブ；リン光基；化学発光基；高電子密度の基；磁性を有する基；介在基；発色団；エネルギー変換因子；生物活性因子；検出可能ラベル；小分子；または上記のあらゆる組合せ、または他のいづれかの望ましい化合物もしくは物質が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は、アジドまたはアセチレン部分を有する物質と対応するアセチレンまたはアジド部分を有するPEGポリマー誘導体とのコンジュゲートも含む。例えば、アジド部分を含有するPEGポリマーは、アセチレン官能基を有する遺伝的にコードされないアミノ酸を含有するタンパク質中の一定の位置の生物活性分子にカップリングさせることができる。前記PEG分子と前記生物活性分子をカップリングするリンクエージとしては、Huisingen [3+2]付加環化生成物が挙げられるが、これに限定されない。

#### 【0153】

PEGを使用して生体材料の表面を修飾することは、当該技術分野において十分に確立されている（例えば、米国特許第6,610,281号；Mehvar, R., J. Pharmaceut. Sci., 3(1) : 125 - 136 (2000) 参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている））。本発明は、1つ以上の反応性アジドまたはアセチレン部位を有する表面およびHuisingen [3+2]付加環化リンクエージによりこの表面にカップリングされた本発明の1つ以上のアジドまたはアセチレン含有ポリマーを含む生体材料も含む。生体材料および他の物質を、アジドまたはアセチレンリンクエージ以外のリンクエージにより、例えば、カルボン酸、アミン、アルコールまたはチオール部分を含むリンクエージにより、アジドまたはアセチレン活性化ポリマー誘導体にカップリングさせて、後続の反応に利用できるアジドまたはアセチレン部分を残すこともできる。

#### 【0154】

本発明は、本発明のアジドおよびアセチレン含有ポリマーを合成する方法も含む。アジド含有PEG誘導体の場合、アジドは、前記ポリマーの炭素原子に直接結合させることができる。また、アジド含有PEG誘導体は、結果として生じるポリマーがこの末端にアジド部分を有するように、一方の末端にアジド部分を有する結合因子を従来の活性化ポリマーに取り付けることによって調製することができる。アセチレン含有PEG誘導体の場合、アセチレンを前記ポリマーの炭素原子に直接結合させることができる。また、アセチレン含有PEG誘導体は、結果として生じるポリマーがこの末端にアセチレン部分を有する

10

20

30

40

50

ように、一方の末端にアセチレン部分を有する結合因子を従来の活性化ポリマーに取り付けることによって調製することができる。

#### 【0155】

さらに具体的には、アジド含有PEG誘導体の場合、少なくとも1つの活性ヒドロキシル部分を有する水溶性ポリマーを、より反応性が高い部分（例えば、メシレート、トレシレート、トシレートまたはハロゲン脱離基）を有する置換ポリマーを生成させる反応に付す。スルホニル酸ハロゲン化物、ハロゲン原子および他の脱離基を含有するPEG誘導体の調製および使用は、当業者に周知である。結果として生じたポリマーは、次いで、このポリマーの末端のより反応性が高い部分をアジド部分で置換する反応に付す。また、少なくとも1つの活性求核または求電子部分を有する水溶性ポリマーを、一方の末端にアジドを有するカップリング剤との反応に付して、PEGポリマーとカップリング剤の間に共有結合を形成し、アジド部分をこのポリマーの末端に配置する。アミン、チオール、ヒドラジド、ヒドラジン、アルコール、カルボキシレート、アルデヒド、ケトンおよびチオエステルなどをはじめとする求核および求電子部分は、当業者に周知である。10

#### 【0156】

さらに具体的には、アセチレン含有PEG誘導体の場合、少なくとも1つのヒドロキシル部分を有する水溶性ポリマーを、アセチレン部分を含有する前駆体から水素または他の活性化脱離基を外す反応に付す。また、少なくとも1つの求核または求電子部分を有する水溶性ポリマーを、一方の末端にアセチレンを有するカップリング剤との反応に付して、PEGポリマーとカップリング剤の間に共有結合を形成し、アセチレン部分をこのポリマーの末端に配置する。有機合成に関連したハロゲン部分、活性化脱離基、求核および求電子部分の使用、ならびにPEG誘導体の調製および使用は、当業者には十分に定着している。20

#### 【0157】

本発明は、水溶性ポリマー、例えば、PEGおよびアジドまたはアセチル部分を含有するPEG誘導体をはじめとする（しかし、これらに限定されない）、修飾するタンパク質に他の物質を附加させるタンパク質の選択的修飾方法も提供する。前記アジドおよびアセチレン含有PEG誘導体を使用して、表面および分子の特性を修飾することができる（この場合、生体適合性、安定性、溶解度、および免疫原性の欠如が重要である）一方で、同時に、当該技術分野において以前から公知であるものより選択的な、PEG誘導体のタンパク質への取り付け手段を提供することができる。30

#### 【0158】

##### I I . 成長ホルモン超遺伝子ファミリー

成長ホルモン（GH）超遺伝子ファミリーの遺伝子によりコードされるタンパク質（Bazan, F., Immunology Today 11: 350 - 354 (1991) ; Bazan, J. F. Science 257: 410 - 411 (1992) ; Mott, H. R. and Campbell, I. D., Current Opinion in Structural Biology 5: 114 - 121 (1995) ; Silvennoinen, O. and Ihle, J. N., SIGNALLING BY THE HEMATOPOIETIC CYTOKINE RECEPTORS (1996) ）としては、次のタンパク質が挙げられる：成長ホルモン、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、エリスロポイエチン（EPO）、トロンボポエチン（TPO）、インターロイキン-2（IL-2）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35サブユニット）、IL-13、IL-15、オンコスタチンM、毛様体神経栄養因子（CNTF）、白血病抑制因子（LIF）、アルファインターフェロン、ベータインターフェロン、イプシロンインターフェロン、ガンマインターフェロン、オメガインターフェロン、タウインターフェロン、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）およびカルジオトロフィン-1（CT-1）（「GH超遺伝子ファミリー」）。この遺伝子ファミリーの追加のメンバー4050

が、将来、遺伝子クローニングおよび塩基配列決定により同定されることが予想される。G H超遺伝子ファミリーのメンバーは、限られたアミノ酸またはDNA配列同一性を一般に有するという事実にもかかわらず、類似した二次および三次構造を有する。これらの共有される構造的特徴により、この遺伝子ファミリーの新たなメンバーを容易に同定することができ、本明細書に記載する天然でないアミノ酸の方法および組成物に同様に適用することができる。G H超遺伝子ファミリーのメンバー間の構造的相同性の程度を想定して、天然にはコードされないアミノ酸を、本発明を使用してG H超遺伝子ファミリーのいずれかのメンバーに組み込むことができる。タンパク質のこのファミリーの各メンバーは、4ヘリックスバンドルを含み、この一般構造は、図1に示す。ファミリーメンバーh G H、E P O、I F N - 2、およびG - C S F の一般構造は、図2、3、4および5にそれぞれ示す。

## 【0159】

G - C S F (Zinkら、F E B S Lett. 314 : 435 (1992) ; Zinkら、Biochemistry 33 : 8453 (1994) ; Hillら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5167 (1993))、GM - C S F (Diederichs, K.ら、Science 154 : 1779 - 1782 (1991) ; Walterら、J. Mol. Biol. 224 : 1075 - 1085 (1992))、IL - 2 (Bazan, J. F. Science 257 : 410 - 411 (1992) ; McKay, D. B. Science 257 : 412 (1992))、IL - 4 (Redfieldら、Biochemistry 30 : 11029 - 11035 (1991) ; Powersら、Science 256 : 1673 - 1677 (1992))、およびIL - 5 (Milburnら、Nature 363 : 172 - 176 (1993))をはじめとするサイトカインのメンバーの構造は、X線回折およびNMR検査により決定されており、有意な一次配列相同性を欠くにもかかわらず、G H構造での顕著な保存を示す。IFNは、モデリングおよび他の研究 (Leeら、J. Growth hormone Cytokine Res. 15 : 341 (1995) ; Murgoloら、Proteins 17 : 62 (1993) ; Radhakrishnanら、Structure 4 : 1453 (1996) ; Klausら、J. Mol. Biol. 274 : 661 (1997))を基に、このファミリーのメンバーであると考えられている。EPOは、モデリングおよび突然変異誘発研究 (Boisseelら、J. Biol. Chem. 268 : 15983 - 15993 (1993) ; Wenら、J. Biol. Chem. 269 : 22839 - 22846 (1994))を基に、このファミリーのメンバーであると考えられている。上記サイトカインおよび成長因子のすべてが、1つの大きな遺伝子ファミリーを構成すると、現在、考えられている。

## 【0160】

類似した二次および三次構造を共有することに加えて、このファミリーのメンバーは、細胞内シグナル伝達経路を活性化するために細胞表面受容体をオリゴマー化しなければならないという特性を共有する。G HおよびEPOをはじめとする（しかし、これらに限定されない）一部のG Hファミリーメンバーは、1つのタイプの受容体にしか結合せず、この受容体にホモ二量体を形成させる。IL - 2、IL - 4およびIL - 6をはじめとする（しかし、これらに限定されない）他のファミリーメンバーは、1つより多くのタイプの受容体に結合し、これらの受容体にヘテロ二量体またはより高次の凝集体を形成させる (Davisら、(1993), Science 260 : 1805 - 1808; Paonessaら、(1995), EMBO J. 14 : 1942 - 1951; Mott and Campbell, Current Opinion in Structural Biology 5 : 114 - 121 (1995))。突然変異誘発の研究により、G Hと同様、これらの他のサイトカインおよび成長因子は、複数の、典型的には2つの受容体結合部位を有し、これらの同源受容体に逐次的に結合することが証明された (Mott and Campbell, Current Opinion in Structural Biology 5 : 114 - 121 (1995); Matthewsら、(1995))。

996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9471 - 9476)。G Hと同様、これらの他のファミリーメンバーについての一次受容体結合部位は、4つのアルファヘリックスおよびA - Bループ内に主として発生する。受容体結合に参加するこれらのヘリックスバンドル内の特異的アミノ酸は、ファミリーメンバー間で異なる。G H超遺伝子ファミリーのメンバーと相互作用する大部分の細胞表面受容体が、構造的に関連しており、第二の大きな多遺伝子ファミリーを構成する。例えば、米国特許第6,608,183号参照(これは、本明細書に参照により組み込まれている)。

#### 【0161】

G H超遺伝子ファミリーの様々なメンバーの突然変異の研究から、アルファヘリックスを接続するループは一般には受容体結合に関与しない傾向があるという一般的な結論に達した。特に、短いB - Cループは、すべてでないにせよ大部分のファミリーメンバーにおいて、受容体結合に必須ではないようである。このため、B - Cループは、G H超遺伝子ファミリーのメンバーの中の本明細書に記載するような天然にはコードされないアミノ酸で、置換することができる。A - Bループ、C - Dループ(およびインターフェロンのD - Eループ/G H超遺伝子ファミリーのIL - 10様メンバー)も、自然には発生しないアミノ酸で置換することができる。ヘリックスAに隣接し、最終ヘリックスに対して遠位のアミノ酸も、受容体結合に関与しない傾向があり、自然には発生しないアミノ酸を導入するための部位であり得る。一部の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸は、A - B、B - C、C - DまたはD - Eループの最初の1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上のアミノ酸をはじめとする(しかし、これらに限定されない)ループ内のいずれかの位置で、置換されている。一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸が、A - B、B - C、C - DまたはD - Eループの最後の1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上のアミノ酸の中で置換される。

#### 【0162】

EPO、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 6、G - CSF、GM - CSF、TPO、IL - 10、IL - 12 p 35、IL - 13、IL - 15およびベータインターフェロンをはじめとする(しかし、これらに限定されない)G Hファミリーの一一定のメンバーは、N連結および/またはO連結型の糖を含有する。これらのタンパク質中のグリコシル化部位は、ほぼ排他的にループ領域で発生し、アルファヘリックスバンドルでは発生しない。これらのループ領域は、一般には受容体結合に関与しないため、および糖基を共有結合で取り付けるための部位であるため、自然には発生しないアミノ酸を前記タンパク質に導入するための有用な部位であり得る。前記タンパク質におけるNおよびO連結型グリコシル化部位を含むアミノ酸は、表面が露出されるため、自然には発生しないアミノ酸の置換のための部位であり得る。従って、天然タンパク質は、これらの部位でこれらのタンパク質に取り付けられる嵩高い糖基を許容することができ、またグリコシル化部位は、受容体結合部位から離れて位置する傾向がある。

#### 【0163】

G H超遺伝子ファミリーの追加メンバーが将来発見される可能性は高い。G H超遺伝子ファミリーの新メンバーは、予測されるタンパク質配列のコンピュータ支援二次および三次構造解析により同定することができる。G H超遺伝子ファミリーのメンバーは、非ヘリックスアミノ酸(ループ領域)によりつなぎ合わされた4つまたは5つの両親媒性ヘリックスを一般に有する。これらのタンパク質は、細胞からの分泌を促進するために、N末端に疎水性シグナル配列を含有し得る。G H超遺伝子ファミリーのこうした後日発見されたメンバーも、本発明に包含される。

#### 【0164】

従って、この成長ホルモン超遺伝子ファミリーの説明は、例証を目的として、および単なる例として提供するものであり、本明細書に記載の方法、組成物、戦略および技法の範囲に対する限定として提供するものではない。さらに、本出願におけるG Hポリペプチドへの言及は、G H超遺伝子ファミリーのいずれかのメンバーの一例としてこの総称を使用していると解釈する。従って、h G Hポリペプチドまたはタンパク質に関して本明細書で

10

20

30

40

50

説明する修飾および化学作用は、本明細書に特に記載するものを含むG H超遺伝子ファミリーのいずれのメンバーにも等しく適用することができる。

**【0165】**

I I I . 本発明と共に使用するため的一般的な組換え核酸法

本発明の多数の実施態様において、対象となるh G Hポリペプチドをコードする核酸は、単離され、クローニングされ、および多くの場合、組換え法を使用して変更されることとなる。こうした実施態様は、タンパク質発現のために使用され、またはh G Hポリペプチドに由来する変異体、誘導体、発現力セットもしくは他の配列の生成中に使用される（これらの使用を含むが、これらに限定されない）。一部の実施態様において、本発明のポリペプチドをコードする配列は、非相同プロモータに作動可能に連結される。h G Hの単離および宿主細胞におけるG Hの生産は、例えば、米国特許第4,601,980号、同第4,604,359号、同第4,634,677号、同第4,658,021号、同第4,898,830号、同第5,424,199号、同第5,795,745号、同第5,854,026号、同第5,849,535号；同第6,004,931号；同第6,022,711号；同第6,143,523および同第6,608,183号（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。10

**【0166】**

天然にはコードされないアミノ酸を含むh G Hポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号2で示すアミノ酸配列を有するもの（h G H）をはじめとする（しかし、これらに限定されない）親ポリペプチドのアミノ酸配列を基にして合成し、次いで、このヌクレオチド配列を、関連アミノ酸残基（複数を含む）の導入（すなわち、組み込みもしくは置換）または除去（すなわち、欠失もしくは置換）を達成するように変化させることができる。前記ヌクレオチド配列は、従来の方法に従って、部位特異的突然変異誘発により、適便に修飾することができる。また、前記ヌクレオチド配列は、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づきオリゴヌクレオチドを設計するオリゴヌクレオチド合成装置の使用、および好ましくは、組換えポリペプチドが生産されることとなる宿主細胞において好適であるコドンの選択を含む（しかし、これらに限定されない）化学合成によって調製することができる。例えば、P C R、ライゲーションまたはライゲーション連鎖反応により、所望のポリペプチドの部分についての幾つかのオリゴヌクレオチドコーディングを合成し、組立てることができる。例えば、Baranyら、Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991)；米国特許第6,521,427号参照（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）。20

**【0167】**

本発明は、組換え遺伝学の分野における常用の技法を利用する。本発明において使用する一般的な方法を開示している基本テキストとしては、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、eds., 1994)）が挙げられる。30

**【0168】**

分子生物学的技法を記載している一般テキストとしては、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger)；Sambrookら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (「Sambrook」)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology . F. M. Ausubelら、eds., Curr40  
50

ent Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc., (1999まで増刊) (「Ausubel」)) が挙げられる。これらのテキストには、突然変異誘発；ベクターの使用；プロモータ；および非天然アミノ酸、直交性 tRNA、直交性シンセターゼおよびこれらのペアをはじめとするタンパク質を生産するためのセレクターコドンを含む遺伝子の生成(これらを含むが、これに限定されない)に関する多くの他の関連トピックスが、記載されている。

## 【0169】

tRNAのライブラリの作製、シンセターゼのライブラリの作製、セレクターコドンの作製、対象となるタンパク質またはポリペプチドへの非天然アミノ酸をコードするセレクターコドンの挿入をはじめとする(しかし、これらに限定されない)様々な目的のために、様々なタイプの突然変異誘発を本発明では使用する。これらには、部位特異的突然変異誘発、ランダム点突然変異誘発、相同組換え、DNAシャッフリングまたは他の再帰的突然変異誘発法、キメラ構築、ウラシル含有テンプレートを使用する突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、ホスホロチオエート修飾DNA突然変異誘発、ギャップを有する二重鎖DNAなどを使用する突然変異誘発、またはこれらのあらゆる組合せが挙げられるが、これらに限定されない。追加の適切な方法としては、点ミスマッチ修復、修復不全宿主株を使用する突然変異誘発、制限選択および制限精製、欠失突然変異体誘発、全遺伝子合成による突然変異誘発、2本鎖切断修復などが挙げられる。キメラ構築を伴う(これを含むが、これに限定されない)突然変異体誘発も本発明に包含される。1つの実施態様において、突然変異体誘発は、自然発生分子または変更されたもしくは突然変異させた自然発生分子についての公知情報(配列、配列比較、物理的特性または結晶構造などを含むが、これらに限定されない)により導くことができる。

## 【0170】

本明細書において見出されるテキストおよび実施例には、これらの手順が記載されている。追加情報は、以下の出版物およびこれらに引用されている参考文献において見つけられる: Lingら、Approaches to DNA mutagenesis: an overview, Anal Biochem. 254(2): 157-178 (1997); Daleら、Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, Methods Mol Biol. 57: 369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, Ann. Rev. Genet. 19: 423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 229: 1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, Biochem J. 237: 1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. および Lilleley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985); Kunkelら、Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987); Bassら、Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science 242: 240-245 (1988); Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enz 40 50

ymol. 154 : 329 - 350 (1987); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucleic Acids Res. 10 : 6487 - 6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, Methods in Enzymol. 100 : 468 - 500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, Methods in Enzymol. 154 : 329 - 350 (1987); Taylor, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl. Acids Res. 13 : 8749 - 8764 (1985); Taylor, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, Nucl. Acids Res. 13 : 8765 - 8787 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 14 : 9679 - 9698 (1986); Sayers, Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 16 : 791 - 802 (1988); Sayers, Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) Nucl. Acids Res. 16 : 803 - 814; Kramer, The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl. Acids Res. 12 : 9441 - 9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol. 154 : 350 - 367 (1987); Kramer, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16 : 7207 (1988); Fritz, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, Nucl. Acids Res. 16 : 6987 - 6999 (1988); Kramer, Point Mismatch Repair, Cell 38 : 879 - 887 (1984); Carter, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis 10 20 30 40 50

s using M13 vectors, Nucl. Acids Res. 13: 443  
 1-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, Methods in Enzymol. 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Wellsら、Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Nambiarら、Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); SakamarおよびKhorana、Total synthesis and expression of a gene for the α-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Wellsら、Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34: 315-323 (1985); Grundstromら、Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4: 450-455 (1993); Sieberら、Nature Biotechnology, 19: 456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); およびI. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995)。上記方法の多くに関する追加情報は、Methods in Enzymology Volume 154において見つけることができ、これには、様々な突然変異誘発法に伴うトラブルシューティング問題に対する有用な制御も記載されている。

#### 【0171】

本発明は、真核動物宿主細胞、非真核動物宿主細胞、および直交性 tRNA / RSペアによる天然でないアミノ酸のインビオ組み込み用の生物にも関する。宿主細胞を本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含む構築物（例えばクローニングベクターまたは発現ベクターであり得る、本発明のベクターを含むが、これに限定されない）で遺伝子操作（形質転換、形質導入またはトランスフェクトを含むが、これらに限定されない）する。このベクターは、例えば、プラスミド、細菌、ウイルス、裸ポリヌクレオチド、またはコンジュゲートしているポリヌクレオチドの形態であり得る。ベクターは、エレクトロポレーション (Fromら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985))；ウイルスベクターによる感染；小さなビーズもしくは粒子のマトリック内またはこの表面上、いずれかに核酸を有する小さな粒子による高速衝撃貫入 (high velocity ballistic penetration) (Kleinら、Nature 327, 70-73 (1987)) をはじめとする標準

的な方法により細胞および／または微生物に導入する。

【0172】

遺伝子操作する宿主細胞は、例えばスクリーニング段階、プロモータの活性化または形質転換体の選択などの活動に適するように変性された従来の栄養培地で培養することができる。これらの細胞は、場合によってはトランスジェニック生物へと培養することができる。単離および培養についての（例えば、後続の核酸単離についての）ものを含む（しかし、これらに限定されない）他の有用な参考文献として、次のものが挙げられる：Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York 10 およびこの中に引用されている参考文献；Payne ら(1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY；Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York)；およびAtlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL。

【0173】

細胞にターゲット核酸を導入する幾つかの周知である方法を利用することができます、これらはいすれも本発明において使用することができる。これらには、DNAを含有する細菌プロトプラストとの受容細胞の融合、エレクトロポレーション、発射衝撃 (projectile bombardment)、およびウイルスベクターでの感染（下でさらに論じる）などが挙げられる。細菌細胞は、本発明のプラスミド含有DNA構築物の数を増幅させるために使用することができます。細菌を対数期に成長させ、この細菌内のプラスミドを、当該技術分野において公知である様々な方法（例えば、Sambrook 参照）によって単離することができる。加えて、過剰なキットが、細菌からのプラスミドの精製用に市販されている（例えば、Easy Prep（商標）、Flexi Prep（商標）、両方とも Pharmacia Biotech からのもの；Stratagene からの Strataclean（商標）；および Qiagen からの QIAprep（商標）参照）。単離および精製したプラスミドは、次いで、他のプラスミドを生産するようにさらに処理し、これらを使用して細胞をトランスフェクトするか、関連ベクターに組み込んで、生物を感染させる。代表的なベクターは、転写および翻訳ターミネータ、転写および翻訳開始配列、および特定のターゲット核酸の発現の調節に有用なプロモータを含有する。これらのベクターは、少なくとも1つの独立ターミネータ配列を含有する遺伝子発現力セット、真核生物もしくは原核生物または両方においてこのカセットを複製することができる配列（シャトルベクターを含むが、これに限定されない）、および原核系と真核系の両方のための選択マーカーを場合により含む。ベクターは、原核生物、真核生物または好ましくは両方における複製および組み込みに適する。Gilliman & Smith, Gene 8:81 (1979)；Roberts ら、Nature, 328:731 (1987)；Schneider, B. ら、Protein Expr. Purif. 6:435:10 (1995)；Ausubel、Sambrook、Berger (すべて上記) 参照。クローニングに有用な細菌およびバクテリオファージのカタログは、例えば、the ATCC 40 により提供されている（例えば、the ATCC 発行の The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna ら (eds.)）。塩基配列決定およびクローニングのための追加の基本手順ならびに分子生物学の他の側面および基礎理論の考察は、Watson ら (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NYにおいても見つけられる。加えて 50

、本質的にあらゆる核酸（および標準的であろうと、標準的でなかろうと、事実上、あらゆる標識核酸）を、様々な市場の供給業者、例えば、the Midland Certified Reagent Company（テキサス州、ミッドランド；the World Wide Webのmcrc.comで入手可能）、The Great American Gene Company（カリフォルニア州、ラモーナ；the World Wide Webのgenco.comで入手可能）、ExpressGen Inc.（イリノイ州、シカゴ；the World Wide Webのexpressgen.comで入手可能）、Operon Technologies Inc.（カリフォルニア州、アラミダ）およびこの他多数の供給業者のいずれかからカスタムオーダーまたは標準オーダーすることができる。

10

#### 【0174】

##### セレクターコドン

本発明のセレクターコドンは、タンパク質生合成機構の遺伝子コドンの枠組みを発展させた。例えば、セレクターコドンとしては、非反復三塩基コドン；ナンセンスコドン、例えば、アンバーコドン（UAG）もしくはオパールコドン（UGA）をはじめとする（しかし、これらに限定されない）停止コドン、非天然コドン、四塩基またはそれ以上の塩基数のコドン、またはレアコドンが挙げられるが、これらに限定されない。hGHポリペプチドの少なくとも一部をコードする単一のポリヌクレオチドにおいて所望の遺伝子に導入することができるセレクターコドンの数が、広範である（1またはそれ以上、2またはそれ以上、3より多数、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上を含むが、これらに限定されない）ことは、通常の当業者には容易にわかる。

20

#### 【0175】

一つの実施態様において、本方法は、真核細胞においてインビボで非天然アミノ酸を組み込むための停止コドンであるセレクターコドンの使用を含む。例えば、UAGをはじめとする（しかし、これに限定されない）停止コドンを認識するO-tRNAを生産し、所望の非天然アミノ酸でO-RSによりアミノアシル化する。このO-rRNAは、自然発生宿主のアミノアシル-tRNAシンセターゼによっては認識されない。従来の部位特異的突然変異誘発を使用して、TAGをはじめとする（しかし、これに限定されない）停止コドンを、対象となるポリペプチドの対象となる部位に導入することができる。例えば、Sayers, J. R. ら、(1988), 5, 3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res., 791-802 参照。O-RS、O-tRNA、および対象となるポリペプチドをコードする核酸をインビボで併せると、非天然アミノ酸が、UAGコドンに応答して組み込まれて、特定の部位に非天然アミノ酸を含有するポリペプチドを生じさせる。

30

#### 【0176】

インビボでの非天然アミノ酸の組み込みは、真核動物宿主細胞の有意な摂動を伴わずにを行うことができる。例えば、UAGコドンの抑制効率は、O-tRNA（アンバーサブレッサtRNAを含むが、これに限定されない）と真核細胞放出因子（eRFを含むが、これに限定されない）（これは、停止コドンも結合し、リボソームからの成長ペプチドの放出を開始させる）の間の競合に依存するため、この抑制効率は、O-tRNAおよび/またはサブレッサtRNAの発現レベルを増加させること（これを含むが、これに限定されない）によって調節することができる。

40

#### 【0177】

セレクターコドンは、四塩基またはそれ以上の塩基数のコドン、例えば、四塩基、五塩基、六塩基またはそれ以上の塩基数のコドンをはじめとする拡張コドンも含む。四塩基コドンの例としては、AGGA、CUAG、UAGA、CCCCなどが挙げられるが、これらに限定されない。五塩基コドンの例としては、AGGAC、CCCCU、CCCUU、CUAGA、CUACU、UAGGCなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の一つ特徴としては、フレームシフト抑制に基づく拡張コドンの使用が挙げられる。四

50

塩基またはそれ以上の塩基数のコドンにより、1つまたは複数の非天然アミノ酸（これらを含むが、これに限定されない）と同じタンパク質に挿入することができる。例えば、突然変異O-tRNA、アンチコドンループ（例えば、少なくとも8から10ntのアンチコドンループ）をはじめとする（しかし、これらに限定されない）特別なフレームシフトサプレッサtRNA、の存在下では、四塩基またはそれ以上の塩基数のコドンが、単一のアミノ酸として読み取られる。他の実施態様においては、アンチコドンループは、少なくとも四塩基コドン、少なくとも五塩基コドンもしくは少なくとも六塩基コドンまたはそれ以上の塩基数のコドン（しかし、これらに限定されない）を解読することができる。256の可能な四塩基配列が存在するので、四塩基またはそれ以上の塩基数のコドンを使用して、多数の非天然アミノ酸を同じ細胞内でコードすることができる。Andersonら  
、(2002) Exploring the Limits of Codon and  
Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:  
237-244; Magliery, (2001) Expanding the Ge  
netic Code: Selection of Efficient Suppre  
ssors of Four-base Codons and Identifica  
tion of 「Shifty」 Four-base Codons with a  
Library Approach in Escherichia coli, J.  
Mol. Biol. 307: 755-769参照。

## 【0178】

例え、四塩基コドンは、インビトロ生合成法を使用してタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むために使用されている。例え、Maら、(1993) Biochemistry. 32: 7939; およびHohsakaら、(1999) J. Am. Chem. Soc., 121: 34参照。CGGGおよびAGGUは、2つの化学的アシリ化フレームシフトサプレッサtRNAで、2-ナフチルアラニンとリシンのNBD誘導体とをインビトロでストレプタビジンに同時に組み込むために使用された。例え、Hohsakaら、(1999) J. Am. Chem. Soc., 121: 12194参照。インビオ試験において、Mooreらは、NCUAアンチコドンを有するtRNALeu誘導体が、UAGNコドン(Nは、U、A、GまたはCであり得る)を抑制する能力を検査し、クアドループレットUAGAは、UCUAアンチコドンを有するtRNALeuにより13から26%の効率で解読され得るが、0または-1フレーム内ではほとんど解読されないことを発見した。Mooreら、(2000) J. Mol. Biol., 298: 195参照。1つの実施態様において、レアコドンまたはナンセンスコドンに基づく拡張コドンを本発明において使用することができ、それにより、ミスセンス読み過ごしありおよび他の望ましくない部位でのフレームシフト抑制を低減することができる。

## 【0179】

この内在性の系が天然塩基コドンを使用しない（またはめったに使用しない）所定の系については、セレクターコドンが、天然三塩基コドンの1つを含むこともある。例え、これには、天然三塩基コドンを認識するtRNAを欠く系、および/またはこの三塩基コドンがレアコドンである系が挙げられる。

## 【0180】

セレクターコドンは、場合によっては非天然塩基対を含む。これらの非天然塩基対は、既存の遺伝子アルファベットをさらに拡張する。1つ余分な塩基対により、トリプレットコドンの数が64から125に増加する。第三の塩基対の特性としては、安定で選択的な塩基対合、ポリメラーゼによる高い忠実性でのDNAへの効率的酵素的組み込み、および発生期非天然塩基対の合成後の効率的連続プライマー伸張が挙げられる。方法および組成物に適合させることができる非天然塩基対の記載としては、例え、Hiraoら、(2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20: 177-182が挙げられる。他の関連出版物は、下に列挙する。

10

20

30

40

50

## 【0181】

インビボでの使用のために、非天然ヌクレオシドは、膜透過性であり、リン酸化されて対応する三リン酸塩を形成する。加えて、増加される遺伝子情報は、安定であり、細胞性酵素により破壊されない。Bennett他による以前の努力は、標準Watson-Crick塩基対（この最も注目すべき例は、イソ-C：イソ-G塩基対である）におけるもとのとは異なる水素結合パターンを利用するものであった。例えば、Switzerら、(1989) J. Am. Chem. Soc., 111: 8322; およびPiccirilliら、(1990) Nature, 343: 33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4: 602 参照。一般に、これらの塩基は、ある程度、天然塩基とミス対合し、酵素的に複製され得ない。Koolおよび共同研究者は、塩基間の疎水性充填相互作用が、水素結合に取って代わって塩基対を形成させることを実証した。Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4: 602; およびGuckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825 参照。上記要求すべてを満たす非天然塩基対を開発する努力では、Schultz、Romesbergおよび共同研究者が、一連の非天然疎水性塩基を系統的に合成し、研究した。PICS: PI CSセルフペアは、天然塩基対より安定であることが判明し、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウフラグメント(KF)によりDNAに効率的に組み込むことができる。例えば、McMinnら、(1999) J. Am. Chem. Soc., 121: 11586; およびOgawaら、(2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 3274 参照。3MN: 3MNセルフペアは、生体機能に十分な効率および選択性でKFにより合成することができる。例えば、Ogawaら、(2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 8803 参照。しかし、両方の塩基は、さらなる複製のための鎖末端としての機能を果たす。最近、突然変異DNAポリメラーゼは、PICSセルフペアを複製するために使用できることが考案された。加えて、TAEセルフペアを複製することができる。例えば、Taeら、(2001) J. Am. Chem. Soc., 123: 7439 参照。Cu(II)と結合すると安定な対を形成する新規金属塩基対、Dipic: Pyが開発された。Meggersら、(2000) J. Am. Chem. Soc., 122: 10714 参照。拡張コドンおよび非天然コドンは、天然コドンに本質的に直交するため、本発明の方法では、この特性を利用して、これらについての直交性tRNAを作製することができる。

## 【0182】

翻訳バイパス系を使用して、所望のポリペプチドにおける非天然アミノ酸を組み込むこともできる。翻訳バイパス系では、大きな配列が遺伝子に組み込まれるが、タンパク質へは翻訳されない。この配列は、リボソームにこの配列を飛び越させ、この挿入の下流の翻訳を再開させる合図としての役割を果たす構造を含有する。

## 【0183】

一定の実施態様において、本発明の方法および/または組成物における対象となるタンパク質またはポリペプチド（またはこれらの一部）は、核酸によってコードされる。典型的に、この核酸は、少なくとも1つのセレクターコドン、少なくとも2つのセレクターコドン、少なくとも3つのセレクターコドン、少なくとも4つのセレクターコドン、少なくとも5つのセレクターコドン、少なくとも6つのセレクターコドン、少なくとも7つのセレクターコドン、少なくとも8つのセレクターコドン、少なくとも9つのセレクターコドン、10またはそれ以上のセレクターコドンを含む。

## 【0184】

対象となるタンパク質またはポリペプチドについての遺伝子コーディングは、当業者に周知である方法および本明細書に記載の方法を使用して、例えば、非天然アミノ酸の組み込みのための1つ以上のセレクターコドンを含むように突然変異誘発することができる。例えば、対象となるタンパク質についての核酸を、1つ以上のセレクターコドンを含むように突然変異誘発することにより、1つ以上の非天然アミノ酸の組み込みを生じさせる。本発明は、突然変異体、あらゆるタンパク質の変異形（例えば、少なくとも1つの非天然

10

20

30

40

50

アミノ酸でのものを含む)を含む、こうしたあらゆる変異体を包含する。同様に、本発明は、対応する核酸、すなわち1つ以上のアミノ酸をコードする1つ以上のセレクターコドンを有するあらゆる核酸、も包含する。

**【0185】**

hGHポリペプチドなどの対象となるタンパク質をコードする核酸分子は、ポリペプチドのいずれかの所望位置においてシステインを導入するように容易に突然変異させることができる。システインは、反応性分子、水溶性ポリマー、タンパク質または多種多様な他の分子を対象となるタンパク質に導入するために幅広く使用されている。hGHポリペプチドの所望位置へのシステインの組み込みに適する方法は、米国特許第6,608,183号(これは、本明細書に参照により組み込まれている)に記載されているものおよび標準的突然変異誘発法など、当該技術分野において周知である。10

**【0186】**

I V . 天然にはコードされないアミノ酸

多種多様な天然にはコードされないアミノ酸が、本発明での使用に適する。あらゆる数の天然にはコードされないアミノ酸をhGHポリペプチドに導入することができる。一般に、導入される天然にはコードされないアミノ酸は、実質的には20の共通の遺伝的コードされるアミノ酸(すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン)に化学的に挿入される。一部の実施態様において、前記天然にはコードされないアミノ酸は、20の共通アミノ酸では見出せない官能基と効率的および選択的に反応して安定なコンジュゲートを形成する側鎖官能基(アジド、ケトン、アルデヒドおよびアミノオキシ基を含むが、これらに限定されない)を含む。例えば、アジド官能基を含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドを、ポリ(エチレンギリコール)をはじめとする(しかし、これに限定されない)ポリマー、または代替として、アルキン部分を含有する第二のポリペプチドと反応させて、安定なコンジュゲートを形成することができ、これにより、結果として、このアジド官能基およびアルキン官能基の選択的反応のため、Husgen[3+2]付加環化生成物が形成される。20

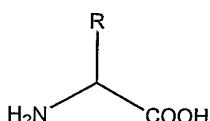
**【0187】**

アルファ-アミノ酸の一般構造は、次のように示される(式I):30

**【0188】**

**【化8】**

I



**【0189】**

天然にはコードされないアミノ酸は、典型的に、上に記載した式(式中、R基は、20の天然アミノ酸において用いられているもの以外のいずれかの置換基である)を有するあらゆる構造であり、ならびに本発明での使用に適切であり得る。本発明の天然にはコードされないアミノ酸は、側鎖の構造だけが天然アミノ酸と異なるため、これらの天然にはコードされないアミノ酸は、自然発生ポリペプチドにおいて形成されるのと同じように、他のアミノ酸(天然アミノ酸または天然にはコードされないアミノ酸を含むが、これらに限定されない)とアミド結合を形成する。しかし、これらの天然にはコードされないアミノ酸は、これらを天然アミノ酸と区別する側鎖基を有する。例えば、Rは、アルキル-、アリール-、アシリル-、ケト-、アジド-、ヒドロキシリル-、ヒドラジン、シアノ-、ハロ-、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、セレノ-、スルホニル40

-、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミンもしくはアミノ基、またはこれらがあらゆる組合せを含む。本発明での使用に適する、対象となる天然にはコードされないアミノ酸としては、光活性化性架橋剤を含むアミノ酸；スピノ標識アミノ酸；蛍光性アミノ酸；金属結合性アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；新規官能基を有するアミノ酸；他の分子と共有結合性または非共有結合性相互作用をするアミノ酸；光ケージドおよび／または光異性体化性アミノ酸；ビオチンまたはビオチン類似体を含むアミノ酸；グリコシル化アミノ酸、例えば糖置換セリン；他の炭水化物変性アミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコールまたはポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学分解性および／または光分解性アミノ酸；天然アミノ酸と比較して延長された側鎖（約5より多いまたは約10より多い炭素数のものを含むが、これらに限定されない）を有するアミノ酸；炭素架橋型糖含有アミノ酸；レドックス活性アミノ酸；アミノチオ酸含有アミノ酸；ならびに1つ以上の毒性部分を含むアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0190】

本発明での使用に適切であり得る、および水溶性ポリマーとの反応に有用である、天然にはコードされないアミノ酸の具体例としては、カルボニル、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、セミカルバジド、アジドおよびアルキン反応性基を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸は、糖部分を含む。こうしたアミノ酸の例としては、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-ガラクトースアミニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-トレオニン、N-アセチル-L-グルコースアミニル-L-アスパラギン、およびO-マンノースアミニル-L-セリンが挙げられる。こうしたアミノ酸の例には、アミノ酸と糖の間の自然発生N-またはO-リンケージが、天然では一般に見いだせない共有結合リンケージ - アルケン、オキシム、チオエーテル、アミドなどが挙げられるが、これらに限定されない - によって置換されている例も含まれる。こうしたアミノ酸の例には、自然発生タンパク質では一般に見出せない糖類、例えば、2-デオキシ-グルコースおよび2-デオキシガラクトースなども含まれる。

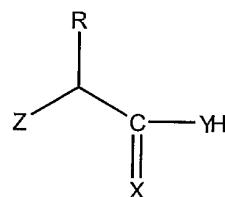
## 【0191】

本明細書において提供する天然にはコードされないアミノ酸の多くは、例えば、S i g m a - A l d r i c h (米国、ミズーリ州、セントルイス)、N o v a b i o c h e m (ドイツ、ダルムシュタットのEMD Biosciencesの一部門)またはP e p t e c h (米国、マサチューセッツ州のバーリントン)から市販されている。市販されていないものは、本明細書において提供するように、または当業者に公知である標準的な方法を使用して、場合により合成される。有機合成法については、例えば、F e s s e n d o nおよびF e s s e n d o nによるO r g a n i c C h e m i s t r y (1982, S e c o n d E d i t i o n, W i l l a r d G r a n t P r e s s, B o s t o n M a s s . ) ; M a r c h によるA d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y (T h i r d E d i t i o n, 1985, W i l e y a n d S o n s, N e w Y o r k ) ; およびC a r e y a n d S u n d b e r g によるA d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y (T h i r d E d i t i o n, P a r t s A a n d B, 1990, P l e n u m P r e s s, N e w Y o r k ) 参照。米国特許出願公開第2003/0082575号および同第2003/0108885号も参照（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）。新規側鎖を含有する非天然アミノ酸に加えて、本発明での使用に適する非天然アミノ酸には、式IIおよびIII：

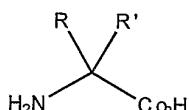
## 【0192】

【化9】

II



III



10

(式中、Zは、典型的にはOH、NH<sub>2</sub>、SH、NH-R'またはS-R'を含み；XおよびYは、同じであってもよいし、異なっていてもよく、典型的にはSまたはOを含み；ならびにRおよびR'は、同じであってもよいし、異なっていてもよく、典型的には、式Iを有する非天然アミノ酸について上に記載したR基についての構成成分と同じリストならびに水素から選択される)の構造により示されるような、変性された骨格構造も場合により含まれる。例えば、本発明の非天然アミノ酸は、式IIおよびIIIにより図示されるようなアミノまたはカルボキシル基における置換を含む。このタイプの非天然アミノ酸としては、-ヒドロキシ酸、-チオ酸、-アミノチオカルボキシレート(共通の20の天然アミノ酸または非天然側鎖に対応する側鎖を有するものを含むが、これらに限定されない)が挙げられるが、これに限定されない。加えて、炭素での置換としては、L-Dまたは-二置換アミノ酸、例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-O-チロシンおよびアミノ酪酸などが場合により挙げられるが、これらに限定されない。他の構造的代替としては、環状アミノ酸、例えばプロリン類似体および3、4、6、7、8および9員環プロリン類似体、およびアミノ酸、例えばアラニンおよび-アミノ酪酸が挙げられる。

20

【0193】

多数の非天然アミノ酸が、天然アミノ酸、例えばチロシン、グルタミンおよびフェニルアラニンなど、に基づくものであり、本発明での使用に適する。チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、およびメタ置換チロシンが挙げられるが、これらに限定されず、この場合、前記置換チロシンは、ケト基(アセチル基を含むが、これに限定されない)、ベンジル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>直鎖もしくは分枝炭化水素、飽和もしくは不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基またはアルキニル基など(これらを含むが、これらに限定されない)を含む。加えて、多置換アリール基も考えられる。本発明での使用に適するグルタミン類似体としては、-ヒドロキシ誘導体、-置換誘導体、環状誘導体、および置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明での使用に適切であり得るフェニルアラニン類似体の例としては、パラ置換フェニルアラニン、オルト置換フェニルアラニンおよびメタ置換フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されず、この場合、前記置換基は、ヒドロキシル基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド、アジド、ヨード、プロモ、ケト基(アセチル基を含むが、これに限定されない)、ベンゾイルまたはアルキニル基など(を含むが、これらに限定されない)を含む。本発明での使用に適切であり得る非天然アミノ酸の具体的な例としては、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-Glycine -セ

30

40

50

リン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソポリペプチド-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニンおよびp-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明での使用に適切であり得る様々な非天然アミノ酸の構造の例は、例えば、「非天然アミノ酸のインビオ組み込み(*In vivo incorporation of unnatural amino acid*)」と題する国際公開第2002/085923号に提供されている。<sup>10</sup>追加のメチオニン類似体については、Kiickら、(2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS 99:19-24も参照のこと。

## 【0194】

1つの実施態様では、非天然アミノ酸（例えば、p-（プロパルギルオキシ）フェニルアラニン）を含むhGHポリペプチドの組成物を提供する。p-（プロパルギルオキシ）フェニルアラニンを含み、ならびにタンパク質および/または細胞を含む（しかし、これらに限定されない）様々な組成物も提供する。一つの側面において、p-（プロパルギルオキシ）-フェニルアラニン非天然アミノ酸を含む組成物は、直交性tRNAをさらに含む。前記非天然アミノ酸は、前記直交性tRNAに結合（共有結合を含むが、これに限定されない）していてもよく、これは、アミノアシル結合により直交性tRNAに共有結合していてもよい、直交性tRNAの末端リボース糖の3'OHまたは2'OHに共有結合していてもよい、などを含むが、これらに限定されない。<sup>20</sup>

## 【0195】

タンパク質に組み込むことができる非天然アミノ酸による化学部分により、このタンパク質の様々な利点および操作が提供される。例えば、ケト官能基のユニークな反応性により、多数のヒドラジン含有またはヒドロキシルアミン含有試薬のいずれかでのタンパク質をインビトロおよびインビオで選択的に変性することができる。例えば、重原子非天然アミノ酸は、X線構造データの同期に有用であり得る。非天然アミノ酸を使用する重電子の部位特異的導入は、重電子の位置の選択に関する選択性および自由度もたらす。光反応性非天然アミノ酸（ベンゾフェノンおよびアリールアジド（フェニルアジドを含むが、これに限定されない）を有するアミノ酸を含むが、これらに限定されない）は、タンパク質の効率的なインビオおよびインビトロ光架橋を可能にする。光反応性非天然アミノ酸の例としては、p-アジド-L-フェニルアラニンおよびp-ベンゾイル-L-フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。そういうわけで、光反応性非天然アミノ酸を有するタンパク質は、光反応性基の励起をもたらす一時的制御により随意に架橋させることができる。一例では、核磁気共鳴および振動分光学を使用して（これを含むが、これに限定されない）、非天然アミノのメチル基を、局所的構造および動態のプローブとして同位体標識されたメチル基（これを含むが、これに限定されない）で置換することができる。例えば、アルキニルまたはアジド官能基により、[3+2]付加環化反応による分子でのタンパク質の選択的修飾が可能となる。<sup>30</sup><sup>40</sup>

## 【0196】

ポリペプチドのアミノ末端に組み込まれる天然でないアミノ酸は、20の天然アミノ酸に用いられているもの以外のいずれかの置換基であるR基、および-L-アミノ酸中に通常存在するNH<sub>2</sub>基とは異なる第二の反応性基（式I参照）から成り得る。類似の天然でないアミノ酸を、-L-アミノ酸中に通常存在するCOOH基とは異なる第二の反応性基（式I参照）を有するカルボキシル末端に、組み込むことができる。

## 【0197】

## 非天然アミノ酸の化学合成

本発明での使用に適する非天然アミノ酸の多くは、例えば、Sigma（米国）または

10

20

30

40

50

Aldrich(米国、ウィスコンシン州、ミルウォーキー)から市販されている。市販されていないものは、本明細書において提供するように、または様々な出版物に提供されているように、または当業者に公知である標準的な方法を使用して、場合によっては合成される。有機合成法については、例えば、FessendenおよびFessendenによるOrganic Chemistry(1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.) ; MarchによるAdvanced Organic Chemistry(Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) ; およびCarey and SundbergによるAdvanced Organic Chemistry(Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)参照。非天然アミノ酸の合成を記載している追加の出版物としては、例えば、「非天然アミノ酸のインビオ組み込み(*In vivo incorporation of unnatural amino acid*)」と題する国際公開第2002/085923号; Matsoukassら、(1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F. E. & Kidd, D. A. A. (1949) *A New Synthesis of Glutamine and of γ-Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates*. *J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O. M. & Chatterji, R. (1959) *Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents*. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J. C. ら(1988) *Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine)*. *J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) *Glutamine analogues as Potential Antimalarials*. *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. & Rapoport, H. (1989) *Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues*. *J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B. D. & Rapoport, H. (1985) *Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization*. *J. Org. Chem.* 1989:1859-1866; Bartonら、(1987) *Synthesis of Novel α-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-a-Amino-Adipic Acids, L-a-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives*. *Tetrahedron Lett.* 43:4297-4308; およびSubasingheら、(1992) *Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site*. *J. Med. Chem.* 35:4602-7参照。2003年12月22日出願、出願番号10/744,899の「プロテインアレイ(Protein Arrays)」と

題する特許出願および2002年12月22日出願、出願番号60/435,821の特許出願も参照。

【0198】

A. カルボニル反応性基

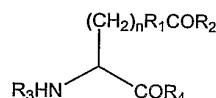
カルボニル反応性基を有するアミノ酸は、数ある中でも求核付加またはアルドール縮合反応により分子（PEGまたは他の水溶性分子が挙げられるが、これらに限定されない）に連結する様々な反応を可能にする。

【0199】

カルボニル含有アミノ酸の具体例は、次のように表すことができる：

【0200】

【化10】



（式中、nは、0から10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであり；R<sub>2</sub>は、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリールであり；R<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>4</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、R<sub>2</sub>は、単純アルキル（すなわち、メチル、エチルまたはプロピル）であり、ならびにケトン部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に位置する。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、R<sub>2</sub>は、単純アルキル（すなわち、メチル、エチルまたはプロピル）であり、ならびにケトン部分は、アルキル側鎖に対してメタ位に位置する。

【0201】

p-アセチル-(+/-)-フェニルアラニンおよびm-アセチル-(+/-)-フェニルアラニンは、Zhang, Z.ら、Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)に記載されている（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。当業者は、他のカルボニル含有アミノ酸を同様に調製することができる。

【0202】

一部の実施態様では、天然にはコードされないアミノ酸を含むポリペプチドを化学修飾して、反応性カルボニル官能基を生じさせる。例えば、コンジュゲーション反応に有用なアルデヒド官能基は、隣接したアミノ基とヒドロキシリル基を有する官能基から生じさせることができる。この生物活性分子がポリペプチドである場合、例えば、N末端セリンまたはトレオニン（これは、正常に存在するものであってもよいし、または化学的または酵素的消化により露出されていてもよい）を使用して、穏やかな酸化分解条件下、過ヨウ素酸塩の使用により、アルデヒド官能基を生じさせることができる。例えば、Gaertnerら、Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Gaertnerら、J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994) 参照。しかし、当該技術分野において公知である方法は、ペプチドまたはタンパク質のN末端のアミノ酸に限定されない。

【0203】

本発明では、隣接したヒドロキシリル基およびアミノ基を有する天然にはコードされないアミノ酸を、「マスクされた」アルデヒド官能基としてポリペプチドに組み込むことができる。例えば、5-ヒドロキシリシンは、イプシロンアミンに隣接したヒドロキシリル基を有する。アルデヒドを生じさせるための反応条件は、このポリペプチド内の他の部位での酸化を回避するために、穏やかな条件下でモル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加することを一般に含む。酸化反応のpHは、典型的には約7.0である。典型的な反応は、約1.5モル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを緩衝ポリペプチド溶液に添加し、次いで

10

20

30

40

50

、暗所で約10分間、インキュベートすることを含む。例えば、米国特許第6,423,685号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。

#### 【0204】

カルボニル官能基は、水溶液中、穏やかな条件下で、ヒドラジン含有、ヒドラジド含有、ヒドロキシルアミン含有、またはセミカルバジド含有試薬と選択的に反応させて、生理条件下で安定な、対応するヒドラゾン、オキシムまたはセミカルバゾンリンケージをそれぞれ形成することができる。例えば、Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. および Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995) 参照。さらに、このカルボニル基のユニークな反応性により、他のアミノ酸側鎖の存在下での選択的修飾が可能となる。例えば、Cornish, V. W. ら、J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Biocconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Mahal, L. K. ら、Science 276: 1125-1128 (1997) 参照。10

#### 【0205】

##### B. ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド反応性基

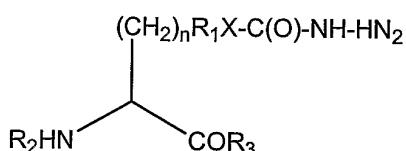
ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジドなどの求核性の基を含有する天然にはコードされないアミノ酸により、様々な求電子性の基（PEGまたは他の水溶性ポリマーを含むが、これらに限定されない）と反応してコンジュゲートを形成する可能となる。20

#### 【0206】

ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド含有アミノ酸の具体例は、次のように表すことができる：

#### 【0207】

#### 【化11】



30

（式中、nは、0から10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルもしくは置換アリールであるか、存在せず；Xは、O、NもしくはSであるか、存在せず；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）。

#### 【0208】

一部の実施態様において、nは、4であり、R<sub>1</sub>は、存在せず、Xは、Nである。一部の実施態様において、nは、2であり、R<sub>1</sub>は、存在せず、Xは、存在しない。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、Oであり、酸素原子は、アリール環上の脂肪族基に対してパラに位置する。40

#### 【0209】

ヒドラジド含有、ヒドラジン含有、およびセミカルバジド含有アミノ酸は、市場の供給業者から入手することができる。例えば、L-グルタメート- - -ヒドラジンは、Sigma Chemical (ミズーリ州、セントルイス) から入手できる。市販されていない他のアミノ酸は、当業者により調製され得る。例えば、米国特許第6,281,211号参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。

#### 【0210】

ヒドラジド、ヒドラジンまたはセミカルバジド基を有する、天然にはコードされないアミノ酸を含有するポリペプチドを、アルデヒドまたは類似の化学反応性を有する他の官能基を含有する様々な分子と効率的および選択的に反応させることができる。例えば、Sh50

a o , J . および T a m , J . 、 J . A m . C h e m . S o c . 1 1 7 : 3 8 9 3 - 3 8 9 9 ( 1 9 9 5 ) 参照。ヒドラジド、ヒドラジンおよびセミカルバジド官能基のユニークな反応性は、20の共通アミノ酸上に存在する求電子性の基（セリンもしくはトレオニンのヒドロキシル基、またはリシンおよびこのN末端のアミノ基が挙げられるが、これらに限定されない）と比較して、アルデヒド、ケトンおよび他の求電子性の基に対するこれらの反応性を有意に高くする。

## 【0211】

## C . アミノオキシ含有アミノ酸

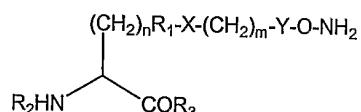
アミノオキシ（ヒドロキシルアミンとも呼ばれる）を含有する天然にはコードされないアミノ酸により、様々な求電子性の基（PEGまたは他の水溶性ポリマーを含むが、これらに限定されない）と反応してコンジュゲートを形成することが可能となる。ヒドラジン、ヒドラジドおよびセミカルバジドと同様、アミノオキシ基の強化された求核性により、アルデヒドまたは同様の化学反応性を有する他の官能基を含有する様々な分子と効率的および選択的に反応することが可能となる。例えば、Shao , J . および Tam , J . 、 J . A m . C h e m . S o c . 1 1 7 : 3 8 9 3 - 3 8 9 9 ( 1 9 9 5 ) ; H . H a n g および C . B e r t o z z i , A c c . C h e m . R e s . 3 4 : 7 2 7 - 7 3 6 ( 2 0 0 1 ) 参照。しかし、ヒドラジン基との反応の結果が対応するヒドラゾンであるのに対し、オキシムは、一般に、アミノオキシ基とカルボニル含有基、例えばケトンとの反応から生じる。

## 【0212】

アミノオキシ基含有アミノ酸の具体例は、次のように表すことができる：

## 【0213】

## 【化12】



（式中、nは、0から10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであるか、存在せず；Xは、O、N、Sであるか、存在せず；mは、0から10であり；Y=C(O)または存在せず；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、Oであり、mは、1であり、Yは、存在する。一部の実施態様において、nは、2であり、R<sub>1</sub>およびXは、存在せず、mは、0であり、Yは、存在しない。

## 【0214】

アミノオキシ含有アミノ酸は、容易に入手できるアミノ酸前駆体（ホモセリン、セリンおよびトレオニン）から調製することができる。例えば、Carrasco and R . Brown , J . O r g . C h e m . 6 8 : 8 8 5 3 - 8 8 5 8 ( 2 0 0 3 ) 参照。一定のアミノオキシ含有アミノ酸、例えば、L-2-アミノ-4-(アミノオキシ)酪酸)は、天然源から単離されている (Rosenthal , G . ら、L i f e S c i . 6 0 : 1 6 3 5 - 1 6 4 1 ( 1 9 9 7 ) )。他のアミノオキシ含有アミノ酸は、当業者により調製され得る。

## 【0215】

## D . アジドおよびアルキン反応性基

アジドおよびアルキン官能基のユニークな反応性が、これらをポリペプチドおよび他の生体分子の選択的修飾に極めて有用にしている。一般に、有機アジド、特に脂肪族アジド、およびケトンは、通常の反応性化学条件に対して安定である。特に、アジド官能基とアルキン官能基の両方が、自然発生ポリペプチドにおいて見出される20の共通アミノ酸の側鎖（すなわち、R基）に対して不活性である。しかし、近接させると、アジド基および

10

20

30

40

50

アルキン基の「spring-loaded」特性が現れ、これらがHuisgen [3+2]付加環化反応により選択的および効率的に反応して、対応するトリアゾールを生じさせる。例えば、Chin J.ら、Science 301: 964-7 (2003); Wang, Q.ら、J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W.ら、J. Am. Chem. Soc. 124: 9026-9027 (2002) 参照。

#### 【0216】

Huisgen付加環化は、求核置換ではなく選択的付加環化を伴う（例えば、Padwa, A., COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESISにおいて、Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. 1, 3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRYにおいて, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176 参照）ため、アジドおよびアルキン含有側鎖を有する天然にはコードされないアミノ酸の組み込みにより、結果として生じるポリペプチドをこの天然にはコードされないアミノ酸の位置で選択的に修飾することができる。アジドまたはアルキン含有hGHポリペプチドを伴う付加環化反応は、Cu(II)をCu(I)にインサイチューで還元するための還元剤が触媒量で存在する状態でのCu(II)の添加（触媒量のCuSO<sub>4</sub>の形態での添加を含むが、これに限定されない）により、室温、水性条件下で行うことができる。例えば、Wang, Q.ら、J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W.ら、J. Org. Chem. 67: 3057-3064 (2002); Rostovtsevら、Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599 (2002) 参照。還元剤の具体例としては、アスコルベート、金属銅、キノリン、ヒドロキノン、ビタミンK、システイン、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、および負荷電位が挙げられる（挙げられるが、これらに限定されない）。

#### 【0217】

アジドとアルキンの間のHuisgen [3+2]付加環化反応が所望される一部のケースでは、hGHポリペプチドが、アルキン部分を含む天然にはコードされないアミノ酸を含み、このアミノ酸に取り付けられる水溶性ポリマーが、アジド部分を含む。また、逆の反応（すなわち、アミノ酸上のアジド部分と水溶性ポリマー上のアルキン部分との反応）も行うことができる。

#### 【0218】

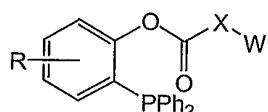
アリールエステルを含有し、アリールホスフィン部分で適切に官能化された水溶性ポリマーとアジド官能基を選択的に反応させて、アミドリンケージを生じさせることもできる。アリールホスフィン基が、アジドをインサイチューで還元し、次に結果として生じたアミンが、隣接するエステルリンケージと効率的に反応して、対応するアミドを生じさせる。例えば、E. SaxonおよびC. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000) 参照。このアジド含有アミノ酸は、アルキルアジド（2-アミノ-6-アジド-1-ヘキサン酸を含むが、これに限定されない）またはアリールアジド（p-アジド-フェニルアラニン）のいずれかであり得る。

#### 【0219】

アリールエステルおよびホスフィン部分を含有する水溶性ポリマーの具体例は、次のように表すことができる：

#### 【0220】

#### 【化13】



（式中、Xは、O、N、Sであり得るか、存在せず、Phは、フェニルであり、Wは、水

10

20

30

40

50

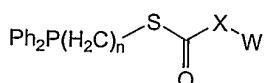
溶性ポリマーであり、Rは、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリール基であり得る)。R基の具体例としては、-CH<sub>2</sub>、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-C(O)R'、-CONR'R''、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-CNおよび-NO<sub>2</sub>が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR'''は、各々、独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール(1から3個のハロゲンで置換されているアリールを含むが、これに限定されない)、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が、1つより多くR基を含む場合、各R基は、1つり多くのR'、R''、R'''およびR'''基が存在するときの各R'、R''、R'''およびR'''基であるかのように、独立して選択される。R'およびR''が、同じ窒素原子に取り付けられている場合、これらは、この窒素原子と協力して、5、6または7員環を形成する。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含む(しかし、これらに限定されない)ものと考える。置換基の上の論議から、用語「アルキル」が、水素原子以外に結合した炭素原子を含む基、例えば、ハロアルキル(-CF<sub>3</sub>および-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)を含むが、これらに限定されない)およびアシル(-C(O)CH<sub>3</sub>、-C(O)CF<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>などを含むが、これらに限定されない)を包含するものと考えることは、当業者には理解されるであろう。

## 【0221】

チオエステルを含有し、アリールホスフィン部分で適切に官能化された水溶性ポリマーとアジド官能基を選択的に反応させて、アミドリンケージを生じさせることもできる。アリールホスフィン基が、アジドをインサイチューで還元し、結果として生じたアミンが、次いで、チオエステルリンケージと効率的に反応して、対応するアミドを生じさせる。チオエステルおよびホスフィン部分を含有する水溶性ポリマーの具体例は、次のように表すことができる:

## 【0222】

## 【化14】



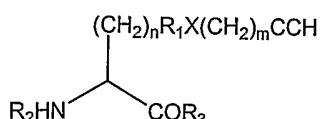
(式中、nは、1から10であり; Xは、O、N、Sであり得るか、存在せず; Phは、フェニルであり; Wは、水溶性ポリマーである)。

## 【0223】

アルキン含有アミノ酸の具体例は、次のように表すことができる:

## 【0224】

## 【化15】



(式中、nは、1から10であり; R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであるか、存在せず; Xは、O、N、Sであるか、存在せず; mは、0から10であり; R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり; ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である)。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、存在せず、mは、0であり、アセチレン部分は、このアルキル側鎖のパラ位に位置する。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、Oであり、mは、1であり、ならびにプロパルギルオキシ基は、このアルキル鎖に対してパラ位に位置する(すな

10

20

30

40

50

わち、O - プロパルギル - チロシン）。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>およびXは、存在せず、mは、0である（すなわち、プロパリールグリシン）。

#### 【0225】

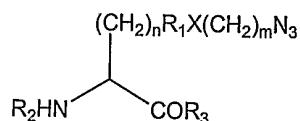
アルキル含有アミノ酸は、市販されている。例えば、プロパルギルグリシンは、P e p t e c h (マサチューセッツ州、バーリントン) から市販されている。また、アルキン含有アミノ酸は、標準的な方法に従って調製することができる。例えば、p - プロパルギルオキシフェニルアラニンは、例えば、D e i t e r s , A . ら、J . A m . C h e m . S o c . 125 : 11782 - 11783 (2003) に記載されているように合成することができ、4 - アルキン - L - フェニルアラニンは、K a y s e r , B . ら、T e t r a h e d r o n 53 (7) : 2475 - 2484 (1997) に記載されているように合成することができる。他のアルキン含有アミノ酸は、当業者により調製され得る。  
10

#### 【0226】

アジド含有アミノ酸の具体例は、次のように表すことができる：

#### 【0227】

#### 【化16】



20

(式中、nは、0から10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、存在せず；Xは、O、N、Sであるか、存在せず；mは、0から10であり；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；ならびにR<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、存在せず、mは、0であり、ならびにアジド部分は、このアルキル側鎖に対してパラに位置する。一部の実施態様において、nは、0から4であり、R<sub>1</sub>およびXは、存在せず、ならびにm = 0である。一部の実施態様において、nは、1であり、R<sub>1</sub>は、フェニルであり、Xは、Oであり、mは、2であり、ならびに - アジドエトキシ部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に位置する。  
30

#### 【0228】

アジド含有アミノ酸は、市場の供給業者から入手することができる。例えば、4 - アジドフェニルアラニンは、C h e m - I m p e x I n t e r n a t i o n a l , I n c . (イリノイ州、ウッド・デール) から入手することができる。市販されていないアジド含有アミノ酸については、適する脱離基(ハロゲン化物、メシレート、トシレートを含むが、これらに限定されない)による方法または適切に保護されたラクトンの開環による方法をはじめとする(しかし、これらに限定されない)当業者に公知である標準的な方法を使用して、比較的容易に調製することができる。例えば、M a r c h によるA d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York) 参照。  
40

#### 【0229】

##### E . アミノチオール反応性基

ベータ置換アミノチオール官能基のユニークな反応性が、これらを、チアゾリジンの形成によるアルデヒド基を含有するポリペプチドおよび他の生物活性分子の選択的置換に、極めて有用にしている。例えば、J . S h a o および J . T a m , J . A m . C h e m . S o c . 1995 , 117 (14) 3893 - 3899 参照。一部の実施態様では、ベータ置換アミノチオールアミノ酸をh G H ポリペプチドに組み込み、次いで、アルデヒド官能基を含む水溶性ポリマーと反応させることができる。一部の実施態様において、水溶性ポリマー、薬物コンジュゲートまたは他のペイロードを、ベータ置換アミノチオールを含むh G H ポリペプチドに、チアゾリジンの形成経由でカップリングさせることができる。  
50

## 【0230】

## 非天然アミノ酸の細胞取り込み

真核細胞による非天然アミノ酸取り込みは、タンパク質への組み込み（これを含むが、これに限定されない）のために非天然アミノ酸を設計および選択する際に典型的に考えられる一つの論点である。例えば、高電荷密度の $\alpha$ -アミノ酸は、これらの化合物が細胞透過性である可能性が高いことを暗示している。天然アミノ酸は、タンパク質に基づく輸送系の収集により、真核細胞に取り込まれる。もし必要であれば、どの非天然アミノ酸が細胞によって取り込まれるかを評価する迅速スクリーニングを行うことができる。例えば、毒性アッセイ、例えば、出願番号10/744, 899の「プロテインアレイ（Protein Arrays）」と題する特許出願および2002年12月22日出願、出願番号60/435, 821の特許出願、ならびに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におけるものを参照のこと。取り込みは、様々なアッセイで容易に分析されるが、細胞取り込み経路に適する非天然アミノ酸の設計に代わるべきは、インビオでアミノ酸を作るための生合成経路の提供である。

## 【0231】

## 非天然アミノ酸の生合成

アミノ酸および他の化合物を生産するための多数の生合成経路が、既に細胞内に存在する。真核細胞（これを含むが、これに限定されない）における特定の非天然アミノ酸の生合成方法は、天然には存在し得ないが、本発明は、こうした方法を提供する。例えば、新たな酵素の追加または既存の宿主細胞経路の修飾により、宿主細胞において非天然アミノ酸の生合成経路を場合により発生させる。追加の新たな酵素は、場合により、自然発生酵素または人工的に発生させた酵素である。例えば、p-アミノフェニルアラニンの生合成（例えば、「非天然アミノ酸のインビオ組み込み（In vivo incorporation of unnatural amino acids）」と題する国際公開第2002/085923号の一実施例に提示されているようなもの）は、他の生物からの公知酵素の組合せの追加に依存する。これらの酵素の遺伝子は、これらの遺伝子を含むプラスミドで細胞を形質転換させることにより、真核細胞に組み込むことができる。遺伝子は、細胞において発現されると、所望の化合物を合成するための酵素的経路を生じさせる。場合により追加される酵素のタイプの例は、下の実施例において提供する。追加の酵素の配列は、例えば、Genbankにおいて見つけられる。人工的に発生させた酵素も同じ要領で細胞に場合によっては追加される。この要領で、細胞機構および細胞資源を操作して、非天然アミノ酸を生産する。

## 【0232】

様々な方法が、生合成経路で使用するための新規酵素を生産するために、または既存経路の発生ために利用することができる。例えば、Maxygen, Inc. により開発されたもの（これを含むが、これに限定されない）（World Wide Webのmaxygen.comで利用可能）のような再帰的組換えを場合によっては使用して、新規酵素および経路を開発する。例えば、Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370 (4) : 389 - 391; およびStemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91: 10747 - 10751参照。同様に、Gemecorにより開発されたDesignPath（商標）（World Wide Webのgene.comで利用可能）が、O-メチル-L-チロシンを細胞で作る経路を操作する（これを含むが、これに限定されない）代謝経路操作に場合により使用される。この技術

10

20

30

40

50

は、機能的ゲノムにより同定される（これを含むが、これに限定されない）新たな遺伝子の組に合わせならびに分子の発生および設計を用いて宿主生物における既存の経路を再構築する。Diversa Corporation (World Wide Webの

diversa.comで利用可能) も、新規経路をつくるため（これを含むが、これに限定されない）の遺伝子ライブラリおよび遺伝子経路を迅速にスクリーニングする技法を提供している。

#### 【0233】

典型的に、本発明の被操作生合成経路で生産される非天然アミノ酸は、天然の細胞量を含む（しかし、これに限定されない）効率的なタンパク質生合成に十分であるが、他のアミノ酸の濃度に影響を及ぼしたり、細胞資源を枯渇させたりしない程度の濃度で生産される。この要領でインビオで生産される典型的な濃度は、約10 mMから約0.05 mMである。特定の経路および非天然アミノ酸に望ましい酵素を生産するために使用される遺伝子を含むプラスミドで細胞を形質転換したら、場合によりインビオ選択を利用して、リボソームタンパク質生合成と細胞成長の両方のためにこの非天然アミノ酸の生産をさらに最適化する。

#### 【0234】

##### 非天然アミノ酸を有するポリペプチド

非天然アミノ酸の組み込みは、目的に合わせたタンパク質構造および／または機能変更、サイズ、酸性度、求核性、水素結合、疎水性、プロテアーゼターゲット部位の接近容易性の変更、ある部分に対するターゲット設定（タンパク質アレイのためのものを含むが、これに限定されない）などを含む（しかし、これらに限定されない）様々な目的のために行うことができる。非天然アミノ酸を含むタンパク質は、強化された、またはそれどころか全く新しい触媒または生合成経路を有することができる。例えば、タンパク質に非天然アミノ酸を含めることにより、次の特性が場合によっては修飾される：毒性、生体内分布、構造特性、分光特性、化学および／または光化学特性、触媒能、半減期（血清半減期を含むが、これに限定されない）ならびに他の分子と反応する（「共有結合的に」または「非共有結合的に」を含むが、これらに限定されない）能力。少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むタンパク質を含む組成物は、例えば、新規療法、診断、触媒性酵素、工業用酵素、タンパク質（酵素を含むが、これに限定されない）結合、ならびにタンパク質構造および機能の研究（を含むが、これらに限定されない）に有用である。例えば、 Dougherty (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4: 645-652 参照。

#### 【0235】

本発明の一つの側面において、組成物は、少なくとも1つ（少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、もしくは少なくとも10またはそれ以上を含むが、これらに限定されない）の非天然アミノ酸を有する少なくとも1つのタンパク質を含む。これらの非天然アミノ酸は、同じであることもあり、または異なることもある（1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質に、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上の異なる部位が存在し得ることを含むが、これらに限定されない）。もう一つの側面において、組成物は、このタンパク質中に存在する少なくとも1つ、しかしそれよりは少ない特定のアミノ酸が、非天然アミノ酸で置換されているタンパク質を含む。1つより多くの非天然アミノ酸を有する所定のタンパク質については、これらの非天然アミノ酸が、同じであることもあり、または異なることがある（タンパク質が、2つまたはそれ以上の異なるタイプの非天然アミノ酸を含むこともあり、または2つの同じ非天然アミノ酸を含むこともあるということを含む、これらに限定されない）。2つまたはそれ以上の非天然アミノ酸を有する所定のタンパク質については、これらの非天然アミノ酸は、同じであることもあり、異なる

10

20

30

40

50

こともあり、または同じ種類の多数の非天然アミノ酸と少なくとも1つの異なる非天然アミノ酸の組合せであることもある。

## 【0236】

少なくとも1つの非天然アミノ酸を有する、対象となるタンパク質またはポリペプチドが、本発明の一つの特徴である。本発明は、本発明の組成物および方法を使用して生産される、少なくとも1つの非天然アミノ酸を有するポリペプチドまたはタンパク質も包含する。賦形剤（医薬的に許容される賦形剤を含むが、これに限定されない）も本タンパク質とともに存在し得る。

## 【0237】

真核細胞において、少なくとも1つの非天然アミノ酸を有する、対象となるタンパク質またはポリペプチドを生産することにより、タンパク質またはポリペプチドは、真核性後処理修飾を一般に含むこととなる。一定の実施態様において、タンパク質は、少なくとも1つの非天然アミノ酸と、真核細胞によってインビボで行われる少なくとも1つの後翻訳修飾とを含み、この後翻訳修飾は、原核細胞によって行われない。例えば、この後翻訳修飾には、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミテート付加、リン酸化、糖脂質リンケージ修飾およびグリコシリ化などが挙げられるが、これらに限定されない。一つの側面における後翻訳修飾としては、GlcNAc-アスパラギンリンケージへのオリゴ糖の取り付け((GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc)を含むが、これに限定されない）が挙げられる。真核性タンパク質のN結合型オリゴ糖の一部の例を記載している（示されていない追加の残基も存在する）表1を参照のこと。もう一つの側面における後翻訳修飾としては、GalNAc-セリンもしくはGalNAc-トレオニンリンケージまたはGalNAc-セリンもしくはGalNAc-トレオニンリンケージによるセリンまたはトレオニンへのオリゴ糖の取り付け(Gal-GalNAc、Gal-GlcNAcなどを含むが、これらに限定されない）が挙げられる。

## 【0238】

## 【表2】

表1: GlcNAcリンケージによるオリゴ糖の例

タイプ	塩基構造
-----	------

高マンノース	

## 【0239】

10

20

20

30

40

50

さらにもう一つの側面における後翻訳修飾としては、前駆体（カルシトニン前駆体、カルシトニン遺伝子関連ペプチド前駆体、プレプロ副甲状腺ホルモン、プレプロインスリン、プロインスリン、プレプロオピオメラノコルチンおよびプロオピオメラノコルチンなどを含むが、これらに限定されない）の真核性プロセッシング、多サブユニットタンパク質への組立てもしくは高分子組立て、細胞内の別の部位への翻訳（細胞器官、例えば、小胞体、ゴルジ体、核、リソソーム、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、葉緑体、小胞などへのもの、または分泌経路によるものを含むが、これらに限定されない）が挙げられる。一定の実施態様において、タンパク質は、分泌もしくは局在化配列、エピトープタグ、F L A G タグ、ポリヒスチジンタグまたはG S T 融合などを含む。米国特許第4,963,495号および同第6,436,674号（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）には、h G H ポリペプチドの分泌を改善するように設計された構築物が詳述されている。10

#### 【0240】

非天然アミノ酸の一つの利点は、それが、追加分子を付加させるために使用することができる追加の化学部分を提供することである。これらの修飾は、真核細胞もしくは非真核細胞においてインビオで、またはインビトロで行うことができる。従って、一定の実施態様において、後翻訳修飾は、非天然アミノ酸によるものである。例えば、後翻訳修飾は、求核-求電子反応によるものであり得る。タンパク質の選択的修飾に現在使用されている殆どの反応が、-ハロケトンとヒスチジンまたはシステイン側鎖との反応を含む（しかし、これらに限定されない）、求核性反応パートナーと求電子性反応パートナーの間の共有結合形成を含む。これらの場合の選択性は、このタンパク質中の求核性残基の数および接近容易性によって決まる。本発明のタンパク質では、他のより選択的な反応、例えば、非天然ケトアミノ酸とヒドラジンまたはアミノオキシ化合物とのインビトロおよびインビオでの反応、を用いることができる。例えば、Cornishら、(1996) Am. Chem. Soc., 118: 8150 - 8151; Mahalら、(1997) Science 276: 1125 - 1128; Wangら、(2001) Science 292: 498 - 500; Chinら、(2002) Am. Chem. Soc. 124: 9026 - 9027; Chinら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 11020 - 11024; Wangら、(2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 56 - 61; Zhangら、(2003) Biochemistry 42: 6735 - 6746; およびChinら、(2003) Science, in press 参照。これは、蛍光体、架橋剤、糖誘導体および細胞毒性分子をはじめとする試薬の宿主での実質的にあらゆるタンパク質の選択的標識を可能にする。2003年1月16日出願の「糖タンパク質合成(Glycoprotein synthesis)」と題する米国特許出願番号10/686,944 参照（これは、本明細書に参照により組み込まれている）。アジドアミノ酸によるものをはじめとする（しかし、これに限定されない）後翻訳修飾は、シュタウディンガーライゲーション（トリアリールホスフィン試薬でのものを含むが、これに限定されない）によって行うこともできる。例えば、Kerrickら、(2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99: 19 - 24 参照。3040

#### 【0241】

本発明は、タンパク質を選択的に修飾するためのもう一つの非常に効率的な方法を提供し、この方法は、セレクターコドンに応答してのタンパク質への非天然アミノ酸（アジドまたはアルキニル部分を含有するものを含むが、これらに限定されない）の遺伝子組み込みを含む。次に、これらのアミノ酸側鎖は、それぞれアルキニルまたはアジド誘導体（これらを含むが、これらに限定されない）とのHuisgen [3+2] 付加環化反応（これを含むが、これに限定されない）により、修飾することができる（例えば、Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis. 50

Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069 - 1109; および Huisgen, R., 1, 3-Dipolar Cycloaddition Chemistryにおいて, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1 - 176 参照)。この方法は、求核置換ではなく付加環化を要するため、極めて高い選択性でタンパク質を修飾することができる。この反応は、反応混合物への触媒量の Cu(I) 塩の添加により、室温、水性条件下、卓越した位置選択性 (1, 4 > 1, 5) で行うことができる。例えば、Tornoeら、(2002) Org. Chem. 67: 3057 - 3064; および Rostovtsevら、(2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596 - 2599 参照。使用することができるもう一つの方法は、テトラシスティンモチーフを有する二砒酸化合物を用いるリガンド交換である。例えば、Griffithら、(1998) Science 281: 269 - 272 参照。

## 【0242】

[3 + 2] 付加環化により本発明のタンパク質に付加させることができる分子としては、アジドまたはアルキニル誘導体を有する実施的にあらゆる分子が挙げられる。分子としては、色素、蛍光体、架橋剤、糖誘導体、ポリマー（ポリエチレングリコールの誘導体を含むが、これに限定されない）、光架橋剤、細胞毒性化合物、親和性ラベル、ビオチンの誘導体、樹脂、ビーズ、第二のタンパク質またはポリペプチド（またはそれ以上）、ポリヌクレオチド（複数を含む）（DNA、RNAなどを含むが、これらに限定されない）、金属キレート化剤、補助因子、脂肪酸および炭水化物などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの分子は、アルキニル基を有する非天然アミノ酸（p-プロパルギルオキシフェニルアラニンを含むが、これに限定されない）またはアジド基を有する非天然アミノ酸（p-アジド-フェニルアラニンを含むが、これに限定されない）に付加させることができる。

## 【0243】

## V. 遺伝的にコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドのインビボ生成

本発明の hGH ポリペプチドは、修飾された tRNA および tRNA シンセターゼを使用して、自然発生系ではコードされないアミノ酸に付加させる、またはこれらを置換することにより、インビボで生じさせることができる。

## 【0244】

自然発生系ではコードされないアミノ酸を使用する tRNA および tRNA シンセターゼの生成方法は、例えば、米国特許出願公開第 2003/0082575 号（出願番号 10/126,927）および同第 2003/0108885 号（出願番号 10/126,931）（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。これらの方法は、この翻訳系に対して内在性の（従って、時として「直交性」と呼ばれる）シンセターゼおよび tRNA の、独立して機能する翻訳機構の生成を含む。典型的に、この翻訳系は、直交性 tRNA (O-tRNA) および直交性アミノアシル tRNA シンセターゼ (O-RS) を含む。典型的に、O-RS は、この翻訳系に少なくとも 1 つの非天然発生アミノ酸を有する O-tRNA を優先的にアミノアシル化し、この O-tRNA が、この系内の他の tRNA によって認識されない少なくとも 1 つのセレクターコドンを認識する。従って、この翻訳系は、コードされたセレクターコドンに応答して、この系内で生産されたタンパク質に天然にはコードされないアミノ酸を挿入し、この結果、このコードされたポリペプチド内の一定の位置にアミノ酸を置換する。

## 【0245】

ポリペプチドへの特定の合成アミノ酸の挿入のための多種多様な直交性 tRNA およびアミノアシル tRNA シンセターゼが、当該技術分野において説明されており、一般に、本発明での使用に適する。例えば、ケト特異的 O-tRNA / アミノアシル-tRNA シンセターゼは、Wang, L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 56 - 61 (2003) および Zhang, Z. ら、Biochem. 42 (22): 6735 - 6746 (2003) に記載されている。典型的な O-RS またはこの部

分は、ポリヌクレオチド配列によりコードされ、ならびに米国特許出願公開第2003/0082575号および同第2003/0108885号（これらは、各々、本明細書に参照により組み込まれている）に開示されているアミノ酸配列を含む。O-RSと共に使用するための対応するO-tRNAも、米国特許出願公開第2003/0082575号（出願番号10/126, 927）および同第2003/0108885号（出願番号10/126, 931）（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）に開示されている。

#### 【0246】

アジド特異的O-tRNA／アミノアシル-tRNAシンセターゼ系の一例は、Chin, J.W.ら、J.Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002)に記載されている。p-アジド-L-PheのO-RS配列の具体例としては、米国特許出願公開第2003/0108885号（出願番号10/126, 931）（これは、本明細書に参照により組み込まれている）に開示されているようなヌクレオチド配列 配列番号14-16および29-32ならびにアミノ酸配列 配列番号46-48および61-64が挙げられるが、これらに限定されない。本発明での使用に適するO-tRNAの具体例としては、米国特許出願公開第2003/0108885号（出願番号10/126, 931）（これは、本明細書に参照により組み込まれている）に開示されているようなヌクレオチド配列、配列番号1-3が挙げられるが、これらに限定されない。特定の天然にはコードされないアミノ酸に対して特異的なO-tRNA／アミノアシル-tRNAシンセターゼの他の例は、米国特許出願公開第2003/0082575号（出願番号10/126, 927）（これは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。S.セレビジエにおいてケト含有アミノ酸とアジド含有アミノ酸の両方を組み込むO-RSおよび-tRNAが、Chin, J.W.ら、Science 301:964-967(2003)に記載されている。

#### 【0247】

O-tRNA／アミノアシル-tRNAシンセターゼの使用は、天然にはコードされないアミノ酸をコードする特定のコドンの分泌を伴う。いずれのコドンを使用してもよいが、O-tRNA／アミノアシル-tRNAシンセターゼが発現される細胞ではめったにまたは絶対に使用されないコドンを選択するのが、一般に望ましい。例えば、コドンの具体例としては、ナンセンスコドン、例えば停止コドン（アンバー、オーカーおよびオパール）、四塩基またはそれ以上の塩基数のコドン、およびめったにまたは全く使用されない他の天然三塩基コドンが挙げられる。

#### 【0248】

当該技術分野において公知である突然変異誘発法（部位特異的突然変異誘発、カセット突然変異誘発、制限選択突然変異誘発などが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して、特定のセレクターコドン（複数を含む）をhGHポリヌクレオチドコード配列内の適切な部位に導入することができる。

#### 【0249】

天然にはコードされないアミノ酸を組み込むために使用することができるO-RS、O-tRNAおよび直交性O-tRNA/O-RSペアなどのタンパク質合成機構の成分の生成方法は、Wang, L.ら、Science 292:498-500(2001); Chin, J.W.ら、J.Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002); Zhang, Z.ら、Biochemistry 42:6735-6746(2003)に記載されている。天然にはコードされないアミノ酸のインビオ組み込みのための方法および組成物は、米国特許出願公開第2003/0082575号（出願番号10/126, 927）（これは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。生物のインビオ翻訳系において使用するための直交性tRNA-tRNAシンセターゼの選択方法も、米国特許出願公開第2003/0082575号（出願番号10/126, 927）および同第2003/0108885号（出願番号10/126, 931）（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている。

## 【0250】

少なくとも1つの組換え直交性アミノアシル-tRNAシンセターゼ(O-RS)を生産する方法は、(a)原核生物、例えばメタノコッカス・ヤナシイ、メタロバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム属、大腸菌、好熱性硫黄細菌、P.フリオサス、P.ホリコシ、A.ペルニクスもしくはT.サーモフィラスなど、または真核生物をはじめとする(しかし、これらに限定されない)第一生物からの少なくとも1つのアミノアシル-tRNAシンセターゼ(RS)から誘導される(場合によっては突然変異)RSのライブラリの生成；(b)天然にはコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下で直交性tRNA(O-tRNA)をアミノアシル化する膜についてのRS(場合によっては突然変異RS)のライブラリの選択(および/またはスクリーニング)、それによる活性(場合によっては突然変異)RSのプールの提供；および/または(c)天然にはコードされないアミノ酸の存在下でO-tRNAを優先的にアミノアシル化する活性RS(突然変異を含むが、これに限定されない)についての前記プールの選択(場合によってはネガティブ選択によるもの)、それによる少なくとも1つの組換えO-RSの提供を含み、この場合、少なくとも1つの組換えO-RSが、O-tRNAを天然にはコードされないアミノ酸で優先的にアミノアシル化する。

10

## 【0251】

一つの実施態様において、前記RSは、不活性RSである。この不活性RSは、活性RSを突然変異により生じさせることができる。例えば、この不活性RSは、少なくとも約1、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、もしくは少なくとも約10またはそれ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸(アラニンを含むが、これに限定されない)に突然変異させることによって生じさせることができる。

20

## 【0252】

突然変異RSのライブラリは、タンパク質三次元RS構造に基づく合理的設計、または無作為もしくは合理的設計法でのRSスクレオチドの突然変異誘発をはじめとする(しかし、これらに限定されない)当該技術分野において公知である様々な技法を使用して生じさせることができる。例えば、突然変異RSは、部位特異的突然変異、ランダム突然変異、多様性発生性組換え突然変異、キメラ構築、合理的設計により、または本明細書に記載のもしくは当該技術分野において公知である他の方法により生じさせることができる。

30

## 【0253】

一つの実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下で直交性rRN B(O-tRNA)をアシル化する(これを含むが、これに限定されない)、活性である膜についてのRS(場合によっては突然変異RS)のライブラリの選択(および/またはスクリーニング)は、ポジティブ選択またはスクリーニングマーカー(抗生素質耐性遺伝子を含むが、これに限定されない)および(場合によっては突然変異)RSのライブラリの多数の細胞への導入[この場合、前記ポジティブ選択および/またはスクリーニングマーカーは、アンバー、オーカーまたはオパールコドンをはじめとする(しかし、これらに限定されない)少なくとも1つのセレクターコドンを含む]；選択剤の存在下での前記多数の細胞の成長；ポジティブ選択またはスクリーニングマーカー内の少なくとも1つのセレクターコドンの抑制による前記選択および/またはスクリーニング剤の存在下で生存する(または特異的応答を示す)細胞の同定、それによる活性(場合によっては突然変異)RSのプールを含有するポジティブ選択された細胞のサブセットの提供を含む。場合により、前記選択および/またはスクリーニング剤濃度を変化させることができる。

40

## 【0254】

一つの側面において、前記ポジティブ選択マーカーは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子であり、前記セレクターコドンは、このCAT遺伝子内のランバー停止コドンである。場合により、前記ポジティブ選択マーカーは、-ラクタマーゼ遺伝子であり、前記セレクターコドンは、この-ラクタマーゼ遺伝子内のアンバー停止コドンである。もう一つの側面において、前記ポジティブスクリーニングマ-

50

マークは、蛍光もしくは発光スクリーニングマーカーまたは親和性に基づくスクリーニングマーカー（細胞表面マーカーを含むが、これに限定されない）を含む。

#### 【0255】

一つの実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸の存在下でO-tRNAを優先的にアミノアシル化する活性RS（場合によっては突然変異体）についてのネガティブ選択またはスクリーニングは、ポジティブ選択もしくはスクリーニングまたはこのポジティブ選択もしくはスクリーニングからの活性（場合によっては突然変異）RSのプールの、第二の生物の多数の細胞への導入 [この場合、前記ネガティブ選択またはスクリーニングマーカーは、少なくとも1つのセレクターコドン（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子を含むが、これに限定されない）抗生物質耐性遺伝子を含むが、これに限定されない]；ならびに天然にはコードされないアミノ酸およびスクリーニングまたは選択剤を補足した第一の培地内で生存するか、特異的スクリーニング応答を示すが、この天然にはコードされないアミノ酸および選択またはスクリーニング剤を補足していない第二の培地内では生存することまたは特異的応答を示すことができない細胞の同定、それによる、少なくとも1つの組換えO-RSを有する生存細胞または被スクリーニング細胞の提供を含む。例えば、CAT同定プロトコルは、適切なO-RSの組換え体を決定する際、ポジティブ選択および/またはネガティブスクリーニングとしての機能を場合によっては果たす。例えば、クローンのプールは、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を有するまたは有さないCAT（少なくとも1つのセレクターコドンを含むもの）を収容している増殖プレートを用いて場合により複製される。従って、天然にはコードされないアミノ酸を収容している前記プレートでの排他的に成長するコロニーは、組換えO-RSを含有すると見なされる。一つの側面では、前記選択（および/またはスクリーニング）剤の濃度を変化させる。一部の側面では、前記第一生物と第二生物は異なる。例えば、前記第一および/または第二生物は、原核生物、真核生物、哺乳動物、大腸菌、真菌、酵母、古細菌、ユーバクテリウム、植物、昆虫、原生生物などを場合により含む。他の実施態様において、前記スクリーニングマーカーは、蛍光もしくは発光スクリーニングマーカーまたは親和性に基づくスクリーニングマーカーを含む。10

#### 【0256】

もう一つの実施態様において、活性（場合によっては突然変異）RSのプールについてのスクリーニングまたは選択（ネガティブ選択を含むが、これに限定されない）は、ポジティブ選択段階（b）からの活性突然変異RSのプールの単離；ネガティブ選択またはスクリーニングマーカー（この場合のネガティブまたはスクリーニングマーカーは、少なくとも1つのセレクターコドンを含み、このセレクターコドンとしては、少なくとも1つのセレクターコドンを含む毒性マーカー遺伝子が挙げられるが、これに限定されず、この毒性マーカー遺伝子としては、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子が挙げられるが、これに限定されない）および活性（場合によっては突然変異）RSのプールの、第二の生物の多数の細胞への導入；ならびに天然にはコードされないアミノ酸を補足していない第一倍地内で生存するか、特異的スクリーニング応答を示すが、天然にはコードされないアミノ酸を補足した第二倍地内では生存することおよび特異的スクリーニング応答を示すことができない細胞の同定、それによる、少なくとも1つの組換えO-RSを有する生存または被スクリーニング細胞の提供を含み、この場合の少なくとも1つの組換えO-RSは、前記天然にはコードされないアミノ酸に対して特異的である。一つの側面において、前記少なくとも1つのセレクターコドンは、約2またはそれ以上のセレクターコドンを含む。こうした実施態様としては、少なくとも1つのセレクターコドンが、2つまたはそれ以上のセレクターコドンを含む実施態様、および第一生物と第二生物が異なる（各生物としては、原核生物、真核生物、哺乳動物、大腸菌、真菌、酵母、古細菌、ユーバクテリウム、植物、昆虫、原生生物などが場合によっては挙げられるが、これらに限定されない）実施態様を、場合により挙げることができる。また、一部の側面としては、ネガティブ選択マーカーが、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子（少なくとも1つのセレクターコドンを有するもの）を含むものが挙げられる。他の側面としては、前記スクリーニングマーカーが、蛍204050

光もしくは発光スクリーニングマーカーまたは親和性に基づくスクリーニングマーカーを場合により含むものを挙げることができる。ここでの実施態様における前記スクリーニングおよび／または選択は、スクリーニングおよび／または選択ストリンジエンシーの変動を場合によっては含む。

#### 【0257】

一つの実施態様において、少なくとも1つの組換え直交性アミノアシル-tRNAシンセターゼ(O-RS)を生産するための方法は、(d)少なくとも1つの組換えO-RSの単離；(e)この少なくとも1つの組換えO-RSから誘導されるO-RS(場合によっては突然変異したもの)の第二のセットの生成；および(f)O-tRNAを優先的にアミノアシル化する能力を含む突然変異O-RSが得られるまで、段階(b)および(c)の反復をさらに含む。場合により、少なくとも約2回(これを含むが、これに限定されない)、段階(d)から(f)を反復する。一つの側面において、前記少なくとも1つの組換えO-RSから誘導され突然変異O-RSの第二セットは、ランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、組換えまたはこれらの組合せをはじめとする(しかし、これらに限定されない)突然変異誘発により生じさせることができる。

10

#### 【0258】

上記方法における、ポジティブ選択／スクリーニング段階(b)、ネガティブ選択／スクリーニング段階(c)またはポジティブおよびネガティブ選択／スクリーニング段階(b)および(c)の両方をはじめとする(しかし、これらに限定されない)選択／スクリーニング段階のストリンジエンシーは、この選択／スクリーニングストリンジエンシーの変更を場合によっては含む。もう一つの実施態様において、ポジティブ選択／スクリーニング段階(b)、ネガティブ選択／スクリーニング段階(c)またはポジティブおよびネガティブ選択／スクリーニング段階(b)および(c)の両方が、レポータの使用を含み、この場合、レポータは、蛍光活性化細胞解析分離(FACS)により検出され、または発光により検出される。場合により、このレポータは、ファージディスプレイなどを用いて細胞表面上に提示され、天然にはコードされないアミノ酸または類似体に関わる親和性または触媒活性を基に選択される。一つの実施態様において、前記突然変異シンセターゼは、ファージディスプレイなどを用いて細胞表面上に提示される。

20

#### 【0259】

組換え直交性tRNA(O-tRNA)の生産方法は、(a)第一生物からの、サプレッサtRNAをはじめとする(しかし、これに限定されない)少なくとも1つのtRNAから誘導される突然変異tRNAのライプラリの生成；(b)第一生物からのRSの不在下、第二生物からのアミノアシル-tRNAシンセターゼ(RS)によりアミノアシル化される(場合によっては突然変異)tRNAについての前記ライプラリの選択(ネガティブ選択を含むが、これに限定されない)またはスクリーニング、それによるtRNA(場合によっては突然変異体)のプールの提供；および(c)導入された直交性RS(O-RS)によりアミノアシル化されるメンバーについてのこのtRNA(場合によっては突然変異体)のプールの選択またはスクリーニング、それによる少なくとも1つの組換えO-tRNAの提供を含み、この場合、前記少なくとも1つの組換えO-tRNAは、セレクターコドンを認識するが、第二生物からのRSによって効率的に認識されず、ならびにO-RSにより優先的にアミノアシル化される。一部の実施態様において、前記少なくとも1つのtRNAは、サプレッサtRNAであり、ならびに/または天然および/もしくは非天然塩基のユニークな三塩基コドンを含むか、ナンセンスコドン、レアコドン、非天然コドン、少なくとも4つの塩基を含むコドン、アンバーコドン、オーカーコドンまたはオパール停止コドンである。一つの実施態様において、前記組換えO-tRNAは、直交性の改善を有する。一部の実施態様において、O-tRNAが、修飾を必要とせずに第二生物から第一生物に場合により移入されることは、理解されるであろう。様々な実施態様において、前記第一および第二生物は、同じであるか、異なり、ならびに原核生物(メタノコッカス・ヤナシイ、メタロバクテリウム・サーモオートトロフィカム、大腸菌、ハロバクテリウム属などを含むが、これらに限定されない)、真核生物、哺乳動物、真菌、酵母

30

40

50

、古細菌、真性細菌、植物、昆虫、原生生物など（これらを含むが、これらに限定されない）から場合により選択される。加えて、前記組換えtRNAは、天然にはコードされないアミノ酸によって場合によりアミノアシル化され、この場合の天然にはコードされないアミノ酸は、天然に、または遺伝子操作により、インビボで生合成される。この天然にはコードされないアミノ酸は、少なくとも第一または第二生物のための成長培地に場合により添加される。

## 【0260】

一つの側面において、アミノアシル-tRNAシンセターゼによりアミノアシル化される（場合によっては突然変異）tRNAについての前記ライプラリの選択（ネガティブ選択を含むが、これに限定されない）またはスクリーニング（段階（b））は、第二生物からの多数の細胞への毒性マーカー遺伝子および（場合によっては突然変異）tRNAのライプラリの導入 [ この場合、前記毒性マーカー遺伝子は、セレクターコドン（または毒性剤もしくは抑制剤の生産を導く細胞、もしくはこうしたマーカー遺伝子が少なくとも1つのセレクターコドンを含む生物に不可欠な遺伝子）の少なくとも1つを含む ] ; および生存細胞の選択 [ この場合、前記生存細胞は、少なくとも1つの直交性tRNAまたは非機能性tRNAを含む（場合によっては突然変異）tRNAのプールを含有する ] を含む。例えば、生存細胞は、細胞密度比率比較アッセイ ( comparison ratio cell density assay ) を使用することにより選択することができる。

## 【0261】

もう一つの側面において、前記毒性マーカー遺伝子は、2つまたはそれ以上のセレクターコドンを含むことができる。これらの方法のもう一つの実施態様において、前記毒性マーカー遺伝子は、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子であり、このリボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は、少なくとも1つのアンバーコドンを含む。場合により、前記リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は、2つまたはそれ以上のアンバーコドンを含むことができる。

## 【0262】

一つの実施態様において、導入された直交性RS (O-RS) によりアミノアシル化されるメンバーについての前記（場合によっては突然変異）tRNAのプールの選択またはスクリーニングは、第二生物からの多数の細胞への、O-RSおよび（場合によっては突然変異）tRNAのプールと、ポジティブ選択もしくはスクリーニングマーカー遺伝子または毒性剤の解毒を導く遺伝子の導入 [ この場合、前記ポジティブマーカー遺伝子は、薬物耐性遺伝子（セレクターコドンのうちの少なくとも1つ、例えば少なくとも1つのアンバー停止コドンを含む - ラクタマーゼ遺伝子を含むが、これに限定されない）またはこの生物に不可欠な遺伝子を含む ] ; ならびに抗生物質をはじめとする（しかし、これに限定されない）選択またはスクリーニング剤の存在下で成長した生存細胞または被スクリーニング細胞の同定、それによる少なくとも1つの組換えtRNAを処理する細胞のプールの提供を含み、この場合の少なくとも1つの組換えtRNAは、O-RSによりアミノアシル化され、ならびに少なくとも1つのセレクターコドンに応答してアミノ酸をポジティブマーカー遺伝子によりコードされる翻訳産物に挿入する。もう一つの実施態様では、前記選択および / またはスクリーニング剤の濃度を変化させる。

## 【0263】

特異的O-tRNA/O-RSペアの生成方法を提供する。これらの方法は、(a) 第一生物からの少なくとも1つのtRNAから誘導される突然変異tRNAのライプラリの生成；(b) 第二生物からのアミノアシル-tRNAシンセターゼ (RS) により、第一生物からのRS不在下でアミノアシル化される（場合によっては突然変異）tRNAについて前記のライプラリのネガティブ選択またはスクリーニング、それによる（場合によっては突然変異）tRNAのプールの提供；(c) 導入された直交性RS (O-RS) によりアミノアシル化されるメンバーについての前記（場合によっては突然変異）tRNAのプールの選択またはスクリーニング、それによる少なくとも1つのO-tRNAの提供を含む。前記少なくとも1つの組換えO-tRNAは、セレクターコドンを認識し、第二生物からのRSにより効率的に認識されず、およびO-RSにより優先的にアミノアシル化

10

20

30

40

50

される。前記方法は、(d) 第三生物からの少なくとも1つのアミノアシル-tRNAシンセターゼ(RS)から誘導される(場合によっては突然変異)RSのライプラリの生成;(e) 天然にはコードされないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下で少なくとも1つの組換えO-tRNAを優先的にアミノアシル化するメンバーについての前記突然変異RSのライブル来の選択またはスクリーニング、それによる活性(場合によっては突然変異)RSのプールの提供;ならびに(f) 天然にはコードされないアミノ酸不在下で少なくとも1つの組換えO-rRNAを優先的にアミノアシル化する活性(場合によっては突然変異)RSについての前記プールのネガティブ選択またはスクリーニング、それによる少なくとも1つの特異的O-rRNA/O-RSペアの提供も含み、この場合、前記少なくとも1つの特異的O-rRNA/O-RSペアは、天然にはコードされないアミノ酸に対して特異的である少なくとも1つの組換えO-RSおよび少なくとも1つの組換えO-tRNAを含む。これらの方法により生産される特異的O-tRNA/O-RSを包含する。例えば、前記特異的O-rRNA/O-RSペアとしては、mut tRNA Tyr - mut tTyr RSペア、例えば、amut tRNA Tyr - SS12Tyr RSペア、mut tRNA Leu - mut Leu R mut tRNA Thr - mut Thr RSペア、mut tRNA Glu - mut Glu RSペアなど(これらを含むが、これらに限定されない)を挙げることができる。さらに、こうした方法は、第一生物と第三生物が同じである(メタノコッカス・ヤナシイを含むが、これに限定されない)場合を含む。

## 【0264】

第二生物のインビオ翻訳系で使用するための直交性tRNA-tRNAシンセターゼの選択方法も、本発明に包含される。これらの方法は、第二生物からの細胞の第一セットへの、第一生物から単離または誘導されたマーカー遺伝子、tRNAおよびアミノアシル-tRNAシンセターゼ(RS)の導入;第二生物からの二重重複細胞セットへの前記マーカー遺伝子およびtRNAの導入;ならびに前記二重重複細胞セットにおいて生存することができない第一セット内の生存細胞についての選択、または前記二重重複細胞セットでは与えることができない特異的スクリーニング応答を示す細胞についてのスクリーニングを含み、この場合、前記第一セットおよびこの二重重複細胞セットは、選択またはスクリーニング剤の存在下で成長させ、前記生存または被スクリーニング細胞は、第二生物のインビオ翻訳系において使用するための直交性tRNA-tRNAシンセターゼペアを含む。一つの実施態様において、比較および選択またはスクリーニングは、インビオ相補性アッセイを含む。前記選択またはスクリーニング剤の濃度は、変化させることができる。

## 【0265】

本発明の生物は、様々な生物および様々な組合せを含む。例えば、本発明の方法の第一および第二生物は、同じであってもよいし、異なっていてもよい。一つの実施態様において、前記生物は、場合により、メタノコッカス・ヤナシイ、メタロバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム属、大腸菌、好熱性硫黄細菌、P.フリオサス、P.ホリコシ、A.ペルニクスもしくはT.サーモフィラスなどをはじめとする(しかし、これらに限定されない)真核生物である。また、前記生物は、植物(单子葉植物または双子葉植物などの複雑型植物を含むが、これらに限定されない)、藻類、原生生物、真菌(酵母などを含むが、これらに限定されない)または動物(哺乳動物、昆虫、節足動物などを含むが、これらに限定されない)などをはじめとする(しかし、これらに限定されない)真核生物を場合により含む。もう一つの実施態様において、前記第二生物は、メタノコッカス・ヤナシイ、メタロバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム属、大腸菌、好熱性硫黄細菌、ハロバクテリウム属、P.フリオサス、P.ホリコシ、A.ペルニクスまたはT.サーモフィラスなどをはじめとする(しかし、これらに限定されない)原核生物である。また、第二生物は、酵母、動物細胞、植物細胞、真菌または哺乳動物細胞などをはじめとする(しかし、これらに限定されない)真核生物であり得る。様々な実施態様において、前記第一生物と第二生物は異なる。

## 【0266】

VISHGHポリペプチドにおける自然には発生しないアミノ酸の位置

10

20

30

40

50

本発明は、hGHポリペプチドへの1つ以上の自然には発生しないアミノ酸の組み込みを考えている。1つ以上の自然には発生しないアミノ酸は、前記ポリペプチドの活性を破壊しない特定の位置に組み込むことができる。これは、疎水性アミノ酸での疎水性アミノ酸の置換、バルキーなアミノ酸でのバルキーなアミノ酸の置換、親水性アミノ酸での親水性アミノ酸の置換をはじめとする（しかし、これらに限定されない）「保存的」置換および／または活性に必要とされない位置での自然には発生しないアミノ酸の挿入を行うことによって達成することができる。

#### 【0267】

hGHの領域は、次のように説明することができる（この場合、hGHにおけるアミノ酸位置を真ん中の列に示す（配列番号2））：

10

#### 【0268】

##### 【表3】

ヘリックスA [1-5] - [6-33] - N-末端	ヘリックスB [34-74] - A-Bループ	ヘリックスC [75-96] - B-Cループ	ヘリックスD [97-105] - [106-129] - [130-153] - [154-183] - [184-191] C-Dループ C-末端
---------------------------------	----------------------------	----------------------------	---

#### 【0269】

様々な生物学的および構造的アプローチを利用して、hGHポリペプチド内の天然にはコードされないアミノ酸での置換に望ましい部位を選択することができる。ポリペプチド鎖のいずれの位置も、天然にはコードされないアミノ酸を組み込むための選択に適すること、および選択が、合理的設計に基づくものであってもよいし、いずれかの所望される目的のためのまたは特にこれといって所望される目的がないランダム選択によるものであってもよいことは、通常の当業者には容易にわかる。所望の部位の選択は、作動薬、超作動薬、逆作動薬、拮抗薬、受容体結合調節因子、二量体もしくは多量体形成、天然分子と比較して変わらない活性もしくは特性をはじめとする（しかし、これらに限定されない）いずれいかの所望の特性または活性を有するhGHポリペプチド分子を生産するため、または溶解度凝集もしくは安定性などのこのポリペプチドのいずれかの物理的もしくは化学的特性を操作するためのものであり得る。例えば、hGHポリペプチドの生物活性に必要とされるこのポリペプチド内の位置は、当該技術分野において公知であるアラニンスキャニング法または相同スキャニング法を使用して特定することができる。例えば、Cunningham, B. およびWells, J., Science, 244: 1081-1085 (1989) (hGH生体活性にとって重要な14残基の特定) およびCunningham, B. ら、Science 243: 1330-1336 (1989) (相同スキャニング突然変異誘発を使用する抗体および受容体エピトープの特定) 参照。アラニンまたは相同スキャニング突然変異誘発により生物活性に重要なものとして特定されたもの以外の残基は、このポリペプチドに要求される所望の活性に依存して、天然にはコードされないアミノ酸での置換の良好な候補となり得る。また、生物活性に重要であると特定された部位も、またこのポリペプチドに要求される所望の活性に依存して、天然にはコードされないアミノ酸での置換の良好な候補となり得る。もう一つの代替は、このポリペプチド鎖上の各位置において天然にはコードされないアミノ酸での系列置換を単純に行い、このポリペプチドの活性に対する効果を観察することであろう。天然でないアミノ酸でのいずれかのポリペプチドを置換する位置を選択するためのあらゆる手段、技法または方法が、本発明での使用に適することは、通常の当業者には容易にわかる。

20

#### 【0270】

欠失を有するhGHポリペプチドの自然発生突然変異体の構造および活性を検査して、天然にはコードされないアミノ酸での置換に対して寛容である可能性が高いタンパク質の領域を決定することもできる。例えば、hGHについては、Kostyola、Biocheim. Biophys. Acta, 925: 314 (1987); Lewis, U. ら、J. Biol. Chem., 253: 2679-2687 (1978) 参照。同様の手法で、プロテアーゼ消化およびモノクローナル抗体を使用して、hGH受容体への結合の責

30

40

50

任を負うhGHの領域を特定することができる。例えば、Cunningham, B. ら、Science, 243: 1330 - 1336 (1989); Mills, J. ら、Endocrinology, 107: 391 - 399 (1980); Li, C., Mol. Cell. Biochem., 46: 31 - 41 (1982) (残基134から149の間のアミノ酸は、活性を喪失することなく欠失させることができるこを指摘) 参照。天然にはコードされないアミノ酸での置換に寛容である可能性が高い残基を削除したら、残りの位置の各々での提案された置換の影響をhGHおよびこの結合タンパク質の三次元結晶構造から調査することができる。例えば、hGHについては、de Vos, A. ら、Science, 255: 306 - 312 (1992) 参照; hGHのすべての結晶構造は、the Protein Data Bank (3HHR, 1AXI、および1HWGを含む) (PDB; the World Wide Webのrcsb.orgで利用可能)、タンパク質および核酸の巨大分子の三次元構造データを含む集中データベース、において入手できる。従って、当業者は、天然にはコードされないアミノ酸で置換することができるアミノ酸位置を容易に特定することができる。

## 【0271】

一部の実施態様において、本発明のhGHポリペプチドは、このポリペプチドのヘリックスまたはペータシート二次構造を破壊しないタンパク質の領域内に位置する1つ以上の天然には発生しないアミノ酸を含む。

## 【0272】

天然にはコードされないアミノ酸の組み込みの典型的な残基は、潜在的受容体結合部位 (Site IおよびSite IIを含むが、これらに限定されない) から除外されるもの、溶媒に完全に露出されていることがある、もしくは部分的に溶媒に露出していることがあるもの、近接残基と最少の水素結合相互作用を有するか、近接残基との水素結合相互作用を有さないもの、近接反応性残基に最小限、露出されていることがあるもの、ならびにhGHポリペプチドとこの受容体の三次元結晶構造により予測して非常に可撓性である領域 (C-Dループを含むが、これに限定されない) 内または構造的に硬い領域 (Bヘリックスを含むが、これに限定されない) 内にあり得るものであり得る。

## 【0273】

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、hGHにおける二次構造に対応する次の領域の1つ以上におけるいずれかの位置に組み込まれる: 配列番号2からの、1 - 5 (N末端)、6 - 33 (Aヘリックス)、34 - 74 (AヘリックスとBヘリックスの間の領域、A-Bループ)、75 - 96 (Bヘリックス)、97 - 105 (BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B-Cループ)、106 - 129 (Cヘリックス)、130 - 153 (CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C-Dループ)、154 - 183 (Dヘリックス)、184 - 191 (C-末端)。他の実施態様において、hGHポリペプチドは、N末端 (1 - 5)、A-BループのN末端 (32 - 46)、B-Cループ (97 - 105)、C-Dループ (132 - 149)、およびC末端 (184 - 191) から成る群より選択されるhGHの少なくとも1つの領域内に位置する少なくとも1つのアミノ酸を置換する少なくとも1つの自然には発生しないアミノ酸を含む。

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、次のhGH位置の1つ以上の位置に組み込まれる: 位置1の前 (すなわち、N末端位置)、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、18

10

20

30

40

50

3、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、このタンパク質のカルボキシ末端位置）（配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸）。

#### 【0274】

1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みの典型的な部位としては、配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、144、145、147、154、155、156、159、183、186、および187またはこれらのあらゆる組合せが挙げられる。10

#### 【0275】

1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みのための典型的な部位のサブセットとしては、配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの、29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186、および187、またはこれらのあらゆる組合せが挙げられる。20 hGHおよびhGHのhGH受容体との相互作用の結晶構造の調査は、これらのアミノ酸残基の側鎖が、溶媒に完全にまたは部分的に近接でき、天然にはコードされないアミノ酸の側鎖が、このタンパク質表面から離れる方向に向き、溶媒の中を指し得ることを示している。

#### 【0276】

1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みのための典型的な位置としては、配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、131、133、134、135、136、139、140、143、145、および155またはこれらのあらゆる組合せが挙げられる。30 hGHおよびhGHのhGH受容体との相互作用の結晶構造の調査は、これらのアミノ酸残基の側鎖が、溶媒に完全に露出されており、この天然残基の側鎖が、溶媒の中を指していることを示している。

#### 【0277】

1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みのための典型的な部位のサブセットとしては、配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの、30、74、103、またはこれらのあらゆる組合せが挙げられる。1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みのための典型的な部位のもう1つのサブセットとしては、配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸からの、35、92、143、145、またはこれらのあらゆる組合せが挙げられる。

#### 【0278】

一部の実施態様において、これらの位置：位置1の前（すなわち、N末端位置）、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、このタンパク質のカルボキシリ末端）（配列番号2、または配列番号1もしく40  
50

は3の対応するアミノ酸) (これらを含むが、これらに限定されない) の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施態様において、これらの位置: 30、35、74、92、103、143、145 (配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸) の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。一部の実施態様において、これらの位置: 35、92、143、145 (配列番号2、または配列番号1もしくは3の対応するアミノ酸) の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結される。

## 【0279】

ヒトG H拮抗薬としては、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、および127での置換もしくは位置1(すなわち、N末端)での付加、またはこれらのあらゆる組合せ(配列番号2、または配列番号1、3もしくは他のいずれかのG H配列の対応するアミノ酸)を有するものが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0280】

多種多様な天然にはコードされないアミノ酸でh G Hポリペプチドにおける所定の位置を置換することができ、またはこれらのアミノ酸をh G Hポリペプチドにおける所定の位置に組み込むことができる。一般に、h G Hポリペプチドとこの受容体の三次元結晶構造、保存的置換(すなわち、Ph e、Tr yまたはTr pについてのp - アセチルフェニルアラニンまたはO - プロパルギルチロシンなどのアリール系の天然にはコードされないアミノ酸の置換)の嗜好性、およびh G Hポリペプチドへの導入(例えば、アルキン部分有する水溶性ポリマーとのHu is g en [3+2]付加環化、またはアリールエステルを有し、このエステルがまたホスフィン部分を組み込む水溶性ポリマーとのアミド結合形成を行うことが望まれる場合の、4 - アジドフェニルアラニンの導入)が望まれる特異的コンジュゲーション化学の調査を基に、特定の天然にはコードされないアミノ酸を組み込みのために選択する。

## 【0281】

一つ実施態様において、この方法は、タンパク質への非天然アミノ酸の導入(この場合、前記非天然アミノ酸は、第一反応性基を含む)；および前記タンパク質と第二の反応性基を含む分子(ラベル、色素、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、細胞毒性化合物、薬物、親和性ラベル、光親和性ラベル、反応性化合物、樹脂、第二のタンパク質もしくはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体フラグメント、金属キレート化剤、補助因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、抑制リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピルラベル、蛍光体、金属含有部分、放射性部分、新規官能基、他の分子と共有結合性もしくは非共有結合性相互作用する基、光ケージド部分、光異性化性部分、ビオチン、ビオチンの誘導体、ビオチンの誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込む部分、化学分解性の基、光分解性の基、延長側鎖、炭素結合型糖、レドックス活性因子、アミノチオ酸、毒性部分、アイソトープ標識部分、生物物理学的プローブ、リン光性の基、化学発光性の基、高電子密度の基、磁性を有する基、介在基、発色団、エネルギー変換因子、生物活性因子、検出可能ラベル、小分子、または上記のあらゆる組合せ、または他のいずれかの望ましい化合物もしくは物質を含むが、これらに限定されない)との接触をさらに含む。前記第一反応性基は、第二反応性基と反応して、この分子を[3+2]付加環化により非天然アミノ酸に取り付ける。1つの実施態様において、前記第一反応性基は、アルキニルまたはアジド部分であり、前記第二反応性基は、アジドまたはアルキニル部分である。例えば、前記第一反応性基は、アルキニル部分(非天然アミノ酸p - プロパルギルオキシフェニルアラニンを含むが、これに限定されない)であり、前記第二反応性基は、アジド部分である。もう1つの例では、前記第一反応性基が、アジド部分(非天然アミノ酸p - アジド-L - フェニルアラニンを含むが、これに限定されない)であり、前記第二反応性基が、アルキニル部分である。

## 【0282】

10

20

30

40

50

場合によっては、天然にはコードされないアミノ酸置換基（複数を含む）は、hGHポリペプチドにおける他の付加、置換または欠失と組み合わさって、このhGHポリペプチドの他の生物学的特性に影響を及ぼすこととなる。場合によっては、前記他の付加、置換または欠失が、hGHポリペプチドの安定性（タンパク質溶解性分解に対する耐性を含むが、これに限定されない）を増大させる、またはhGHポリペプチドのこの受容体に対する親和性を増大させることがある。一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、配列番号2におけるF10A、F10H、F10I；M14W、M14Q、M14G；H18D；H21N；G120A；R167N；D171S；E174S；F176Y、I179Tまたはこれらのあらゆる組合せから成る群より選択されるアミノ酸置換を含む。場合によっては、前記他の付加、置換または欠失が、hGHポリペプチドの溶解性（大腸菌または他の宿主細胞において発現されたときのものを含むが、これらに限定されない）を増大させることがある。一部の実施態様において、付加、置換または欠失が、大腸菌組換え宿主細胞での発現後にこのポリペプチドの溶解性を増大させることがある。一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、アミノ酸置換G120Aを含む。この置換を含むhGHポリペプチドは、作動薬活性を保持し、ならびに宿主細胞における発現レベルを保持または改善する。一部の実施態様において、大腸菌組換え宿主細胞での発現後にこのポリペプチドの溶解性を増大させることとなる天然でないアミノ酸の組み込みのためのもう1つの部位に加えて、天然にコードされるアミノ酸または天然でないアミノ酸での置換のための部位が選択される。一部の実施態様において、hGHポリペプチドは、hGHポリペプチド受容体に対する親和性を調節する、受容体二量体化を調節（増加または減少を含むが、これらに限定されない）する、受容体二量体化を安定させる、循環半減期を調節する、放出もしくはバイオアベイラビリティを調節する、精製を助長する、または特定の投与経路を改善または変更する、別の付加、置換または欠失を含む。例えば、本明細書に記載の1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の導入に加えて、hGH変異体のこの受容体に対する親和性を増大させるために、以下の置換のうちの1つ以上が導入される：F10A、F10HまたはF10I；M14W、M14Q、またはM14G；H18D；H21N；R167N；D171S；E174S；F176YおよびI179T。同様に、hGHポリペプチドは、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合ドメイン（FLAGまたはポリHisを含むが、これらに限定されない）もしくは他の親和性に基づく配列（FLAG、ポリHis、GSTなどを含むが、これらに限定されない）、またはこのポリペプチドの欠失（GFPを含むが、これに限定されない）、精製もしくは他の特性を改善する連結分子（ビオチンを含むが、これに限定されない）を含むことができる。

### 【0283】

一部の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸の置換は、hGH拮抗薬を生じさせる。1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みのための典型的な部位のサブセットとしては、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、127、または位置1の前の付加（配列番号2、または配列番号1、3もしくは他のいずれかのGH配列の対応するアミノ酸）が挙げられる。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、GHを拮抗薬として作用させる領域1-5（N末端）、6-33（Aヘリックス）、34-74（AヘリックスとBヘリックスの間の領域、A-Bループ）、75-96（Bヘリックス）、97-105（BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B-Cループ）、106-129（Cヘリックス）、130-153（CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C-Dループ）、154-183（Dヘリックス）、184-191（C末端）における少なくとも1つの置換を含む。他の実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸の組み込み部位の具体例としては、ヘリックスAのアミノ末端領域およびヘリックスCの一部の中の残基が挙げられる。もう1つの実施態様では、p-アジド-L-フェニルアラニンまたはO-プロパルギル-L-チロシンなどの天然にはコードされないアミノ酸でのG120の置換。他の実施態様では、上に挙げた置換基を、hGHポリペプチドがhGH拮抗薬になるようにする追加の置換と組み合わせる。例えば、天然にはコ

ードされないアミノ酸が、本明細書において特定されている位置のうちの1つで置換され、同時的置換が、G120（例えば、G120R、G120K、G120W、G120Y、G120F、またはG120E）に導入される。一部の実施態様において、アルギニンが、配列番号2におけるG120を置換する。一部の実施態様において、hGH拮抗薬は、このhGH分子の受容体結合領域内に存在する水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含む。

#### 【0284】

場合によっては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸が、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸で置換される。場合によっては、hGHポリペプチドは、自然発生アミノ酸に対する1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の置換をさらに含む。例えば、一部の実施態様において、hGHの以下の領域内の少なくとも2つの残基が、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸で置換される：1-5（N末端）、32-46（N末端A-Bループの末端）、97-105（B-Cループ）、および132-149（C-Dループ）、および184-191（C末端）。一部の実施態様において、hGHの以下の領域内の少なくとも2つの残基が、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸で置換される：1-5（N末端）、6-33（Aヘリックス）、34-74（AヘリックスとBヘリックスの間の領域、A-Bループ）、75-96（Bヘリックス）、97-105（BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B-Cループ）、106-129（Cヘリックス）、130-153（CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C-Dループ）、154-183（Dヘリックス）、184-191（C末端）。一部の実施態様において、hGHの以下の領域内の少なくとも2つの残基が、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸で置換される：1-9（N末端）、10-21（Aヘリックス）、22-39（AヘリックスとBヘリックスの間の領域）、40-75（Bヘリックス）、76-77（BヘリックスとCヘリックスの間の領域）、78-100（Cヘリックス）、101-110（CヘリックスとDヘリックスの間の領域）、111-132（Dヘリックス）、133-136（DヘリックスとEヘリックスの間の領域）、137-155（Eヘリックス）、156-165（C末端）場合によっては、前記2つまたはそれ以上の天然にはコードされないアミノ酸を、1つ以上の低分子量線状または分枝PEG（質量で約～5から20kDaまたはそれ以下）に連結させ、これにより、単一のより高分子量のPEGに取り付けられた化学種を基準にして結合親和性および匹敵する血清半減期が強化される。

#### 【0285】

一部の実施態様において、hGHの以下の位置の残基のうちの2つ以下が、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸で置換される：29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、183、186、および187。場合によっては、以下の置換ペアのいずれかがなされる：K38X<sup>\*</sup>およびK140X<sup>\*</sup>；K41X<sup>\*</sup>およびK145X<sup>\*</sup>；Y35X<sup>\*</sup>およびE88X<sup>\*</sup>；Y35X<sup>\*</sup>およびF92X<sup>\*</sup>；Y35X<sup>\*</sup>およびY143X<sup>\*</sup>；F92X<sup>\*</sup>およびY143X<sup>\*</sup>（この場合、X<sup>\*</sup>は、天然にはコードされないアミノ酸を表す）。2つまたはそれ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みに好ましい位置としては、以下の残基の組合せが挙げられる：29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186、および187。2つまたはそれ以上の天然にはコードされないアミノ酸の組み込みに特に好ましい部位としては、以下の残基の組合せが挙げられる：35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186、および187。

、 139、 140、 143、 145、 および 155。

**【0286】**

2つまたはそれ以上の天然にはコードされないアミノ酸の hGH における組み込みに好みい部位としては、以下の残基の組合せが挙げられる：配列番号 2 からの、位置 1 の前（すなわち、N 末端位置）、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、このタンパク質のカルボキシル末端位置）またはこれらのあらゆる組合せ。

**【0287】**

VII. 非真核生物および真核生物における発現

クローニングされた hGH ポリヌクレオチドの高レベルの発現を達成するために、一般には、転写を指示する強いプロモータ、転写 / 翻訳ターミネータ、および核酸がタンパク質をコードしている場合には翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含有する発現ベクターに、本発明の hGH ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをサブクローニングする。適する細菌性プロモータは、当該技術分野において周知であり、例えば、Sambrook らおよび Ausubel らに記載されている。

**【0288】**

本発明の hGH ポリペプチドを発現させるために、大腸菌、バチルス属種 (Bacillus spp.) およびサルモネラ菌 (Salmonella) をはじめとする（しかし、これらに限定されない）細菌発現系を利用することができる (Palvaら、Gene 22: 229 - 235 (1983); Mosbachら、Nature 302: 543 - 545 (1983))。こうした発現系のためのキットは、市販されている。哺乳動物細胞、酵母および昆虫細胞についての真核性発現系は、当該技術分野において周知であり、市販もされている。直交性 tRNA およびアミノアシル tRNA シンセターゼ（上で説明したもの）を使用して、本発明の hGH ポリペプチドを発現させる場合、発現のための宿主細胞は、この直交性成分を使用するこれらの能力に基づき選択される。宿主細胞の具体例としては、グラム陽性菌 (B. brevis (B. brevis))、枯草菌 (B. subtilis) またはストレプトミセス属 (Streptomyces) を含むが、これらに限定されない）およびグラム陰性菌（大腸菌、ショードモナス・フルオレッセンス、緑膿菌、ショードモナス・ブチダを含むが、これらに限定されない）、ならびに酵母および他の真核細胞が挙げられる。O-tRNA / O-RS ペアを含む細胞は、本明細書に記載するとおり使用することができる。

**【0289】**

本発明の真核生物宿主細胞または非真核生物宿主細胞は、多く有用な量の非天然アミノ酸を含むタンパク質を合成する能力をもたらす。一つの側面において、本組成物は、非天然アミノ酸を含むタンパク質の少なくとも 10 マイクログラム、少なくとも 50 マイクログラム、少なくとも 75 マイクログラム、少なくとも 100 マイクログラム、少なくとも 200 マイクログラム、少なくとも 250 マイクログラム、少なくとも 500 マイクログラム、少なくとも 1 ミリグラム、少なくとも 10 ミリグラム、少なくとも 100 ミリグラム、少なくとも 1 グラムまたはそれ以上、またはインビボタンパク質生産法（組換えタンパク質生産および精製に関する詳細は、本明細書に提供する）で達成され得る量（これらを含むが、これらに限定されない）を場合により含む。もう一つの側面において、前記タ

ンパク質は、細胞溶解産物、緩衝液、医薬用緩衝液または他の懸濁液 [概して約 1 n L から約 1 0 0 L (を含むが、これらに限定されない) の体積 (を含むが、これに限定されない)] 中、1 リットルあたり少なくとも 1 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 5 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 7 5 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり 1 0 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 2 0 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 2 5 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 5 0 0 マイクログラムのタンパク質、1 リットルあたり少なくとも 1 0 ミリグラムのタンパク質、もしくは 1 リットルあたり少なくとも 1 0 ミリグラムのタンパク質またそれ以上 (を含むが、これらに限定されない) の濃度で組成物中に場合により存在する。少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む真核細胞における大量の他の方法で一般に可能な量より多い量を含むが、これに限定されない) タンパク質の生産 (インビポ翻訳をはじめとする (しかし、これに限定されない) は、本発明の一つの特徴である。

#### 【0290】

本発明の真核宿主細胞または非真核宿主細胞は、多く有用な量の非天然アミノ酸を含むタンパク質を生合成する能力をもたらす。例えば、非天然アミノ酸を含むタンパク質は、細胞抽出物、細胞溶解産物、培地および / または緩衝液などにおいて、少なくとも 1 0  $\mu$  g / リットル、少なくとも 5 0  $\mu$  g / リットル、少なくとも 7 5  $\mu$  g / リットル、少なくとも 1 0 0  $\mu$  g / リットル、少なくとも 2 0 0  $\mu$  g / リットル、少なくとも 2 5 0  $\mu$  g / リットル、または少なくとも 5 0 0  $\mu$  g / リットル、少なくとも 1 mg / リットル、少なくとも 2 mg / リットル、少なくとも 3 mg / リットル、少なくとも 4 mg / リットル、少なくとも 5 mg / リットル、少なくとも 6 mg / リットル、少なくとも 7 mg / リットル、少なくとも 8 mg / リットル、少なくとも 9 mg / リットル、少なくとも 1 0 mg / リットル、少なくとも 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 、 8 0 0 、 9 0 0 mg / リットル、1 g / リットル、5 g / リットル、1 0 g / リットルまたはそれ以上のタンパク質 (を含むが、これらに限定されない) の濃度で生産することができる。

#### 【0291】

##### I . 発現系、培養および単離

h G H ポリペプチドは、例えば酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞および細菌をはじめとするあらゆる数の適する発現系において発現させることができる。発現系の具体例の説明を下に提供する。

#### 【0292】

酵母 ここで用いる用語「酵母」は、h G H ポリペプチドをコードする遺伝子を発現することができる様々な酵母のいずれをも包含する。こうした酵母としては、有子囊胞子酵母 [エンドミセス目 (Endomycetales)] 、担子胞子酵母 (basidiosporogenous yeast) 、および不完全菌類に属する酵母 [不完全酵母菌類 (Blastomycetes)] が挙げられるが、これらに限定されない。有子囊胞子酵母は、2つの科、Spermophthoraceae科およびサッカロミセス科 (Saccharomycetaceae) に分けられる。後者は、4つの亜科、Schizosaccharomycoideae亜科 [例えば、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces) ] 、Nadsonioideae亜科、LipomycoideaeおよびSaccharomycoideae亜科 [例えば、ピチア属 (Pichia) 、クライベロミセス属 (Kluyveromyces) およびサッカロミセス属 (Saccharomyces) ] から成る。担子胞子酵母としては、ロイコスボリジウム属 (Leucosporidium) 、ロドスボリジウム属 (Rhodosporidium) 、スボリジオボラス属 (Sporidiobolus) 、フィロバシジウム属 (Filobasidium) 、およびフィロバシジエラ属 (Filobasidieila) が挙げられる。不完全菌類に属する酵母 (不完全酵母菌類) は、2つの科、スボロボロミケス科 (Sporobolomycetaceae) [例えば、スボロボロミセ

ス属 (Sporobolomyces) およびブレラ属 (Bullera) ] ならびにクリプトコックス科 (Cryptococcaceae) [ 例えば、カンジダ属 (Candida) ] に分けられる。

#### 【0293】

本発明での使用に特に興味深いのは、ピチア属、クライベロミセス属、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、ハンゼヌラ属 (Hansenula) 、トルロプシス属 (Trollropsis) 、およびカンジダ属であり、これらには、P. パストリス、P. ギリエリモンジイ (P. guillierimondii) 、S. セレビジエ、S. カールスベルゲンシス (S. carlsbergensis) 、S. ジサスタティカス (S. diastaticus) 、S. ダグラシイ (S. douglasii) 、S. クルイベリ (S. kluuyveri) 、S. ノルベンシス (S. norbensis) 、シェリー酵母 (S. oviformis) 、K. ラクティス (K. lactis) 、K. フラギリス (K. fragilis) 、C. アルビカンス (C. albicans) 、C. マルトーサ (C. maltosa) および H. ポリモルファ (H. polymorpha) が含まれる。

#### 【0294】

hGHポリペプチドの発現に適する酵母の選択は、当業者の技術の範囲内である。発現のための酵母宿主を選択する際、適する宿主としては、例えば、良好な分泌能力、低いタンパク質溶解活性、良好な分泌能力、良好な可溶性タンパク質生産、および総合的な頑強性を有することが明らかにされているものを挙げることができる。一般に、酵母は、Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (カリフォルニア州、バークレー) 、および米国微生物系統保存機関 [the American Type Culture Collection (「ATCC」)] (バージニア州、マナッサス) をはじめとする（しかし、これらに限定されない）様々な供給源から入手することができる。

#### 【0295】

用語「酵母宿主」または「酵母宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のトランスファー-DNAのための受容個体として使用することができる、または使用されている酵母を包含する。この用語は、組換えベクターまたは他の輸送DNAを受け取った原酵母宿主細胞の後代を包含する。単一親細胞の後代が、偶発的または計画的突然変異のため、形態またはゲノムもしくは全DNA補体に関して原親と必ずしも完全に同じであるとは限らないことは、理解される。hGHポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在などの関連特性を特徴として有するほど十分に親に類似している親細胞の後代は、この定義により指定される後代に包含される。

#### 【0296】

染色体外レプリコンおよび組み込みベクターをはじめとする発現および形質転換ベクターが、多数の酵母宿主への形質転換のために開発された。例えば、発現ベクターは、S. セレビジエ (Sikorskiら、GENETICS (1998) 112 : 19 ; Itoら、J. BACTERIOL. (1983) 153 : 163 ; Hinnenら、PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75 : 1929) ; C. アルビカンス (Kurtzら、MOL. CELL. BIOL. (1986) 6 : 142) ; C. マルトーサ (Kunzeら、J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25 : 141) ; H. ポリモルファ (Gleesonら、J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132 : 3459 ; Roggenkampら、MOL. GEN. GENET. (1986) 202 : 302) ; K. フラギリス (Dasら、J. BACTERIOL. (1984) 158 : 1165) ; K. ラクティス (De Louvencourtら、J. BACTERIOL. (1983) 154 : 737 ; Van den Bergら、BIO/TECHNOLOGY (1990) 8 : 135) ; P. ギリエリモンジイ (Kunzeら、J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25 : 141) ; P. パストリス

10

20

30

40

50

(*P. pastoris*) (米国特許第5,324,639号、同第4,929,555号、および同第4,837,148号; Creggら、MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, NATURE (1981) 300:706); およびY.リポリティカ (*Y. lipolytica*) (Davidowら、CURR. GENET. (1985) 10:380 (1985); Gail Lardinoisら、CURR. GENET. (1985) 10:49); A.ニデュランス (*A. nidulans*) (Balanceら、BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburnら、GENE (1983) 26:205-221; およびYeltonら、PROC. NATL. ACADEM. SCI. USA (1984) 81:1470-74); 黒色アスペルギルス (*A. niger*) (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475479); T.リージア (*T. reesia*) (欧州特許第0 244 234号); および例えばアカパンカビ (*Neurospora*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、トリポクラシウム (*Tolypocladium*) などの糸状菌 (国際公開第91/00357号) のために開発されている (前記参考文献は、各々、本明細書に参照により組み込まれている)。

## 【0297】

酵母ベクター用の制御配列は当業者に周知であり、アルコール脱水素酵素 (ADH) (欧州特許第0 284 044号)、エノラーゼ、グルコキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPまたはGAPD H)、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびピルビン酸キナーゼ (PyK) (欧州特許第0 329 203号) などの遺伝子からのプロモータ領域を含むが、これらに限定されない。酸性ホスファターゼをコードする酵母PHO5遺伝子も、有用なプロモータ配列を提供しうる (Myano hararaら、PROC. NATL. ACADEM. SCI. USA (1983) 80:1)。酵母宿主と共に使用するための他の適するプロモータ配列としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitzenmairら、J. BIOL. CHEM. (1980) 255:2073); ならびに他の糖分解酵素、例えばピルビン酸デカルボキシラーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼおよびグルコースリン酸イソメラーゼ (Hollandら、BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hessら、J. ADV. ENZYME REG. (1968) 7:149) のためのプロモータを挙げることができる。成長条件により制御される転写の追加利点を有する誘導性酵母プロモータとしては、アルコール脱水素酵素2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、窒素代謝に随伴する崩壊酵素、ならびにマルトースおよびガラクトース消費に責任を負う酵素についてのプロモータ領域を挙げることができる。酵母発現における使用に適するベクターおよびプロモータは、欧州特許第0 073 657号にさらに記載されている。

## 【0298】

酵母エンハンサを酵母プロモータとともに使用することもできる。加えて、合成プロモータも酵母プロモータとして機能することができる。例えば、酵母プロモータの上流活性化配列 (UAS) を別の酵母プロモータの転写活性化領域とつなぎ合させて、合成ハイブリッドプロモータを作ることができる。こうしたハイブリッドプロモータの例としては、GAP転写活性化領域に連結されたADH調節配列が挙げられる。例えば、米国特許第4,880,734号および同第4,876,197号参照 (これらは、本明細書に参照により組み込まれている)。ハイブリッドプロモータの他の例としては、GAPまたはPyKなどの糖分解酵素遺伝子の転写活性領域と組み合わせた、ADH2、GAL4、GAL10またはPHO5遺伝子の調節配列から成るプロモータである。欧州特許第0 164 556号参照。さらに、酵母プロモータとしては、酵母RNAポリメラーゼに結合し、転写を開始させる能力を有する、酵母起源ではない自然発生プロモータを挙げることがで

きる。

**【0299】**

酵母発現ベクターの部分を含むことができる他の制御要素としては、ターミネータ、例えば、GAPDHまたはエノラーゼ遺伝子からのもの(Hollandら、J. BIOL. CHEM. (1981) 256: 1385)が挙げられる。加えて、2μプラスミド起点からの複製起点が、酵母に適する。酵母での使用に適する選択遺伝子は、酵母プラスミド中に存在するtrp1遺伝子である。Tschemperら、GENE (1980) 10: 157; Kingsmanら、GENE (1979) 7: 141参照。trp1遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の突然変異株のための選択マーカーをもたらす。同様に、Leu2欠損酵母菌株(ATCC 20,622または38,626)は、Leu2遺伝子を有する公知プラスミドにより相補される。  
10

**【0300】**

酵母宿主への外在性DNAの導入方法は、当業者に周知であり、スフェロプラストの形質転換またはアルカリカチオンで処理したインタクトな酵母宿主細胞の形質転換のいずれかを一般に含むが、これらに限定されない。例えば、酵母の形質転換は、Hsiaoら、PROC.NATL.ACAD.SCI.USA (1979) 76: 3829およびVan Selingenら、J.BACT. (1977) 130: 946に記載されている方法に従って行うことができる。しかし、SAMBROOKら、MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001) に一般に記載されているような、核注入、エレクトロポレーションまたはプロトプラスト融合などによる細胞にDNAを導入するための他の方法も使用することができる。次に、通常の当業者に公知である標準的な技法を使用して、酵母宿主細胞を培養することができる。  
20

**【0301】**

酵母宿主細胞において異種タンパク質を発現させるための他の方法は、通常の当業者に周知である。一般に、米国特許出願公開第20020055169号、米国特許第6,361,969号、同第6,312,923号、同第6,183,985号、同第6,083,723号、同第6,017,731号、同第5,674,706号、同第5,629,203号、同第5,602,034号および同第5,089,398号、；米国特許再審査番号RE37,343およびRE35,749；PCT公開特記出願国際公開第99/078621号、同第98/37208号および同第98/26080号；欧州特許出願第0 946 736号、同第0 732 403号、同第0 480 480号、同第0 460 071号、同第0 340 986号、同第0 329 203号、同第0 324 274号および同第0 164 556号参照。Gelissenら、ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2): 79-93；Romanosら、YEAST (1992) 8(6): 423-488；Goedde1, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185: 3-7も参照（これらの各々が、本明細書に参照により組み込まれている）。  
30

**【0302】**

酵母宿主株は、通常の当業者に周知である標準的なフィードバッチ発酵方法を使用して增幅段階の間に発酵装置内で成長させることができる。発酵方法は、個々の酵母宿主の炭素消費経路または発現制御モードの違いの理由に合わせることができる。例えば、サッカロミセス属酵母宿主の発酵は、単一グルコースの供給、複雑な窒素源（例えば、カゼイン加水分解物）および多数のビタミン補足を必要とし得る。対照的に、メチロトローフ酵母P.パストリスは、グリセロール、メタノールおよび微量金属の供給を必要とし得るが、最適な成長および発現のために単純なアンモニウム（窒素）塩しか必要としない。例えば、米国特許第5,324,639号；Elliottら、J. PROTEIN CHEM. (1990) 9: 95；およびFieschkoら、BIOTECH. BIOENG. (1987) 29: 1113参照（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）。

**【0303】**

しかし、こうした発酵方法は、利用される酵母宿主株に依存しない一定の共通した特徴を有し得る。例えば、成長制限栄養、典型的には炭素を増幅期の間に発酵装置に添加して、最大成長を可能ならしめることができる。加えて、発酵方法は、適量の炭素、窒素、基礎塩 (basal salt)、リンおよび他の微量栄養素 (ビタミン、微量金属および塩など) を含有するように設計された発酵培地を一般に利用する。ピチア属での使用に適する発酵培地の例は、米国特許第5,324,639号および同第5,231,178号に記載されている (これらは、本明細書に参照により組み込まれている)。

#### 【0304】

バキュロウイルス感染昆虫細胞 用語「昆虫宿主」または「昆虫宿主細胞」は、組換えベクターまたは他の輸送DNAのための受容個体として使用することができる、または使用されている昆虫を指す。この用語は、トランスフェクトされた原昆虫宿主細胞の後代を包含する。単一親細胞の後代が、偶発的または計画的突然変異のため、形態またはゲノムもしくは全DNA補体に関して原親と必ずしも完全に同じであるとは限らないことは、理解される。*hGH*ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在などの関連特性を特徴として有するほど十分に親に類似している親細胞の後代は、この定義により指定される後代に包含される。

#### 【0305】

*hGH*ポリペプチドの発現に適する昆虫細胞の選択は、通常の当業者に周知である。幾つかの昆虫種は、当該技術分野において十分説明されており、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)、カイコガ (*Bombyx mori*)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、スピドaptera frugiperda) およびイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) をはじめとする昆虫種は、市販されている。発現のための昆虫宿主を選択する際に適する宿主としては、中でも、良好な分泌能力、低いタンパク質溶解活性および総合的な頑強性を有することが明らかにされているものを挙げることができる。一般に、昆虫は、the Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (カリフォルニア州、バークレー) ; および米国微生物系統保存機関 [the American Type Culture Collection ('ATCC')] (バージニア州、マナッサス) をはじめとする (しかし、これらに限定されない) 様々な供給源から入手することができる。

#### 【0306】

一般に、バキュロウイルス感染昆虫発現系の成分としては、バキュロウイルスゲノムのフラグメントおよび発現させる異種遺伝子の挿入に適便な制限部位、両方を含有するトランスファーベクター、通常は細菌プラスミド；このトランスファーベクター内のバキュロウイルス特異的フラグメントに相同的な配列 (これは、バキュロウイルスゲノム内への異種遺伝子の相同組換えを可能にする)；ならびに適切な昆虫宿主細胞および成長培地が挙げられる。ベクターの構築、細胞のトランスフェクション、ブラークのピッキングおよび培養での細胞の成長において使用される材料、方法および技術は、当該技術分野において公知であり、これらの技術が記載されているマニュアルを利用することができる。

#### 【0307】

トランスファーベクターに異種遺伝子を挿入した後、ベクターおよび野生型ウイルスゲノムを、このベクターおよびウイルスゲノムを組み換える昆虫宿主細胞にトランスフェクトする。パッケージされた組換えウイルスを発現させ、組換えブラークを同定し、精製する。バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系のための材料および方法は、例えば、*In vitro*rogen Corp. (カリフォルニア州、カールズバッド) からキット形で市販されている。これらの技術は、当業者に一般に公知であり、SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN No. 1555 (1987) (これは、本明細書に参照により組み

10

20

30

40

50

込まれている)に十分に記載されている。RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBELら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9 - 16.11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); およびO'REILLYら、BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)も参照。

## 【0308】

実際、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系を使用する様々な異種タンパク質の生産が、  
当該技術分野において周知である。例えば、米国特許第6,368,825号; 同第6,342,216号;  
同第6,338,846号; 同第6,261,805号; 同第6,245,528号; 同第6,225,060号; 同第6,183,  
987号; 同第6,168,932号; 同第6,126,944号; 同第6,096,304号; 同第6,013,433号;  
同第5,965,393号; 同第5,939,285号; 同第5,891,676号; 同第5,871,986号; 同第5,  
861,279号; 同第5,858,368号; 同第5,843,733号; 同第5,762,939号; 同第5,753,220号;  
同第5,605,827号; 同第5,583,023号; 同第5,571,709号; 同第5,516,657号; 同第5,  
290,686号; 国際公開第02/06305号; 同第01/90390号; 同第01/27301号; 同第01/05956号;  
同第00/55345号; 同第00/20032号; 同第WO99/51721号; 同第99/45130号; 同第99/  
31257号; 同第99/10515号; 同第99/09193号; 同第97/26332号; 同第96/29400号; 同第96/  
25496号; 同第96/06161号; 同第95/20672号; 同第93/03173号; 同第92/16619号;  
同第92/03628号; 同第92/01801号; 同第90/14428号; 同第90/10078号; 同第90/02566号;  
同第90/02186号; 同第90/01556号; 同第89/01038号; 同第89/01037号; 同第88/  
07082号参照(これらは、本明細書に参照により組み込まれている)。

## 【0309】

バキュロウイルス/昆虫細胞発現系において有用であるベクターは、当該技術分野において公知であり、こうしたベクターとしては、例えば、ヘルパー非依存性ウイルス発現ベクターである、バキュロウイルス オートグラファ・カリフォルニカ(Autographa californica)核多核体病ウイルス(ACNPV)に由来する昆虫発現およびトランスファーベクターが挙げられる。これらの系から誘導されたウイルスベクターは、強いウイルスポリヘドリン遺伝子プロモータを利用して、異種遺伝子の発現を誘導する。一般には、Reillyら、BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992) 参照。

## 【0310】

バキュロウイルスゲノムに外来遺伝子を挿入する前に、プロモータ、リーダー(所望に応じて)、対象となるコード配列、および転写終了配列を含む上記成分を、一般に、中間置換構築物(intermediate transplacement construct)(トランスファーベクター)に組立てる。中間置換構築物は、細菌などの宿主において安定して維持することができる染色体外成分(例えば、プラスミド)のようなレプリコン内に維持されることが多い。このレプリコンは、複製系を有するであろう。従って、クローニングおよび增幅に適する宿主内にそれを維持することができる。より具体的には、このプラスミドは、ポリヘドリン多アデニル化シグナル(Millerら、ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42: 177)、および原核性アンピシン耐性(amp)遺伝子、および大腸菌における選択および増殖の複製起点を含有し得る。

## 【0311】

10

20

30

40

50

外来遺伝子を A c N P V に導入するための 1 つの一般に使用されるトランスファーベクターは、 p A c 3 7 3 である。例えば p V L 9 8 5 をはじめとする、ポリヘドリン開始コドンを A T G から A T T に変更し、この A T T から 3 2 塩基対下流に B a m H I クローニング部位を導入する、当業者に公知である他の多くのベクターも設計された。 Luckow and Summers, 17 VIROLOGY 31 (1989) 参照。他の市販ベクターとしては、例えば、 P B l u e B a c 4 . 5 / V 5 - H i s ; p B l u e B a c H i s 2 ; p M e l B a c ; p B l u e B a c 4 . 5 ( カリフォルニア州、カールズバッドの I n v i t r o g e n C o r p . ) が挙げられる。

## 【 0 3 1 2 】

異種遺伝子の挿入後、トランスファーベクターおよび野生型バキュロウイルスゲノムを昆虫細胞宿主にコ・トランスフェクトする。バキュロウイルスの所望の部位に異種 DNA を導入するための方法は、当該技術分野において公知である。 SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN No. 1555 (1987) ; Smithら、 MOL. CELL. BIOL. (1983) 3 : 2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 17 : 31 参照。例えば、この挿入は、相同二重交叉組換えによるポリヘドリン遺伝子などの遺伝子へのものであってもよく、所望のバキュロウイルス遺伝子へと操作される制限酵素部位へのものであってもよい。 Millerら、 BIODESSAYS (1989) 4 : 91 参照。

## 【 0 3 1 3 】

トランスフェクションは、エレクトロポレーションにより達成することができる。 TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995) ; Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70 : 3501 参照。また、リボソームを使用して、組換え発現ベクターおよびバキュロウイルスで昆虫細胞をトランスフェクトすることができる。例えば、 Liebmanら、 BIOTECHNIQUES (1999) 26 (1) : 36 ; Gravesら、 BIOCHEMISTRY (1998) 37 : 6050 ; Nomuraら、 J. BIOL. CHEM. (1998) 273 (22) : 13570 ; Schmidtら、 PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12 : 323 ; Siffrerら、 NATURE GENETICS (1998) 18 : 45 ; Tilkinsら、 CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145 - 154 (1998) ; Caiら、 PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10 : 263 ; Dolphinら、 NATURE GENETICS (1997) 17 : 491 ; Kostら、 GENE (1997) 190 : 139 ; Jakobssonら、 J. BIOL. CHEM. (1996) 271 : 22203 ; Rowles, J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (37) : 22376 ; Reverseyら、 J. BIOL. CHEM. (1996) 271 (39) : 23607 - 10 ; Stanleyら、 J. BIOL. CHEM. (1995) 270 : 4121 ; Siskら、 J. VIROL. (1994) 68 (2) : 766 ; および Pengら、 BIOTECHNIQUES (1993) 14 . 2 : 274 参照。市販のリボソームとしては、例えば、 Cellfection (登録商標) および Lipofection (登録商標) ( カリフォルニア州、カールズバッドの I n v i t r o g e n C o r p . ) が挙げられる。加えて、リン酸カルシウムトランスフェクションを用いることができる。 TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995) ; Kitts, NAR (1990) 18 (19) : 5667 ; および Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70 : 3501 参照。

## 【 0 3 1 4 】

バキュロウイルス発現ベクターは、通常、バキュロウイルスプロモータを含有する。バキュロウイルスプロモータは、バキュロウイルス RNA ポリメラーゼに結合し、 m R N A

10

20

30

40

40

50

へのコドン配列（例えば、構造遺伝子）の下流（3'）転写を開始させることができるあらゆるDNA配列である。プロモータは、このコドン配列の5'末端に隣接する位置に通常はある転写開始領域を有するであろう。この転写開始領域は、一般にはRNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。バキュロウイルスプロモータは、エンハンサと呼ばれる第二のドメインを有することもあり、それは、存在するならば、構造遺伝子に対して遠位にある。さらに、発現は、調節型発現であってもよいし、構成性発現であってもよい。

## 【0315】

感染サイクルにおける後期に異常転写される構造遺伝子によって、特に有用なプロモータ配列が生じる。例としては、ウイルス多面体タンパク質をコードする遺伝子（FRIESENら、The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986)；欧州特許第0 127 839号および同第0 155 476号）およびp10タンパク質をコードする遺伝子（Vlakら、J. GEN. VIROL. (1988) 69: 765）から誘導された配列が挙げられる。

## 【0316】

当業者に公知である技法により、新たに形成されたバキュロウイルス発現ベクターを感染組換えバキュロウイルスにパッケージし、この後、成長したプラーカを精製することができる。Millerら、BIOESSAYS (1989) 4: 91；SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN No. 1555 (1987) 参照。

## 【0317】

組換えバキュロウイルス発現ベクターは、幾つかの昆虫細胞への感染のために開発された。例えば、組換えバキュロウイルスは、とりわけ、ネッタイシマカ（ATCC番号CC-L-125）、カイコガ（ATCC番号CRL-8910）、キイロショウジョウバエ（ATCC番号1963）、スポドプテラ・フルジペルダおよびイラクサギンウワバのために開発された。国際公開第89/046, 699号；Wright, NATURE (1986) 321: 718；Carboneilら、J. VIROL. (1985) 56: 153；Smithら、MOL. CELL. BIOL. (1983) 3: 2156 参照。一般には、Fraserら、IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25: 225 参照。より具体的には、バキュロウイルス発現ベクター系に使用される細胞系としては、一般に、Sf9（スポドプテラ・フルジペルダ）（ATCC番号CRL-1711）、Sf21（スポドプテラ・フルジペルダ）（Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013（カリフォルニア州、カールズバッド））、Tri-368（イラクサギンウワバ）、およびHigh-Five（商標）BTI-TN-5B1-4（イラクサギンウワバ）が挙げられる。

## 【0318】

バキュロウイルス／発現における異種ポリペプチドの直接発現と融合発現、両方のための細胞および培養基が、市販されており、細胞培養技術は、当業者に一般に公知である。

## 【0319】

大腸菌および他の原核細胞 細菌発現技術は、当該技術分野において周知である。多種多様なベクターが、細菌宿主での使用に利用できる。これらのベクターは、單一コピー型ベクターであってもよいし、高多コピー型ベクターであってもよい。ベクターは、クローニングおよび／または発現のために役立ち得る。ベクターに関する豊富な文献、多数のベクターの市販、ならびにベクターを説明するマニュアルおよびこれらの制限マップまでもを考慮して、ここで詳細にわたり論じる必要はない。周知であるように、これらのベクターは、選択を可能にするマーカーを通常は含み、これらのマーカーが、細胞毒製剤耐性、原栄養性または免疫性を規定する。多くの場合、異なる特性を規定する多数のマーカーが存在する。

## 【0320】

10

20

30

30

40

50

細菌性プロモータは、細菌RNAポリメラーゼに結合し、mRNAへのコドン配列（例えば、構造遺伝子）の下流（3'）転写を開始させることができるあらゆるDNA配列である。プロモータは、このコドン配列の5'末端に隣接する位置に通常はある転写開始領域を有するであろう。この転写開始領域は、一般にはRNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。細菌性プロモータは、RNA合成が開始する隣接RNAポリメラーゼ結合部位に重なることがある、オペレータ呼ばれる第二のドメインを有することもある。このオペレータは、遺伝子レプレッサタンパク質がこのオペレータに結合し、これにより特定の遺伝子の転写を阻害し得るので、負調節型（誘導性）転写を可能にならしめる。構成性発現は、オペレータなどの負調節要素の不在下で発生し得る。加えて、正の調節は、遺伝子活性化タンパク質結合配列により達成され得、この配列が存在する場合、それは、通常、RNAポリメラーゼ結合配列に隣接（5'）する。遺伝子活性化タンパク質の一例は、カタボライト活性化タンパク質（CAP）であり、これは、大腸菌のラクトースオペロンの転写開始を助長する [Raibaudら、ANNU. REV. GENET. (1984) 18: 173]。従って、調節型発現は、正のものであってもよいし負のものであってもよく、これにより転写が強化されるか、低減される。

### 【0321】

代謝経路酵素をコードする配列は、特に有用なプロモータ配列を提供する。例としては、糖代謝酵素、例えばガラクトース、ラクトース（lac）[Changら、NATURE (1977) 198: 1056]およびマルトースから誘導されるプロモータ配列が挙げられる。追加の例としては、生合成酵素、例えばトリプトファン（trp）から誘導されるプロモータ配列 [Goeddeleら、Nuc. ACIDS RES. (1980) 8: 4057; Yelvertonら、NUCL. ACIDS RES. (1981) 9: 731; 米国特許第4,738,921号；GHPub. 番号第036776号および同第121775号] が挙げられる。 - ガラクトシダーゼ（bla）プロモータ系 [Weissmann (1981) 「インターフェロンのクローニングおよび他の間違い（The cloning of interferon and other mistakes）」. In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)]、バクテリオファージラムダPL [Shimatakeら、NATURE (1981) 292: 128] およびT5 [米国特許第4,689,406号（これは、本明細書に参照により組み込まれている）] プロモータ系も、有用なプロモータ配列を生じさせる。本発明の好ましい方法は、T7プロモータなどの強力なプロモータを利用して、高レベルでhGHポリペプチドを生産する。こうしたベクターの例は、当該技術分野において周知であり、こうしたものとしては、NovagenからのpET29シリーズ、および国際公開第99/05297号（これは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載のpPOPベクターが挙げられる。こうした発現系は、宿主の生存率または成長パラメータを損なわせることなく宿主において高レベルのhGHポリペプチドを生産する。

### 【0322】

加えて、天然では発生しない合成プロモータも、細菌性プロモータとして機能する。例えば、ある細菌性またはバクテリオファージプロモータの転写活性化配列を別の細菌性またはバクテリオファージプロモータのオペロン配列とつなぎ合わせて、合成ハイブリッドプロモータを作ることができ [米国特許第4,551,433号（これは、本明細書に参照により組み込まれている）]。例えば、lacプロモータは、trpプロモータとlacオペロンの両方から成るハイブリッドrip-lacプロモータであり、前記lacオペロンは、lacレプレッサにより規定される [Amannら、GENE (1983) 25: 167; de Boerら、PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80: 21]。さらに、細菌性プロモータは、細菌RNAポリメラーゼに結合し、転写を開始させる能力を有する、細菌起源でない自然発生プロモータを含むことができる。細菌起源でない自然発生プロモータを適合性RNAポリメラーゼとカップリングさせて、原核生物における一部の遺伝子の高レベルの発現を生じさせることができる。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ/プロモータ系は、カップリングされるプロモータ系の

10

20

30

40

50

一例である [ Studierら、J. MOL. BIOL. (1986) 189: 113; Taborら、Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82: 1074]。加えて、ハイブリッドプロモータが、バクテリオファージプロモータおよび大腸菌オペレータ領域から成ることもある（欧洲特許第267 851号）。

### 【0323】

機能性プロモータ配列に加えて、効率的リボソーム結合部位も原核生物における外来遺伝子の発現に有用である。大腸菌におけるこのリボソーム結合部位は、シャイン - ダルガーノ (SD) 配列と呼ばれ、開始コドン (ATG) およびこの開始コドンの3から11又クレオチド上流に位置する長さ3から9ヌクレオチドの配列を含む [ Shineら、NATURE (1975) 254: 34]。このSD配列は、SD配列およびこの3' と大腸菌16S rRNAのものとの間の塩基の対合により、リボソームへのmRNAの結合を促進すると考えられる [ Steitzら「メッセンジャーRNAにおける遺伝子シグナルおよびヌクレオチド配列 (Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA)」, In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979) ]。真核性遺伝子および弱いリボソーム結合部位を有する原核性遺伝子を発現させること [ Sambrookら「大腸菌におけるクローン化遺伝子の発現 (Expression of cloned genes in Escherichia coli)」, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]。

### 【0324】

用語「細菌宿主」または「細菌宿主細胞」は、組換えベクターまたは他のトランスファー-DNAのための受容個体として使用することができる、または使用されている細菌を指す。この用語は、トランスフェクトされた原細菌宿主細胞の後代を包含する。単一親細胞の後代が、偶発的または計画的突然変異のため、形態またはゲノムもしくは全DNA補体に関して原親と必ずしも完全に同じであるとは限らないことは、理解される。hGHポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在などの関連特性を特徴として有するほど十分に親に類似している親細胞の後代は、この定義により指定される後代に包含される。

### 【0325】

hGHポリペプチドの発現に適する宿主細菌の選択は、当業者に周知である。発現のために細菌を選択する際に適する宿主としては、とりわけ、良好な封入体形成能力、低いタンパク質溶解活性および総合的な頑強性を有することが明らかにされているものを挙げることができる。一般に、細菌宿主は、the Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (カリフォルニア州、バークレー) ; および米国微生物系保存機関 [ the American Type Culture Collection (「ATCC」)] (バージニア州、マナッサス) をはじめとする（しかし、これらに限定されない）様々な供給源から入手することができる。工業的 / 製薬的発酵には、K株（例えば、W3110）から誘導された細菌またはB株（例えば、BL21）から誘導された細菌が使用される。これらの株は、これらの成長パラメータが極めて周知であり、頑強であるため、特に有用である。加えて、これらの株は、病原性ではなく、このことは、製品化という視点から安全性および環境上の理由のため重要である。本発明の方法の1つの実施態様において、大腸菌宿主は、BL21の株である。本発明の方法のもう1つの実施態様において、大腸菌宿主は、OMP-およびLON-をはじめとする（しかし、これらに限定されない）プロテアーゼマイナス株である。本発明の方法のもう1つの実施態様において、宿主細胞株は、シュードモナス・フルオレッセンス、緑膿菌およびュードモナス・プチダをはじめとする（しかし、これらに限定されない）シュードモナス属種である。MB101株と呼ばれるシュードモナス・フルオレッセンス次亜種1は、The Dow Chemical Companyによる治療用タンパク質生産プロセスに宿主株として利用できる（ミシガ

10

20

30

40

50

ン州、ミッドランド the World Wide Webのdow.comで利用できる)。米国特許第4,755,465号および同第4,859,600(これらは、本明細書に参照により組み込まれている)には、hGH生産のための宿主細胞としてのシードモナス株の使用が記載されている。

#### 【0326】

組換え宿主細胞株を樹立したら(すなわち、発現構築物を宿主細胞に導入し、適正な発現構築物を有する宿主細胞を単離したら)、この組換え宿主細胞を、hGHポリペプチドの生産に適する条件下で培養する。当業者には明らかであろうように、組換え宿主細胞を培養する方法は、利用される発現構築物の性質および宿主細胞の素性に依存するであろう。一般に、組換え宿主株は、当該技術分野において周知である方法を使用して培養される。組換え宿主細胞は、炭素、窒素および無機塩の同化性供給源を含有し、場合により、ビタミン、アミノ酸、成長因子および当該技術分野において周知である他のタンパク質性培養補足物を含有する液体培地中で一般には培養する。宿主細胞を培養するための液体培地は、望ましくない微生物の成長を予防するために抗生物質または抗真菌薬を、および/または発現ベクターを含有する宿主細胞を選択するために抗生物質をはじめとする(しかし、これに限定されない)化合物を、場合により含有する。

#### 【0327】

組換え宿主細胞は、バッチ形式または連続形式で培養することができ、バッチ形式または連続形式のいずれかでの細胞を回収する(hGHポリペプチドが細胞内に蓄積する場合)か、培養上清を回収する。原核性宿主細胞での生産については、バッチ式培養および細胞回収が好ましい。

#### 【0328】

本発明のhGHポリペプチドは、組換え系での発現後、一般には精製される。本hGHポリペプチドは、当該技術分野において公知である様々な方法により宿主細胞から精製することができる。一般に、細菌宿主細胞において生産されたhGHポリペプチドは、可溶性不良であるか、不溶性である(封入体の形態)。本発明の1つの実施態様において、hGHポリペプチドのアミノ酸置換は、容易に行うことができ、これらは、本明細書に開示する方法ならびに当業者に公知である方法を利用して組換え生産タンパク質の溶解性を増大させる目的で選択される。可溶性タンパク質の場合、このタンパク質を遠心分離により宿主細胞溶解産物から回収し、次いで、さらに、これらの細胞の均質化することができる。溶解性不良タンパク質の場合、ポリエチレンイミン(PEI)をはじめとする(しかし、これに限定されない)化合物を添加して、一部可溶性のタンパク質の沈殿を誘導することができる。次に、沈殿したタンパク質は、遠心分離により回収することができる。通常の当業者に周知である様々な方法を使用することにより、組換え細胞を破壊または均質化して、これらの細胞内から封入体を放出させることができる。宿主細胞の破壊または均質化は、酵素的細胞破壊、超音波処理、ダンス型均質化または高圧放出破壊をはじめとする(しかし、これらに限定されない)周知である技法を使用して行うことができる。本発明の方法の1つの実施態様では、高圧放出技法を使用して大腸菌宿主細胞を破壊して、hGHポリペプチドの封入体を放出させる。ホモジナイザーにより大腸菌宿主細胞の1つの継代のみを利用することにより、封入体の形態での可溶性hGHポリペプチドの収率を増加させることができることが判明した。hGHポリペプチドの封入体を取り扱う際、反復により均質化時間を最少にして、可溶化、機械的剪断またはタンパク質溶解などの因子に起因する損失を伴わずに封入体の収量を最大にすると有利である。

#### 【0329】

次に、当該技術分野において公知である多数の適する可溶化剤を使用して、不溶性または沈殿したhGHポリペプチドを可溶化することができる。好ましくは、尿素または塩酸グアニジンでhGHポリペプチドを可溶化する。従来どおり処理できるバッチサイズを用いて大きなバッチを生産できるように、可溶化されるhGHポリペプチド-BPの体積を最少にすべきである。この因子は、何千リットルもの体積であるバッチで組換え宿主を成長させることができる大規模工業用設定では有意であり得る。加えて、大規模工業用設定

10

20

30

40

50

で、特にヒトの医薬用途の、hGHポリペプチドを製造する場合、機械および容器またはタンパク質製品そのものを損傷させ得る刺激の強い化学薬品の回避は、可能であれば、回避すべきである。本発明の方法では、より刺激の強い変性剤変性グアニジンの代わりに、より弱い変性剤尿素を使用してhGHポリペプチド封入体を可溶化することができる事が判明した。この尿素の使用は、hGHポリペプチド封入体を有意に可溶化する一方で、hGHポリペプチドの製造および精製プロセスに利用されるステンレス鋼装置を損傷する危険性を有意に低減する。

## 【0330】

hGHポリペプチドが、融合タンパク質として生産される場合、この融合配列は、好ましくは除去する。融合配列の除去は、酵素的または化学的切断により、好ましくは酵素的分解により達成することができる。融合配列の酵素的除去は、当業者に周知である方法を使用して達成することができる。融合配列を除去するための酵素の選択は、この融合体の素性により決まるであろうし、また反応条件は、当業者には明らかであるような酵素の選択により指定されるであろう。分解hGHポリペプチドは、好ましくは、周知である方法によるこの分解融合配列から精製する。こうした方法は、当業者には明らかであるように、この融合配列およびhGHポリペプチドの素性および特性により決まるであろう。精製のための方法としては、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーもしくは透析またはこれらのあらゆる組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0331】

好ましくは、hGHポリペプチドは、このタンパク質溶液からDNAを除去するためにも精製される。DNAは、当該技術分野において公知であるいずれかの適する方法、例えば、沈殿またはイオン交換クロマトグラフィーにより除去することができるが、好ましくは、硫酸プロタミンなど（しかし、これに限定されない）の核酸沈殿剤での沈殿により除去される。hGHポリペプチドは、沈殿したDNAから、遠心分離または濾過をはじめとする（しかし、これらに限定されない）周知である標準的な方法を使用して分離することができる。宿主核酸分子の除去は、hGHポリペプチドをヒトの治療に使用することとなる設定、および本発明の方法により宿主細胞DNAを医薬適合性レベルに減少させる設定において重要な因子である。

## 【0332】

発酵装置、振盪フラスコ、流動床バイオリアクター、中空纖維バイオリアクター、ローラーボトル培養システムおよび攪拌タンクバイオリアクターシステムをはじめとする（しかし、これらに限定されない）小規模または大規模な発酵方法もタンパク質発現に使用することができる。これらの各方法は、バッチ、フェッド・バッチ、または連続モードプロセスで行うことができる。

## 【0333】

本発明のヒトhGHポリペプチドは、当該技術分野において標準的な方法を使用して、一般に回収することができる。例えば、培地または細胞溶解産物を遠心分離または濾過して、細胞破壊片を除去することができる。この上清を濃縮もしくは蒸留して所望の体積にしてもよいし、ダイアフィルタを通して、さらなる精製のためのこの調製物のコンディショニングに適する緩衝液へと濾過してもよい。本発明のhGHポリペプチドのさらなる精製は、アミド分解された形態および剪断された形態のhGHポリペプチド変異体とインタクトな形のものとの分離を含む。

## 【0334】

以下の具体例としての手順のいずれを本発明のhGHポリペプチドの精製に利用してもよい：親和性クロマトグラフィー；アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー（DEAE SEP HAROSE（これを含むが、これに限定されない）を使用）；シリカでのクロマトグラフィー；逆相HPLC；ゲル濾過（SEPHADEX G-75（これを含むが、これに限定されない）を使用）；疎水性相互作用クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー；金属キレートクロマトグラフィー；限外濾過／ダイアフィルト

10

20

30

40

50

レーション；エタノール沈降法；硫酸アンモニウム沈降法；クロマトフォーカッシング；置換クロマトグラフィー；電気泳動手順（分取等電点分画電気泳動法を含むが、これに限定されない）、示差溶解度（流砂アンモニウム沈降法を含むが、これに限定されない）、SDS-PAGE、または抽出。

【0335】

非天然アミノ酸、非天然アミノ酸を含むタンパク質に対する抗体、非天然アミノ酸を含むタンパク質の結合パートナーなどを含むタンパク質をはじめとする（しかし、これらに限定されない）本発明のタンパク質は、当業者に公知であり、当業者に使用されている標準的な手順に従って、部分的にまたは実質的に均質に精製することができる。従って、本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降法、酸または塩基抽出、カラムクロマトグラフィー、親和性カラムクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィーおよびゲル電気泳動法などをはじめとする（しかし、これらに限定されない）当該技術分野において周知である多数の方法のいずれによっても回収および精製することができる。所望される場合には、適性にフォールディングされた成熟タンパク質を作るタンパク質リフォールディング段階を用いることができる。高純度が望まれる最終精製段階では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、親和性クロマトグラフィーまたは他の適する方法を利用することができる。1つの実施態様において、非天然アミノ酸（または非天然アミノ酸を含むタンパク質）に対して作られた抗体を、1つ以上の非天然アミノ酸を含むタンパク質を親和性に基づき精製するため（これを含むが、これに限定されない）に、精製試薬として使用する。所望どおり部分的にまたは均質になるまで精製したら、これらのポリペプチドは、アッセイ成分、治療用、予防用、診断用、研究用試薬として、および／または抗体生産のための免疫原として（これらを含むが、これらに限定されない）、多種多様な用役のために場合により使用される。

【0336】

本明細書において述べる他の参照に加えて、様々な精製／タンパク質フォールディング法が当該技術分野において周知であり、こうしたものとしては、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag (1996) Protein Methods, 第二版 Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 第三版 Springer Verlag, NY; Janson and Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. 第二版 Wiley-VCH, NY; およびWalker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ; ならびにこれらの中に引用されている参考文献に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0337】

10

20

30

40

50

真核性宿主細胞または非真核性宿主細胞において非天然アミノ酸を有する対象となるタンパク質またはポリペプチドを生産することの一つの利点は、一般に、これらのタンパク質またはポリペプチドが、これらの本来の配座でフォーディングされるであろうことである。しかし、本発明の一定の実施態様において、合成、発現および／または精製後、タンパク質は、この関連ポリペプチドの望ましい配座とは異なる配座を有することがあることは、当業者には理解されるであろう。本発明の一つの側面では、発現されたタンパク質を場合により変性させ、次いで、復元させる。これは、対象となるタンパク質またはポリペプチドにシャペロニンを付加されることによる；グアニジンH C 1などのカオトロピック剤にタンパク質を可溶化することによる；タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを利用することによる、など（これらを含むが、これらに限定されない）、当該技術分野において公知である方法を利用して達成することができる。10

### 【0338】

一般に、発現されるポリペプチドを変性および還元させ、この後、これらのポリペプチドを好ましい配座にリフォールドさせることが時として望ましい。例えば、グアニジン、尿素、DTT、DTEおよび／またはシャペロニンを対象となる翻訳産物に添加することができる。タンパク質を還元、変性および復元させる方法は、当業者に周知である（上記参考文献、ならびにDebinskiら、（1993）J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; およびBuchnerら、（1992）Anal. Biochem., 205: 263-270参照）。例えば、Debinskiらは、グアニジン-DTEにおける封入タンパク質の変性および還元を記載している。これらのタンパク質は、酸化されたグルタチオンおよびL-アルギニン（これらを含むが、これらに限定されない）を含有する酸化還元緩衝液中でリフォールドされ得る。リフォールディング試薬を流して、または別様に移動させて、1つ以上のポリペプチドまたは他の発現産物と接触させることができ、またはこの逆もできる。20

### 【0339】

hGHポリペプチドの原核細胞生産の場合、このように生産されたhGHポリペプチドは、ミスフォールドされていることがある、したがって、生物活性を欠くか、低減された生物活性を有する。タンパク質の生体活性は、「リフォールディング」により回復させることができる。一般に、ミスフォールドされたhGHポリペプチドは、例えば、1つ以上のカオトロピック剤（例えば、尿素および／またはグアニジン）ならびにジスルフィド結合を還元することができる還元剤（例えば、ジチオトレイトル、DTTまたは2-メルカプトエタノール、2ME）を使用して、このポリペプチド鎖を可溶化（このhGHポリペプチドも不溶性である場合）、アンフォールドおよび還元することにより、リフォールドさせる。この後、中等度のカオトロープ濃度で、酸化剤（例えば、酸素、システインまたはシスタミン）を添加し、それによってジスルフィド結合を再構成することができる。hGHポリペプチドは、米国特許第4,511,502号、同第4,511,503号および同第4,512,922号（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されているものなどの当該技術分野において公知である標準的な方法を使用してリフォールドさせることができる。hGHポリペプチドを他のタンパク質とコフォールドさせて、ヘテロ二量体またはヘテロ多量体を形成することもできる。リフォールディングまたはコフォールディング後、このhGHポリペプチドを好ましくはさらに精製する。3040

### 【0340】

一般精製法 hGHポリペプチドを含む細胞溶解産物を用いて、または親和性クロマトグラフィー、オン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）、逆相HPLC（「RP-HPLC」）膨張床吸着、またはこれらの、あらゆる適切な順序でのあらゆる組合せおよび／もしくは繰り返しをはじめとする（しかし、これらに限定されない）あらゆる単離段階から得られるあらゆるhGHポリペプチド混合物を用いて、様々な単離段階のいずれを行ってもよい。50

## 【0341】

本明細書に記載する技法を行う際に使用される装置および他の必要材料は、市販されている。ポンプ、分別回収装置、モニター、レコーダーおよび完全システムは、例えば、Applied Biosystems (カリフォルニア州、フォスター・シティー)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (カリフォルニア州、ハーキュリーズ)、およびAmersham Biosciences, Inc. (ニュージャージー州、ピスカタウェイ)から入手することができる。交換マトリックス材料、培地および緩衝液をはじめとする(しかし、これらに限定されない)クロマトグラフ材料も、こうした会社から入手することができる。

## 【0342】

平衡、ならびに本明細書に記載のカラムクロマトグラフィープロセスにおける他の段階、例えば洗浄および溶離は、ポンプなどの専用装置を使用して、より容易に遂行することができる。市販のポンプとしては、HI LOAD Pump P-50、Peristaltic Pump P-1、Pump P-901、およびPump P-903 (ニュージャージー州、ピスカタウェイのAmersham Biosciences)が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0343】

分別回収装置の例としては、RediFrac Fraction Collector、FRAC-100 およびFRAC-200 Fraction Collectors、ならびにSUPERFRACO (登録商標) Fraction Collector (ニュージャージー州、ピスカタウェイのAmersham Biosciences)が挙げられる。pHおよび線形濃度勾配を形成するために、ミキサーを利用することができる。市販のミキサーとしては、Gradient Mixer GM-1 およびIn-Line Mixers (ニュージャージー州、ピスカタウェイのAmersham Biosciences)が挙げられる。

## 【0344】

クロマトグラフプロセスは、市販のモニターを使用してモニターすることができる。こうしたモニターを使用して、UV、pHおよび電導性のような情報を集めることができる。検出器の例としては、Monitor UV-1、UVICORD (登録商標) S II、Monitor UV-M II、Monitor UV-900、Monitor UPC-900、Monitor pH/C-900、およびConductivity Monitor (ニュージャージー州、ピスカタウェイのAmersham Biosciences)が挙げられる。実際、Amersham Biosciences (ニュージャージー州、ピスカタウェイ)からの様々なAKTA (登録商標)をはじめとする完全システムが、市販されている。

## 【0345】

本発明の一つの実施態様において、例えば、結果として生じたhGHポリペプチドを尿素中で先ず変性させ、続いて、還元剤(例えば、DTT)を含有する、適するpHのTRIS緩衝液で希釈することにより、hGHポリペプチドを還元および変性させることができる。もう一つの実施態様では、hGHポリペプチドを約2Mから約9Mの間の濃度範囲で尿素中で変性させ、この後、約5.0から約8.0の範囲のpHでTRIS緩衝液中で希釈する。続いて、この実施態様のリフォールディング混合物をインキュベートしてもよい。一つの実施態様において、前記リフォールディング混合物は、室温で4から24時間インキュベートする。還元および変性されたhGHポリペプチド混合物を、この後、さらに単離または精製してもよい。

## 【0346】

ここで述べる第一hGHポリペプチド混合物のpHは、いずれの後続単離段階を行う前にも調整することができる。加えて、当該技術分野において公知である技法を使用して、この第一hGHポリペプチド混合物またはこれらのあらゆる後成混合物を濃縮することができる。さらに、この第一hGHポリペプチド混合物またはこれらのあらゆる後成混合物

10

20

30

40

50

を含有する溶離緩衝液を、通常の当業者に周知である技法を使用して次の単離段階に適する緩衝液と交換することができる。

### 【0347】

イオン交換クロマトグラフィー 一つの実施態様において、および任意の追加段階として、前記第一hGHポリペプチド混合物を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行うことができる。一般には、ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY : PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences (ニュージャージー州、ピスカタウェイ)) 参照。市販のイオン交換カラムとしては、HITRAP (登録商標)、HIPREP (登録商標) およびHILOAD (登録商標) Columns (Amersham Biosciences, ニュージャージー州、ピスカタウェイ) が挙げられる。こうしたカラムでは、強アニオン交換体、例えば、Q SEPHAROSE (登録商標) Fast Flow、Q SEPHAROSE (登録商標) High Performance、および Q SEPHAROSE (登録商標) XL ; 強力チオノン交換体、例えば、SP SEPHAROSE (登録商標) High Performance、SP SEPHAROSE (登録商標) Fast Flow、およびSP SEPHAROSE (登録商標) XL ; 弱アニオン交換体、例えば、DEAE SEPHAROSE (登録商標) Fast Flow ; ならびに弱力チオノン交換体、例えば、CM SEPHAROSE (登録商標) Fast Flow (Amersham Biosciences, ニュージャージー州、ピスカタウェイ) が利用される。精製プロセスのあらゆる段階でhGHポリペプチドでのカチオノン交換カラムクロマトグラフィーを行って、実質的に精製されたhGHポリペプチドを単離することができる。このカチオノン交換クロマトグラフィー段階は、いずれかの適するカチオノン交換マトリックスを使用して行うことができる。有用なカチオノン交換マトリックスとしては、纖維状、多孔性、非多孔性、微粒子状、ビーズ状または架橋型カチオノン交換マトリックス材料が挙げられるが、これらに限定されない。こうしたカチオノン交換マトリックス材料としては、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリレート、ポリビニル、ポリスチレン、シリカ、ポリエーテル、または上記のいずれかの複合材料が挙げられるが、これらに限定されない。カチオノン交換マトリックスへのhGHポリペプチドの吸着後、実質的に精製されたhGHポリペプチドを、このマトリックスからhGHポリペプチドを排除するために十分な高さのpHまたはイオン強度を有するバッファとこのマトリックスを接触させることにより、溶離することができる。実質的に精製されたhGHポリペプチドの高pH溶離における使用に適する緩衝液としては、少なくとも約5mMから少なくとも約100mMの濃度にわたるクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ギ酸緩衝液、酢酸緩衝液、HPEES緩衝液およびMES緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

### 【0348】

逆相クロマトグラフィー 当業者に公知である適するプロトコルに従って、RP-HPLCを行って、タンパク質を精製することができる。例えば、Pearsonら、ANAL BIOCHEM. (1982) 124: 217-230 (1982); Rivierら、J. CHROM. (1983) 268: 112-119; Kunitanil、J. CHROM. (1986) 359: 391-402 参照。RP-HPLCをhGHポリペプチドで行って、実質的に精製されたhGHポリペプチドを単離することができる。これに関しては、少なくとも約C<sub>3</sub>から少なくとも約C<sub>30</sub>、少なくともC<sub>3</sub>から少なくともC<sub>20</sub>、または少なくともC<sub>3</sub>から少なくともC<sub>18</sub>樹脂をはじめとする（しかし、これらに限定されない）多種多様な長さのアルキル官能基を有するシリカ誘導体化樹脂を使用することができる。また、高分子樹脂を使用することができる。例えば、スチレンポリマー樹脂であるTosoHass Amberchrome CG1000sd樹脂を使用することができる。多種多様なアルキル鎖長を有するシアノまたは高分子樹脂も使用することができる。さらに、RP-HPLCカラムは、エタノールなどの溶媒で洗浄することができる。イオン対形成剤および有機改質剤、例えばメタノール、イソプロパノール、テ

10

20

30

40

50

トラヒドロフラン、アセトニトリルまたはエタノールを含有する、適する溶離緩衝液を使用して、RP-HPLCカラムからhGHポリペプチドを溶離することができる。最も一般的に使用されているイオン対形成剤としては、酢酸、ギ酸、過塩素酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、ヘプタフルオロ酪酸、トリエチルアミン、テトラメチルアンモニウム、テトラブチルアンモニウム、酢酸トリエチルアンモニウムが挙げられるが、これらに限定されない。溶離は、1つ以上の勾配またはイソクラティック条件を使用して行うことができ、分離時間を縮小し、ピーク幅を減少させる勾配条件のほうが好ましい。もう一つの方法は、異なる溶媒濃度範囲での2つの勾配の使用を伴う。ここでの使用に適する溶離緩衝液の例としては、酢酸アンモニウムおよびアセトニトリル溶液が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0349】

疎水性相互作用クロマトグラフィー精製法 疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)をhGHポリペプチドに対して行うことができる。一般には、HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS(Cat. No. 18-1020-90, Amersham Biosciences(ニュージャージー州、ピスカタウェイ)(これは、本明細書に参照により組み込まれている)参照。適するHICマトリックスとしては、アルキル置換もしくはアリール置換マトリックス、例えばブチル置換、ヘキシル置換、オクチル置換もしくはフェニル置換マトリックス[アガロース、架橋アガロース、セファロース、セルロース、シリカ、デキストラン、ポリスチレン、ポリ(メタクリレート)マトリックスを含むが、これらに限定されない]および混合型樹脂[ポリエチレンアミン樹脂またはブチル置換もしくはフェニル置換ポリ(メタクリレート)マトリックスを含むが、これらに限定されない]が挙げられるが、これらに限定されない。疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーのための市販の供給源としては、HITRAP(登録商標)、HIPREP(登録商標)、およびHILOAD(登録商標)カラム(ニュージャージー州、ピスカタウェイのAmersham Biosciences)が挙げられるが、これらに限定されない。簡単に言うと、負荷する前に、当業者に公知である標準的な緩衝液、例えば酢酸/塩化ナトリウム溶液または硫酸アンモニウム含有HEPESを使用して、HICカラムを平衡させることができる。hGHポリペプチドを負荷した後、標準的な緩衝液および条件を使用してこのカラムを洗浄して、望ましくない材料を除去するが、HICカラムにhGHポリペプチドは保持することができる。hGHポリペプチドは、約3から約10カラム量の標準的な緩衝液、例えば、数ある中でも、EDTAと平衡緩衝液より低い硫酸アンモニウム濃度とを含有するHEPES緩衝液、または酢酸/塩化ナトリウム緩衝液で溶離することができる。例えばリン酸カリウムの勾配を使用する漸減線形塩勾配を使用してhGH分子を溶離することもできる。この後、この溶離液は、例えばダイアフィルトレーションまたは限外濾過などの濾過によって、濃縮することができる。ダイアフィルトレーションを利用して、使用される塩を除去して、hGHポリペプチドを溶離することができる。

20

## 【0350】

他の精製法 例えばゲル濾過(本明細書に参照により組み込まれている、GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS(Cat. No. 18-1022-18, Amersham Biosciences, ニュージャージー州、ピスカタウェイ))、HPLC、膨張床吸着、限外濾過、ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥などを使用するさらにもう一つの単離段階を最初のhGHポリペプチド混合物またはこのあらゆる後成混合物に対して行って、あらゆる過剰な塩を除去し、この緩衝液を次の単離段階にまたは最終薬物生成の調合にさえ適する緩衝液で置換する。実質的に精製されたhGHポリペプチドを含むhGHポリペプチドの収量は、当業者に公知である技法を使用して、ここに記載の各段階でモニターすることができる。こうした技法を使用して、最終単離段階後に実質的に精製されたhGHポリペプチドの収量を評価することもできる。例えば、hGHポリペプチドの収量は、様々なアルキル鎖長を有する幾つかの逆

30

40

50

相高圧液体クロマトグラフィーのいずれか、例えば、シアノ R P - H P L C、C<sub>18</sub> R P - H P L C、ならびにカチオン交換 H P L C およびゲル濾過 H P L C を使用してモニターすることができる。

#### 【0351】

純度は、標準的な技法、例えば S D S - P A G E を使用して、またはウエスタンプロットおよび E L I S A アッセイを使用する h G H ポリペプチドの測定により、判定することができる。例えば、ポリクローナル抗体を、負調整型酵母発酵およびカチオン交換回収から単離したタンパク質に対して産生させることができる。これらの抗体は、宿主細胞への汚染の存在についてのプローブとして使用することもできる。

#### 【0352】

R P - H P L C 材料 V y d a c C 4 ( V y d a c ) は、表面に C 4 - アルキル鎖を有するシリカゲル粒子から成る。タンパク質性不純物と h G H ポリペプチドの分離は、これらの疎水性相互作用の強度の差に基づく。溶離は、希トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配で行う。分取 H P L C は、ステンレス鋼カラム ( 2 . 8 から 3 . 2 リットルの V y d a c C 4 シリカゲルを充填したもの ) を使用して行う。ヒドロキシアパタイト・ウルトロゲル ( Hydroxyapatite Ultragel ) 溶離液をトリフルオロ酢酸の添加により酸性化し、V y d a c C 4 カラムに負荷する。洗浄および溶離には、希トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル勾配を使用する。画分を回収し、リン酸緩衝液で直ちに中和する。I P C の範囲内にある h G H ポリペプチド画分をプールする。

#### 【0353】

D E A E Sepharose ( Pharmacia ) 材料は、S e p h a r o s e ピーズの表面に共有結合しているジエチルアミノエチル ( D E A E ) 基から成る。この D E A E 基への h G H ポリペプチドの結合は、イオン相互作用により媒介される。アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸はこのカラムを通過し、カラムに保持されない。これらの物質を洗い出した後、微量不純物を中性リン酸緩衝液で洗浄し、h G H ポリペプチドを漸増イオン強度の緩衝液で溶離する。このカラムに D E A E Sepharose fast flow を充填する。ゲル 1 m Lあたり h G H ポリペプチド 3 から 10 m g の範囲内での h G H ポリペプチドの負荷を確保するようにカラム量を調整する。このカラムを水および平衡緩衝液 ( リン酸ナトリウム / カリウム ) で洗浄する。H P L C 溶離液のプール画分を負荷し、このカラムを平衡緩衝液で洗浄する。次に、カラムを洗浄緩衝液 ( 酢酸ナトリウム緩衝液 ) で洗浄し、続いて平衡緩衝液で洗浄する。続いて、h G H ポリペプチドを溶離緩衝液 ( 塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム / カリウム ) でカラムから溶離し、マスター溶離プロフィールに従って单一画分で回収する。D E A E Sepharose カラムの溶離液をこの比導電率に調整する。得られた薬物は、滅菌濾過して T e f l o n 瓶に入れ、- 7 0 で保管する。

#### 【0354】

B r a d f o r d アッセイ、S D S - P A G E 、銀染色 S D S - P A G E 、クマシ染色 S D S - P A G E 、質量分析 ( M A L D I - T O F を含むが、これに限定されない ) および当業者に公知であるタンパク質を特性付けするための他の方法をはじめとする ( しかし、これらに限定されない ) 多種多様な方法および手順を利用して、1 つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を有する h G H ポリペプチドの収量および純度を評価することができる。

#### 【0355】

##### V I I I . 代替系での発現

非組換え宿主細胞、突然変異誘発宿主細胞または無細胞系においてタンパク質に非天然アミノ酸を導入するために、幾つの戦略が利用されている。これらの系は、本発明の h G H ポリペプチドを作製する際の使用にも適する。反応性側鎖、例えば L y s 、 C y s および T y r を有するアミノ酸の誘導体化により、リシンを N<sup>2</sup> - アセチル - リシンに転化させた。化学合成により、非天然アミノ酸を組み込むための直接的な方法も提供する。ペプチドフラグメントの酵素的ライゲーションおよび天然の化学的ライゲーションに対する最

10

20

30

40

50

近の開発により、より大きなタンパク質の作製が可能である。例えば、P. E. DawsonおよびS. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 923 (2000) 参照。所望の非天然アミノ酸で化学的にアシル化されたサブレッサ tRNAを、タンパク質生合成を支援することができるインビトロ抽出物に添加する一般的なインビオ生合成法を使用して、100を超える非天然アミノ酸が、実質的にあらゆるサイズの様々なタンパク質に部位特異的に組み込まれた。例えば、V. W. Cornish, D. Mendel and P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 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); およびJ. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013 - 8014 (1989) 参照。タンパク質の安定性、タンパク質フォールディング、酵素メカニズムおよびシグナル伝達の研究のために、広範な官能基がタンパク質に導入されている。

## 【0356】

野生型シンセターゼの乱交性を利用するため、選択圧型組み込み (selective pressure incorporation) と呼ばれるインビオ法が開発された。例えば、N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wengen, F. M. Dong, L. Moroder および R. Huber, FASEB J., 13: 41 (1999) 参照。特定の天然アミノ酸を細胞に供給する関連代謝経路が切断されている栄養要求性菌株を、限定濃度の非天然アミノ酸を含有する最少培地で成長させるが、ターゲット遺伝子の転写は抑制する。生育定期の開始時、天然アミノ酸を枯渇させ、非天然アミノ酸類似体で置換する。組換えタンパク質の発現の誘導により、この非天然アミノ酸を含有するタンパク質を蓄積させる。例えば、この戦略を用いて、o-、m- および p- フルオロフェニルアラニンがタンパク質に組み込まれており、これは、容易に特定することができるUVスペクトルの2つの特徴的な肩を示し [ 例えば、C. Minks, R. Huber, L. Moroder および N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284: 29 (2000) 参照 ] ; バクテリオファージ T4リゾチームにおいてトリフルオロメチオニンがメチオニンの代わりに用いられ、キトオリゴ糖リガンドとのこの相互作用が<sup>19</sup>F NMRにより研究されており [ 例えば、H. Duewel, E. Daub, V. Robinson および J. F. Honek, *Biochemistry*, 36: 3404 (1997) 参照 ] ; ならびにトリフルオロロイシンをロイシンの代わりに組み込まれ、この結果、ロイシン-ジッパートンパク質の熱および化学安定性が増加した [ 例えば、Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado および D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40: 1494 (2001) 参照 ] 。さらに、X線結晶学における相の溶解を助長するために、セレノメチオニンおよびテルロメチオニンが様々な組換えタンパク質に組み込まれている。例えば、W. A. Hendrickson, J. R. Horton および D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9: 1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1: 283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230: 788 (1995); および N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbach 50

er , A . Humm , L . Prade , T . Neuefeind , L . Moroder および R . Huber , J . Mol . Biol . , 270 : 616 ( 1997 ) 参照。アルケンまたはアルキン官能基を有するメチオニン類似体も効率的に組み込まれており、これにより、化学的手段によるタンパク質のさらなる変性が可能となった。例えば、J . C . M . van Hest および D . A . Tirrell , FEBS Lett . , 428 : 68 ( 1998 ) ; J . C . M . van Hest , K . L . Kiick and D . A . Tirrell , J . Am . Chem . Soc . , 122 : 1282 ( 2000 ) ; および K . L . Kiick and D . A . Tirrell , Tetrahedron , 56 : 9487 ( 2000 ) ; 米国特許第 6 , 586 , 207 号 ; 米国特許公開第 2002 / 0042097 号 参照 ( これらは、本明細書に参照により組み込まれている ) 。 10

### 【 0357 】

この方法の成功は、アミノアシル - t RNA シンセターゼによる非天然アミノ酸類似体の認識に依存し、これには、タンパク質翻訳の忠実度を保障する高度な選択性が、一般に必要とされる。この方法の範囲を拡大する一つの手段は、アミノアシル - t RNA シンセターゼの基質特異性を減少させることであり、これは、限られた事例で達成されている。例えば、大腸菌フェニルアラニン - r RNA シンセターゼ ( PheRS ) における Gly による Ala<sup>294</sup> の置換は、基質結合ポケットのサイズを増大させ、p - Cl - フェニルアラニン ( p - Cl - Phe ) による tRNA Phe のアシル化を生じさせる。M . Ibb a , P . Kast および H . Hennecke , Biochemistry , 33 : 7107 ( 1994 ) 参照。この突然変異体 PheRS を有する大腸菌株により、フェニルアラニンの代わりに p - Cl - フェニルアラニンまたは p - Br - フェニルアラニンを組み込むことができる。例えば、M . Ibb a および H . Hennecke , FEBS Lett . , 364 : 272 ( 1995 ) ; および N . Sharma , R . Furter , P . Kast および D . A . Tirrell , FEBS Lett . , 467 : 37 ( 2000 ) 参照。同様に、大腸菌チロシル - t RNA シンセターゼのアミノ酸結合部位近くでの点突然変異 Phe130Ser により、チロシンより効率的にアザチロシンを組み込むことができる事が、証明された。例えば、F . Hamano - Takaku , T . Iwama , S . Saito - Yano , K . Takaku , Y . Monden , M . Kitabatake , D . Soll および S . Nishimura , J . Biol . Chem . , 275 : 40324 ( 2000 ) 参照。 20

### 【 0358 】

非天然アミノ酸をインビオで組み込むためのもう一つの戦略は、校正メカニズムを有するシンセターゼの修飾である。これらのシンセターゼは、同源天然アミノ酸に構造的に類似しているアミノ酸を識別することができず、したがって、活性化することができない。このエラーは、別の部位で校正され、これにより、 tRNA から間違えて負荷されたアミノ酸が脱アシル化されて、タンパク質翻訳の適合性が維持される。このシンセターゼの校正活性が使用不能であると、間違えて活性化される構造類似体が、編集機能を免れて組み込まれることがある。このアプローチは、バリル - tRNA シンセターゼ ( ValRS ) で、最近、実証された。V . Doring , H . D . Mootz , L . A . Nangle , T . L . Hendrickson , V . de Crecy - Lagard , P . Schimmel および P . Marliere , Science , 292 : 501 ( 2001 ) 参照。ValRS は、Cys , Thr またはアミノブチレート ( Abu ) を有する tRNA Val を間違えてアミノアシル化することがあり、これらの非同源アミノ酸は、後に編集ドメインにより加水分解される。大腸菌染色体のランダム突然変異誘発後、ValRS の編集部位での突然変異を有する突然変異体大腸菌株が選択された。この修正欠陥 ValRS は、Cys を有する tRNA Val に間違って負荷する。Abu は、Cys と立体配置が似ている ( Cys の - SH 基が、Abu では - CH<sub>3</sub> で置換されている ) ため、突然変異体 ValRS は、この突然変異体大腸菌株を Abu の存在下で成長させると、タンパク質に Abu も組み込む。質量スペクトル分析は、天然タンパク質においてバリンの約 24 % が各バリン位置で Abu により置換されることを示す。 30

## 【0359】

固相合成および半合成法よっても、新規アミノ酸を含有する多数のタンパク質を合成することができる。例えば、次の出版物およびこれらの中に引用されている参考文献（以下のとおり）を参照：Crick, F. J. C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, *J. Am Chem*, 88(24): 5914-5919 (1966); Kaiser, E. T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc Chem Res*, 47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E. T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc*, 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); および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)。

## 【0360】

化学修飾を用いて、補助因子、スピニラベルおよびオリゴヌクレオチドをはじめとする様々な非天然側鎖がインピトロでタンパク質に導入された。例えば、Corey, D. R., Schultz, P. G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*, 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E. T., Lawrence, D. S., Rokita, S. E. The chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem*, 54: 565-595 (1985); Kaiser, E. T., Lawrence, D. S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*, 226(4674): 505-511 (1984); Neet, K. E., Nanci, A., Koshland, D. E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 243(24): 6392-6401 (1968); Polgar, L. B., M. L. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 3153-3154 (1966); およびPollack, S. J., Nakayama, G. Schultz, P. G. Introduction of nucleophiles and spect

rososcopic probes into antibody combining sites, *Science*, 242 (4881) : 1038 - 1040 (1988) 参照。

### 【0361】

また、化学変性されたアミノアシル-tRNAを利用する生合成法を用いて、幾つかの生物物理学的プローブが、インビトロで合成されたタンパク質に組み込まれた。以下の出版物およびこれらの中に引用されている参考文献を参照のこと: Brunner, J. N ew Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev. Biochem.*, 62 : 483 - 514 (1993); および Krieg, U. C., Walter, P., Hohnson, A. E. Photocro 10 sslinking 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)。

### 【0362】

以前、所望のアンバーナンセンス突然変異を有する遺伝子とのプログラムされたタンパク質合成反応に、化学的にアミノアシル化したサブレッサtRNAを付加させることにより、非天然アミノ酸をインビトロでタンパク質に部位特異的に組み込むことができる事が証明された。これらのアプローチを利用することにより、特定のアミノ酸に対して栄養要求性の株を用いて、20の共通アミノ酸の多数を構造的に近い相同体で、例えばフェニルアラニンをフルオロフェニルアラニンで、置換することができる。例えば、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ら、*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ら、*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.*, 301 : 336 (1992); および Mendel, D., Cornish, V. W. & Schultz, P. G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 435 - 62 (1995) 参照。

### 【0363】

例えば、停止コドンUAGを認識し、非天然アミノ酸で化学的にアミノアシル化されたサブレッサtRNAが、調製された。従来の部位特異的突然変異誘発を用いて、停止コドンTAGが、タンパク質遺伝子の対照と成る部位に導入された。例えば、Sayers, J. R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5', 3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, 16 (3) : 791 - 802 (1988) 参照。アシル化されたサブレッサtRNAと突然変異遺伝子をインビトロ転写/翻訳系において併せると、非天然アミノ酸がUA 50

Gコドンに応答して組み込まれ、これにより、特定位置にこのアミノ酸を有するタンパク質が得られた。[<sup>3</sup>H]-Pheを使用する実験および-UAGコドンにより指定された位置に組み込まれること、およびこのアミノ酸は、このタンパク質の他のいずれの部位にも組み込まれないことが実証された。例えば、Norenら、上記；Kobayashiら、(2003) *Nature Structural Biology* 10(6) : 425-432；およびElman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041) : 197-200(1992) 参照。

10

#### 【0364】

マイクロインジェクション技法も、非天然アミノ酸をタンパク質に組み込むために使用されている。例えば、M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty および H. A. Lester, *Science*, 268 : 439(1995)；および D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 : 645(2000) 参照。アフリカツメガエル卵母細胞を、インビトロで作製された2つのRNA種（対象となるアミノ酸位置にUAG停止コドンを有するターゲットタンパク質をコードするmRNA、および所望の非天然アミノ酸でアミノアシル化されたアンバーサブレッサtRNA）とともに共注入した。次に、この卵母細胞の翻訳機構により、この非天然アミノ酸がUAGにより指定された位置に挿入される。この方法は、インビトロ発現系には一般に従わない、膜内在性タンパク質のインビオ構造・機能研究を可能にした。例としては、蛍光共鳴エネルギー移動により距離を測定するためのタキキニンニューロキニン-2受容体への蛍光アミノ酸の組み込み [ 例えば、G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271 : 19991(1996) 参照 ]；イオンチャネル内の表面露出残基を特定するためのビオチニル化アミノ酸の組み込み [ 例えば、J. P. Gallivan, H. A. Lester および D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4 : 739(1997) 参照 ]；現時間でイオンチャネルにおける配座変化をモニターするためのケージドチロシン類似体の使用 [ 例えば、J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty および H. A. Lester, *Neuron*, 20 : 619(1998) 参照 ]；およびイオンチャネル骨格を変化させてこれらのゲーティングメカニズムを探査するためのアルファヒドロキシアミノ酸の使用 [ 例えば、P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Cell*, 96 : 89(1999)；および T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Y. Wang, *Nat. Neurosci.*, 4 : 239(2001) 参照 ] が挙げられる。

20

#### 【0365】

非天然アミノ酸をタンパク質にインビオで直接組み込むことにより、高い突然変異タンパク質収率、技術的な容易さ、細胞でまたはことによると生体で突然変異タンパク質を研究する可能性、および治療的処置におけるこれらの突然変異タンパク質の使用という利点が得られる。様々なサイズ、酸性度、求核性度、疎水性度および他の特性を有する非天然アミノ酸をタンパク質に含めることができることにより、タンパク質の機能の探査、新規特性を有する新たなタンパク質または生物の創作、両方のために、タンパク質の構造を合理的で、系統的に操作する能力を大いに拡大することができる。しかし、このプロセスは、タンパク質翻訳の高い忠実度の達成を必要とするtRNA-シンセターゼ相互作用の複雑な性質のため、困難である。

30

40

50

## 【0366】

パラ - F - Phe を部位特異的に組み込む一つの試みでは、酵母アンバーサプレッサ t RNA Phe CUA / フェニルアラニル - tRNA シンセターゼペアが、 p - F - Phe 耐性、 Phe 栄養要求性大腸菌株において使用された。例えば、 R . Furter , Protein Sci . , 7 : 419 ( 1998 ) 参照。

## 【0367】

無細胞 (インビトロ) 翻訳系を使用して、本発明の hGH ポリペプチドの発現を達成することができる。テンプレートとして mRNA (インビトロ翻訳) またはテンプレートとして DNA (インビトロ転写および翻訳の併用) 、いずれかを含むこれらの系において、リボソームによりインビトロ合成を直接行う。無細胞タンパク質発現系の開発には相当な努力が注がれている。例えば、 Kim , D . - M . and J . R . Swartz , Biotechnology and Bioengineering , 74 : 309 - 316 ( 2001 ) ; Kim , D . - M . and J . R . Swartz , Biotechnology Letters , 22 , 1537 - 1542 , ( 2000 ) ; Kim , D . - M . , and J . R . Swartz , Biotechnology Progress , 16 , 385 - 390 , ( 2000 ) ; Kim , D . - M . , and J . R . Swartz , Biotechnology and Bioengineering , 66 , 180 - 188 , ( 1999 ) ; および Patnaik , R . and J . R . Swartz , Biotechniques 24 , 862 - 868 , ( 1998 ) ; 米国特許第 6 , 337 , 191 号 ; 米国特許公開第 2002 / 0081660 号 ; 国際公開第 00 / 55353 号、同第 WO 90 / 05785 参照 ( これらは、本明細書に参照により組み込まれている ) 。天然にはコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドの発現に適用することができるもう一つのアプローチとしては、 mRNA - ペプチド融合法が挙げられる。例えば、 R . Roberts and J . Szostak , Proc . Natl Acad . Sci . ( USA ) 94 : 12297 - 12302 ( 1997 ) ; A . Frankelら、 Chemistry & Biology 10 : 1043 - 1050 ( 2003 ) 参照。このアプローチでは、ピューロマイシンに連結させた mRNA テンプレートをリボソームでペプチドに翻訳する。1つ以上の tRNA 分子を修飾すると、非天然アミノ酸もこのペプチドに組み込むことができる。最終 mRNA コドンが読み取られた後、ピューロマイシンは、このペプチドの C 末端を捕捉する。結果として生じた mRNA - ペプチドコンジュゲートが、インビトロアッセイで関心のある特性を有すると判明した場合、この素性は、この mRNA 配列から容易に明らかにすることができる。このようにして、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドのライブラリをスクリーニングして、所望の特性を有するポリペプチドを特定することができる。より最近、天然にはコードされないアミノ酸で置換されたペプチドを合成することができる精製成分でのインビトロリボソーム翻訳が、報告された。例えば、 A . Forsterら、 Proc . Natl Acad . Sci . ( USA ) 100 : 6353 ( 2003 ) 参照。

## 【0368】

I X . hGH ポリペプチドにカップリングさせた高分子ポリマー

本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドへの様々な修飾は、本明細書に記載の組成物、方法、技法および戦略を使用して行うことができる。これらの修飾としては、このポリペプチドの非天然アミノ酸成分へのさらなる官能基の組み込みが挙げられ、こうした官能基としては、ラベル；色素；ポリマー；水溶性ポリマー；ポリエチレングリコールの誘導体；光架橋剤；細胞毒性化合物；薬物；親和性ラベル；光親和性ラベル；反応性化合物；樹脂；第二タンパク質もしくはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体；抗体もしくは抗原フラグメント；金属キレート化剤；補助因子；脂肪酸；炭水化物；ポリヌクレオチド；DNA ； RNA ；アンチセンスポリヌクレオチド；抑制リボ核酸；生体材料；ナノ粒子；スピルラベル；蛍光体；金属含有部分；放射性部分；新規官能基；他の分子と共有結合性もしくは非共有結合性相互作用をする基；光ケージド部分；光異性体化性部分；ビ

オチン；ビオチンの誘導体；ビオチン類似体；重原子を組み込む部分；化学分解性の基；光分解性の基；延長された側鎖；炭素に連結した糖；レドックス活性剤；アミノチオ酸；毒性部分；同位元素で標識された部分；生物物理学的プローブ；リン光基；化学発光基；高電子密度の基；磁性を有する基；介在基；発色団；エネルギー変換因子；生物活性因子；検出可能ラベル；小分子；または上記のあらゆる組合せ、または他のいずれかの望ましい化合物もしくは物質が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の組成物、方法、技法および戦略の実例となる非限定的な例として、以下の説明は、そこに記載されている組成物、方法、技法および戦略が、上に挙げたものをはじめとする（しかし、これらに限定されない）他の官能基の付加にも適用することができる（必要に応じて適切な修飾を伴い、また、当業者が本明細書における開示を用いて行うことができる）という理解で、非天然アミノ酸への高分子ポリマーの付加に焦点を合わせた。

10

## 【0369】

多種多様な高分子ポリマーおよび他の分子を本発明の hGH ポリペプチドに連結させて、この hGH ポリペプチドの生物学的特性を調節し、および／またはこの hGH 分子に新たな生物学的特性をもたらすことができる。これらの高分子ポリマーは、天然にコードされるアミノ酸により、天然にはコードされないアミノ酸により、または天然もしくは非天然アミノ酸のいずれかの官能性置換基、または天然もしくは非天然アミノ酸に付加させたいずれかの置換基もしくは官能基により、hGH ポリペプチドに連結させることができる。

20

## 【0370】

本発明は、ポリマー：タンパク質コンジュゲートの実質的に均質な製剤を提供する。ここで用いる「実質的に均質な」とは、ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子が、全タンパク質の半分より多く観察されることを意味する。ポリマー：タンパク質コンジュゲートは、生物活性を有し、本明細書において提供する本「実質的に均質な」PEG 化 hGH ポリペプチド製剤は、均質製剤の利点、例えばロットごとの薬物動態を予測できることでの臨床適用の容易さ、を示すほど均質であるものである。

## 【0371】

ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子の混合物の調製も選択することができ、本明細書において提供する利点は、この混合物に含めるモノ-ポリマー：タンパク質コンジュゲートの比率を選択できるということである。従って、所望される場合には、取り付けられているポリマー部分の数が様々である（すなわち、ジ-、トリ-、テトラ-、など）様々なタンパク質の混合物を調製することができ、前記コンジュゲートと本発明の方法を使用して調製されたモノ-ポリマー：タンパク質コンジュゲートとを併せることができ、および混合物を所定のモノ-ポリマー：タンパク質コンジュゲート比にすることができる。

30

## 【0372】

選択されるポリマーは、それを取り付けるタンパク質が水性環境、例えば生理環境で沈殿しないように、水溶性であり得る。ポリマーは、分枝状であってもよいし、非分枝状であってもよい。好ましくは、最終製品製剤の治療使用のために、ポリマーは、医薬的に許容されるであろう。

## 【0373】

40

ポリエチレングリコール分子のタンパク質分子に対する比率により、反応混合物中のこれらの濃度を意のままに変えられるであろう。一般に、（過剰な未反応タンパク質またはポリマーが最少である反応効率という点で）最適な比率は、選択されるポリエチレングリコールの分子量により、および利用可能な有効反応性基の数を基に、決定することができる。分子量に関連して、典型的に、ポリマーの分子量が高いほど、このタンパク質に取り付けることができるポリマー分子の数は少ない。同様に、これらのパラメータを最適化する際、ポリマーの分枝を考慮しなければならない。一般に、分子量が高いほど（分枝が多いほど）、ポリマー：タンパク質比は高い。

## 【0374】

ここで用いる場合、および PEG : hGH ポリペプチドコンジュゲートを考えるとき、

50

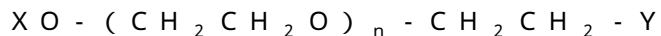
用語「治療有効量」は、患者に恩恵をもたらす、ヘマトクリットで増加を生じさせる量を指す。この量は、個体ごとに異なり、患者の健康状態および貧血の基礎原因をはじめとする多数の因子に依存するであろう。例えば、慢性腎不全に罹患している患者についての h G H ポリペプチドの治療有効量は、週 3 回の 50 から 150 単位 / kg である。治療に使用される h G H ポリペプチドの量により、許容可能なヘマトクリット増加率が得られ、このヘマトクリットが有益なレベル（通常は少なくとも約 30%、典型的には 30% から 36% の範囲）で維持される。当業者は、公的に利用できる材料および手順を用いて、本組成物の治療有効量を容易に突きとめることができる。

## 【 0375 】

水溶性ポリマーは、線状、分岐状または分枝状をはじめとする（しかし、これらに限定されない）あらゆる構造であり得る。典型的に、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンギリコール）、例えば、ポリ（エチレンギリコール）（PEG）であるが、他の水溶性ポリマーも利用することができる。例として、PEG を使用して、本発明の一定の実施態様を説明する。

## 【 0376 】

PEG は、周知である水溶性ポリマーであり、これは、市販されており、または当該技術分野において周知である方法に従ってエチレンギリコールの開環重合により調製することができる（Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138 - 161）。用語「PEG」は、サイズまたはこのPEG末端における修飾にかかわらず、あらゆるポリエチレンギリコール分子を包含するために幅広く使用し、ならびに h G H ポリペプチドに連結されている場合、式：



（式中、n は、2 から 10,000 であり、X は、H であるか、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキルをはじめとする（しかし、これに限定されない）末端修飾である）により表すことができる。

## 【 0377 】

場合によっては、本発明で使用するPEG は、一方の末端がヒドロキシまたはメトキシで終わっている。すなわち、X は、H または CH<sub>3</sub> である（「メトキシPEG」）。また、PEG は、反応性基で終わっており、この結果、二官能性ポリマーを形成することができる。典型的な反応性基としては、20 の共通アミノ酸において見出される官能基と反応するために一般に使用される反応性基（マレイミド基、活性化カーボネート（p - ニトロフェニルエステルを含むが、これに限定されない）、活性化エステル（N - ヒドロキシクシンイミド、p - ニトロフェニルエステルを含むが、これらに限定されない）およびアルデヒドを含むが、これらに限定されない）ならびに 20 の共通アミノ酸への挿入物であるが、天然にはコードされないアミノ酸中に存在する相補性官能基（アジド基、アルキレン基を含むが、これらに限定されない）と特異的に反応する官能基を挙げることができる。上の式中、Y で示されているPEG の他の末端が、h G H ポリペプチドに直接、または天然にはコードされないアミノ酸により間接的に取り付けられるであろうことに注目される。例えば、Y は、ポリペプチドのアミン基（リシンのイブシロンアミンまたは N 末端を含むが、これらに限定されない）へのアミド、カルバメートまたは尿素リンケージであり得る。また、Y は、チオール基（システインのチオール基を含むが、これに限定されない）へのマレイミドリンクエージであり得る。また、Y は、20 の共通アミノ酸により一般に接近できない残基へのリンクエージであり得る。例えば、PEG 上のアジド基を h G H ポリペプチド上のアルキン基と反応させて、Huigen [3 + 2] 付加環化生成物を形成することができる。また、PEG 上のアルキン基を天然にはコードされないアミノ酸中に存在するアジド基と反応させて、同様の基を形成することができる。一部の実施態様において、強い求核分子（ヒドラジン、ヒドロジド、ヒドロキシルアミン、セミカルバジドを含むが、これらに限定されない）を天然にはコードされないアミノ酸中のアルデヒドまたはケトン基と反応させて、ヒドラゾン、オキシムまたはセミカルバゾンを形成することができ

10

20

30

40

50

き、適用可能な場合には、場合によっては適切な還元剤での処理によりそれをさらに還元することができる。また、強い求核分子を天然にはコードされないアミノ酸によりhGHポリペプチドに組み込み、この水溶性ポリマー中に存在するケトンまたはアルデヒド基と優先的に反応させるために使用することができる。

#### 【0378】

PEGについての分子量は、実際の望みどおりに使用することができ、これは、望みどおりに約100ダルトン(Da)から100,000Daまたはそれ以上(時として、0.1から50kDaまたは10から40-kDaを含むが、これらに限定されない)を含むが、これらに限定されない。各鎖が1から100kDa(1から50kDaまたは5から20kDaを含むが、これらに限定されない)の範囲のMWを有するPEG分子をはじめとする(しかし、これらに限定されない)分枝鎖PEGも使用することができる。多種多様なPEG分子が、the Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog(これらは、本明細書に参照により組み込まれており、これらを含むが、これらに限定されない)に記載されている。10

#### 【0379】

一般に、PEG分子の少なくとも1つの末端は、天然にはコードされないアミノ酸との反応に利用することができる。例えば、アミノ酸側鎖との反応のためのアルキンおよびアジド部分を有するPEG誘導体を使用して、本明細書に記載するように、天然にはコードされないアミノ酸にPEGを取り付けることができる。この天然にはコードされないアミノ酸が、アジドを含む場合には、PEGは、[3+2]付加環化生成物を形成させるアルキン部分、またはアミドリンケージを形成させるホスフィン基を含有する活性化PEG種(すなわち、エステル、カーボネート)、いずれかを典型的に含有するであろう。また、この天然にはコードされないアミノ酸が、アルキンを含む場合には、PEGは、[3+2]Huisgen付加環化生成物を形成させるアジド部分を典型的に含有するであろう。この天然にはコードされないアミノ酸が、カルボニル基を含む場合、典型的にはPEGが、強力な求核分子(ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミンまたはセミカルバジド官能基を含むが、これらに限定されない)を典型的には含んで、ヒドラゾン、オキシムおよびセミカルバゾンリンケージをそれぞれ形成させるであろう。他の代替では、上に記載した反応性基の配向の逆を用いることができる。すなわち、天然にはコードされないアミノ酸中のアジド部分をアルキン含有PEG誘導体と反応させることができる。20

#### 【0380】

一部の実施態様において、PEG誘導体を有するhGHポリペプチド変異体は、この天然にはコードされないアミノ酸の側鎖上に存在する化学官能基と反応性である化学官能基を含有する。

#### 【0381】

本発明は、一部の実施態様において、約800Daから約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格を含むアジド含有およびアセチル含有ポリマー誘導体を提供する。この水溶性ポリマーのポリマー骨格は、ポリ(エチレングリコール)であり得る。しかし、ポリ(エチレン)グリコールおよび他の関連ポリマー[ポリ(デキストラン)およびポリ(プロピレングリコール)を含むが、これらに限定されない]をはじめとする(しかし、これらに限定されない)多種多様な水溶性ポリマーも、本発明を実施する際に使用に適すること、ならびにPEGまたはポリ(エチレングリコール)の使用が、すべてのこうした分子を包含するおよび含むと解釈することは、理解されるはずである。用語PEGは、二官能性PEG、マルチアームPEG、誘導体化PEG、分岐PEG、分枝PEG、ペンダントPEG(すなわち、このポリマー骨格に1つ以上の案の浮きペンダントを有するPEGまたは関連ポリマー)またはこの中に分解性リンクエージを有するPEGをはじめとする、このあらゆる形態でのポリ(エチレングリコール)を含むが、これらに限定されない。40

#### 【0382】

10

20

30

40

50

P E Gは、典型的には、透明で、無色で、無臭で、水溶性で、熱安定性で、多数の化学薬剤に対して不活性であり、加水分解および劣化せず、ならびに一般に非毒性である。ポリ(エチレングリコール)は、生体適合性である、すなわち、P E Gは、傷害をもたらすことなく生体組織または生体と共に存できると考えられている。より具体的には、P E Gは、実質的に非免疫原性であり、すなわち、P E Gは、抗体において免疫応答を生じさせる傾向がない。体内で何らかの望ましい機能を有する分子、例えば生物活性因子、に取り付けられると、P E Gは、この因子をマスクする傾向があり、ならびに生物がこの因子の存在に耐えることができるようあらゆる免疫応答を低減または排除することができる。P E Gコンジュゲートは、実質的な免疫応答を生じさせない、または凝固もしくは他の望ましくない作用を生じさせない傾向がある。式 $\text{---CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{---}$ (式中、nは、約3から約4000、典型的には約20から約2000である)を有するP E Gは、本発明での使用に適する。約800Daから約100,000Daの分子量を有するP E Gは、本発明の一部の実施態様において、ポリマー骨格として特に有用である。

### 【0383】

このポリマー骨格は、線状であってもよいし、分枝状であってもよい。分枝ポリマー骨格は、当該技術分野において一般に公知である。典型的に、分枝ポリマーは、中心枝コア部分およびこの中心枝コアに連結された多数の線状ポリマー鎖を有する。P E Gは、分枝形態で一般に使用され、これは、エチレンオキシドを、様々なポリオール、例えばグリセロール、グリセロールオリゴマー、ペントエリトリトールおよびソルビトールに付加させることにより調製することができる。中心枝コア部分は、幾つかのアミノ酸、例えばリシン、から誘導することもできる。分枝ポリ(エチレングリコール)は、R(-PEG-OH)<sub>m</sub>(式中、Rは、コア部分、例えばグリセロール、グリセロールオリゴマーまたはペントエリトリトールから誘導され、ならびにmは、アームの数を表す)のような一般式で表すことができる。マルチアームP E G分枝、例えば、米国特許第5,932,462号、同第5,643,575号、同第5,229,490号、同第4,289,872号;米国特許出願第2003/0143596号;国際公開第96/21469号および同第93/21259号(これらの各々が、本明細書に参照により組み込まれている)も、ポリマー骨格として使用することができる。

### 【0384】

分枝P E Gは、PEG(-YCHZ<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(式中、Yは、連結基であり、ならびにZは、被定義長の原子鎖によりCHに連結された活性化末端基である)により表される分岐P E Gの形態であってもよい。

### 【0385】

さらにもう一つの分枝形態、ペンドントP E Gは、PEG鎖の末端ではなくPEG骨格に沿ってカルボキシルなどの反応性基を有する。

### 【0386】

PEGのこれらの形態に加えて、骨格内に弱いまたは分解性のリンクエージを有するポリマーも調製することができる。例えば、加水分解を受けるポリマー骨格内のエステルリンクエージを有するPEGを調製することができる。下に示すように、この加水分解により、このポリマーは低分子量のフラグメントに分解する:



用語ポリ(エチレングリコール)またはPEGが、本明細書に開示するものを含む(しかし、これらに限定されない)当該技術分野において公知であるすべての形態を表す、または包含することは、当業者には理解される。

### 【0387】

多数の他のポリマーも、本発明での使用に適する。一部の実施態様において、2から約300の末端を有する水溶性のポリマー骨格が、本発明において特に有用である。適するポリマーの例としては、他のポリ(アルキレングリコール)、例えばポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)、これらのコポリマー(エチレングリコールとプロピレングリ

コールのコポリマーを含むが、これらに限定されない)、これらのターポリマー、およびこれらの混合物などが挙げられる。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、様々であり得るが、典型的には約800Daから約100,000Da、多くの場合、約6,000Daから約80,000Daの範囲内である。

### 【0388】

実質的に水溶性の骨格についての上記リストが、決して排他的ではなく、単なる実例であること、ならびに上に記載した特質を有するすべての高分子材料が、本発明での使用に適すると考えられることは、通常の当業者には理解されるであろう。

### 【0389】

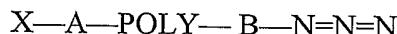
本発明の一部の実施態様において、ポリマー誘導体は、「多官能性」であり、これは、このポリマー骨格が、官能基で官能化または活性化された少なくとも2つの末端およびことによると300もの多さの末端を有すること意味する。多官能性ポリマー誘導体としては、2つの末端を有し、各末端が官能基に結合しており、この官能基が、同じであってもよいし、異なっていてもよい線状ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

### 【0390】

一つの実施態様において、ポリマー誘導体は、構造：

### 【0391】

### 【化17】



10

20

(式中、

N = N = N は、アジド部分であり；

B は、連結基であり、これは、存在してもよいし、不在であってもよく；

POLY は、水溶性非抗原性ポリマーであり；

A は、連結部分であり、これは、存在してもよいし、不在であってもよく、B と同じであってもよいし、異なっていてもよく；ならびに

X は、第二の官能基である)

を有する。A および B についての連結部分の例としては、18個以下、さらに好ましくは1個から10個の間の炭素原子を含有する多重官能化アルキル基が挙げられるが、これらに限定されない。窒素、酸素または硫黄などのヘテロ原子をアルキル鎖とともに含めることができる。このアルキル鎖は、ヘテロ原子で枝分れしていてもよい。A および B についての連結部分の他の例としては、10個以下、さらに好ましくは5個から6個の炭素原子を含有する多重官能化アリール基が挙げられるが、これに限定されない。このアリール基は、1つ以上の炭素原子、窒素、酸素または硫黄原子で置換されていてもよい。適する連結基の他の例としては、米国特許第5,932,462号、同第5,643,575号；および米国特許出願公開第2003/0143596号（これの各々が、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている連結基が挙げられるが、これらに限定されない。連結部分についての上記リストが、決して排他的ではなく、単なる実例であること、ならびに上に記載した特質を有するすべての連結部分が、本発明での使用に適すると考えられることは、通常の当業者には理解されるであろう。

30

40

### 【0392】

X としての使用に適する官能基の例としては、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アルコキシ、活性エステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよび1-ベンゾトリニアゾールエステル、活性カーボネート、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートおよび1-ベンゾトリニアゾールカーボネート、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護アミン、ヒドラジン、保護ヒドラジン、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレート、アルケン、ケトンおよびアジドが挙げ

50

られるが、これらに限定されない。当業者には理解されるように、選択されるX部分は、アジド基との反応が発生しないように、アジド基と相溶性でなければならない。アジド含有ポリマー誘導体は、ホモ二官能性であり得、これは、第二の官能基(すなわち、X)もアジド部分であることを意味し、またはヘテロ二官能性であり得、これは、第二の官能基が、異なる官能基であることを意味する。

### 【0393】

用語「保護されている」は、一定の条件下での化学反応性官能基の反応を防止する保護基または保護部分の存在を指す。保護基は、保護される化学反応基のタイプに依存して変わるものである。例えば、この化学反応性基が、アミンまたはヒドラジンである場合、保護基は、t-ブチルオキシカルボニル(t-Boc)および9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)から成る群より選択することができる。この化学反応性基が、チオールである場合、保護基は、オルトピリジルジスルフィドであり得る。この化学反応性基が、カルボン酸、例えば酪酸またはプロピオン酸、であるか、ヒドロキシル基である場合、保護基は、ベンジルまたはアルキル基、例えばメチル、エチルもしくはt-ブチルであり得る。当該技術分野において公知である他の保護基も、本発明で使用することができる。  
10

### 【0394】

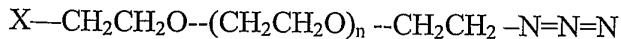
文献中の末端官能基の具体的な例としては、N-スクシンイミジルカーボネート(例えば、米国特許第5,281,698号、同第5,468,478号参照)、アミン(例えば、Buckmannら.Makromol.Chem.182:1379(1981)、Zaplijskyら.Eur.Polym.J.19:1177(1983)参照)、ヒドラジド(例えば、Andreszら.Makromol.Chem.179:301(1978)参照)、スクシンイミジルプロピオネートおよびスクシンイミジルブタノエート(例えば、Olsonら.in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zaplijsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997参照；米国特許第5,672,662号も参照)、スクシンイミジルスクシネート(例えば、Abuchowskiら.Cancer Biomed.Biophys.7:175(1984)およびJoppichら.Macrolol.Chem.180:1381(1979)参照)、スクシンイミジルエステル(例えば、米国特許第4,670,417号参照)、ベンゾトリアゾールカーボネート(例えば、米国特許第5,650,234号参照)、グリシジルエーテル(例えば、Pithaら.Eur.J.Biochem.94:11(1979)、Ellingsら.Bio tech.Appl.Biochem.13:354(1991)参照)、オキシカルボニルイミダゾール(例えば、Beauchampら.Anal.Biochem.131:25(1983)、Tondelliら.J.Controlled Release 1:251(1985)参照)、p-ニトロフェニルカーボネート(例えば、Veronesiら.Appl.Biochem.Biotech.,11:141(1985)；およびSartoreら.Appl.Biochem.Biotech.,27:45(1991)参照)、アルデヒド(例えば、Harrisら.J.Polymer Sci.Chem.Ed.22:341(1984)、米国特許第5,824,784号、同第5,252,714号参照)、マレイミド(例えば、Goodsonら.Bio/Tech nology 8:343(1990)、Romaniniら.in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29(1984)参照)、およびKogan, Synthetic Comm.22:2417(1992)参照)、オルトピリジル-ジスルフィド(例えば、Woghirenら.Bioconj.Chem.4:314(1993)参照)、アクリロール(例えば、Sawhneyら.Macromolecules,26:581(1993)参照)、ビニルスルホン(例えば、米国特許第5,900,461号参照)が挙げられるが、これらに限定されない。上記参考文献および特許のすべてが、本明細書に参照により組み込まれている。  
20  
30  
40

### 【0395】

本発明の一定の実施態様において、本発明のポリマー誘導体は、構造：

【0396】

【化18】



(式中、

Xは、上に記載したような官能基であり；および

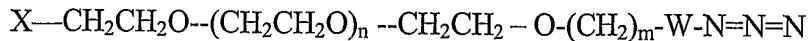
nは、約20から約4000である)

を有するポリマー骨格を含む。もう一つの実施態様において、本発明のポリマー誘導体は  
、構造：

10

【0397】

【化19】



(式中、

Wは、1から10個の間の炭素原子を含む脂肪族または芳香族リンカー部分であり；

nは、約20から約4000であり；

Xは、上に記載したような官能基であり；

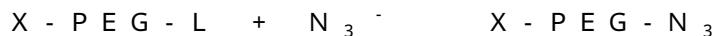
mは、1と10の間である)

を有するポリマー骨格を含む。

20

【0398】

本発明のアジド含有PEG誘導体は、当該技術分野において公知である、および／または本明細書に開示する様々な方法により調製することができる。下に示す一つの方法では、約800Daから約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格であって、第一官能基に結合した第一末端および適する脱離基に結合した第二末端を有するポリマー骨格を、アジドアニオン（これは、ナトリウム、カリウムおよびt-ブチルアンモニウムなどをはじめとする多数の適する対イオンのいずれかと対を形成することができる）と反応させる。この脱離基が、求核置換を受け、アジド部分により置換されることにより、所望のアジド含有PEGポリマーが生じる。



30

【0399】

示したように、本発明での使用に適するポリマー骨格は、式X-PEG-Lを有し、この式中のPEGは、ポリ(エチレングリコール)であり、Xは、アジド基と反応しない官能基であり、Lは、適する脱離基である。適する官能基の例としては、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アセタール、アルケニル、アミン、アミノオキシ、保護アミン、保護ヒドラジン、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、マレイミド、ジチオピリジンおよびビニルピリジン、ならびにケトンが挙げられるが、これらに限定されない。適する脱離基の例としては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシレート、トレシレートおよびトシレートが挙げられるが、これらに限定されない。

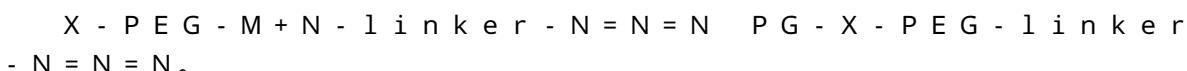
【0400】

40

本発明のアジド含有ポリマーのもう一つの調製方法では、アジド官能基を有するカップリング剤を、約800Daから約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格と接触させて（ここで、前記カップリング剤は、PEGポリマー上の化学官能基と選択的に反応するであろう）、アジド含有ポリマー誘導体生成物を形成する（この場合、前記アジドは、連結基による前記ポリマー骨格と分けられている）。

【0401】

反応図式の一具体例を下に示す：



(図式中、

50

P E Gは、ポリ(エチレンギリコール)であり、Xは、アルコキシなどのキャッピング基または上に記載したような官能基であり；ならびに

Mは、アジド官能基と反応性ではないが、N官能基とは効率的および選択的に反応するであろう官能基である)。

#### 【0402】

適する官能基の具体例としては、Nが、アミンである場合、カルボン酸、カーボネートまたは活性エステルであるM；Nが、ヒドラジンまたはアミノオキシ部分である場合、ケトンであるM；Nが、求核分子である場合、脱離基であるMが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0403】

粗生成物の精製は、生成物の沈殿、必要に応じてこの後のクロマトグラフィー、をはじめとする(しかし、これに限定されない)周知の方法により達成することができる。

#### 【0404】

アミンのうちの1つが、t-ブチル-Bocなどの保護基部分により保護され、結果として生じる一保護PEGジアミンが、アジド官能基を有する連結部分と反応する、PEGジアミンの場合のより具体的な例を下に示す：



#### 【0405】

この例では、様々な活性化剤、例えば塩化チオニルまたはカルボジイミド試薬、およびN-ヒドロキシスクシンイミドまたはN-ヒドロキシベンゾトリアゾールを使用することによりアミン基をカルボン酸とカップリングさせて、モノアミンPEG誘導体とアジドをゆするリンカー部分との間にアミド結合を生じさせることができる。アミド結合の形成成功後、結果として生じたN-t-ブチルBoc保護アジド含有誘導体を直接使用して、生体活性分子を修飾するか、さらに手を加えて他の有用な官能基を導入することができる。例えば、N-t-Boc基を強酸の処理により加水分解して、オメガ-アミノ-PEG-アジドを生じさせることができる。結果として生じたアミンを合成ハンドルとして使用して、価値のあるヘテロ二官能性試薬を生じさせるための他の有用な官能基、例えばマレイミド基、活性化ジスルフィドおよび活性化エステルなどを導入することができる。

#### 【0406】

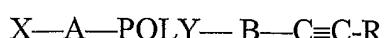
ヘテロ二官能性誘導体は、ポリマーの各末端に異なる分子を取り付けることが望まれる場合、特に有用である。例えば、オメガ-アミノ-PEGは、活性求電子基、例えばアルデヒド、ケトン、活性エステルおよび活性カーボネートなど、を有する分子をPEGの1つの末端に取り付け、アセチレン基を有する分子をPEGの他の末端に取り付けることができる。

#### 【0407】

本発明のもう一つの実施態様において、ポリマー誘導体は、構造：

#### 【0408】

#### 【化20】



(この構造中、

Rは、Hであるか、アルキル、アルケン、アルコキシまたはアリールもしくは置換アリール基であり；

Bは、連結部分であり、これは、存在してもよいし、不在であってもよく；

POLYは、水溶性非抗原性ポリマーであり；

Aは、連結部分であり、これは、存在してもよいし、不在であってもよく、およびBと同じであってもよいし、異なっていてもよく；

Xは、第二の官能基である)

を有する。

#### 【0409】

10

20

30

40

50

A および B の連結部分の例としては、18個以下、さらに好ましくは1個から10個の間の炭素原子を含有する多重官能化アルキル基が挙げられるが、これらに限定されない。窒素、酸素または硫黄などのヘテロ原子をアルキル鎖とともに含めることができる。このアルキル鎖は、ヘテロ原子で枝分れしていてもよい。A および B についての連結部分の他の例としては、10個以下、さらに好ましくは5個から6個の炭素原子を含有する多重官能化アリール基が挙げられるが、これに限定されない。このアリール基は、1つ以上の炭素原子、窒素、酸素または硫黄原子で置換されていてもよい。適する連結基の他の例としては、米国特許第5,932,462号、同第5,643,575号；および米国特許出願公開第2003/0143596号（これの各々が、本明細書に参照により組み込まれている）に記載されている連結基が挙げられるが、これらに限定されない。連結部分についての上記リストが、決して排他的ではなく、単なる実例であること、ならびに上に記載した特質を有する多種多様な連結部分が、本発明での使用に適すると考えられることは、通常の当業者には理解されるであろう。

## 【0410】

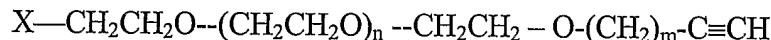
Xとしての使用に適する官能基の例としては、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アルコキシ、活性エステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルおよび1-ベンゾトリアゾールエステル、活性カーボネート、例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートおよび1-ベンゾトリアゾリルカーボネート、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護アミン、ヒドラジン、保護ヒドラジン、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレート、アルケン、ケトンおよびアセチレンが挙げられる。理解されるであろうこととして、選択されるX部分は、アセチレン基との反応が発生しないように、アセチレン基と相溶性でなければならない。アセチレン含有ポリマー誘導体は、ホモ二官能性であり得、これは、第二の官能基（すなわち、X）もアセチル部分であることを意味し、またはヘテロ二官能性であり得、これは、第二の官能基が、異なる官能基であることを意味する。

## 【0411】

本発明のもう一つの実施態様において、ポリマー誘導体は、構造：

## 【0412】

## 【化21】



(この構造中、

Xは、上に記載したような官能基であり；

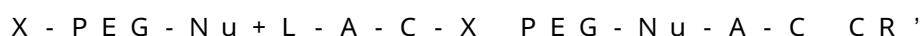
nは、約20から約4000であり；

mは、1と10の間である)

を有するポリマー骨格を含む。各二官能性PEGポリマーの具体的な例を下に示す。

## 【0413】

本発明のアセチレン含有PEG誘導体は、当業者に公知である、および/または本明細書に開示する方法を使用して調製することができる。一つの方法において、約800Daから約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格であって、第一官能基に結合した第一末端および適する求核基に結合した第二末端を有するポリマー骨格を、アセチレン官能基とPEG上の求核基との反応に適する脱離基との両方を有する化合物と反応させる。求核部分を有するPEGポリマーと脱離基を有する分子を併せると、脱離基が求核置換されて、求核部分により置換され、これにより、所望のアセチレン含有ポリマーが生じる。



## 【0414】

10

20

30

40

50

示したように、本発明での使用に好ましいポリマーは、式 X - P E G - N u を有し、この式中の P E G は、ポリ(エチレンギリコール)であり、N u は、求核部分であり、および X は、N u、L またはアセチレン官能基と反応しない官能基である。

#### 【0415】

N u の例としては、S N 2 型メカニズムにより主として反応するであろう、アミン、アルコキシ、アリールオキシ、スルフヒドリル、イミノ、カルボキシレート、ヒドラジン、アミノオキシ基が挙げられるが、これらに限定されない。N u 基の追加例としては、主として求核付加反応により反応するであろう官能基が挙げられるが、これらに限定されない。L 基の例としては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシレート、トレシレート、トシレート、および求核置換を受けると予想される他の基、ならびにケトン、アルデヒド、チオエステル、オレフィン、アルファ-ベータ不飽和カルボニル基、カーボネート、および求核試薬による付加を受けると予想される他の求電子基が挙げられる。10

#### 【0416】

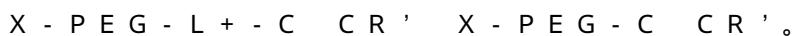
本発明のもう一つの実施態様において、A は、炭素原子数が 1 から 10 個の間の脂肪族リンカーまたは炭素原子数が 6 から 14 の間の置換アリール環である。X は、アジド基と反応しない官能基であり、L は、適する脱離基である。

#### 【0417】

本発明のアセチレン含有ポリマー誘導体のもう一つの調製方法では、約 800 D a から約 100,000 D a の平均分子量を有し、1 つの末端に保護基またはキャッピング基を有し、他の末端に適する脱離基を有する P E G ポリマーを、アセチレンアニオンと接触させる。20

#### 【0418】

反応図式の具体例を下に示す：



(この図式中、

P E G は、ポリ(エチレンギリコール)であり、および X は、アルコキシなどのキャッピング基であるか、上に記載したような官能基であり；

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

#### 【0419】

上の例において、脱離基 L は、十分な濃度のアセチレンアニオンと接触させたときに、S N 2 型置換を受けるために十分な活性を有さなければならない。アセチレンによる脱離基の S N 2 置換を達成するために必要な反応条件は、当該技術分野において周知である。30

#### 【0420】

粗生成物の精製は、生成物の沈殿、必要に応じてこの後のクロマトグラフィー、をはじめとする(しかし、これに限定されない)当該技術分野において公知である方法によって、通常、達成することができる。

#### 【0421】

水溶性ポリマーを本発明の h G H ポリペプチドに連結させることができる。この水溶性ポリマーは、本 h G H ポリペプチドに組み込まれた天然にはコードされないアミノ酸により連結されてもよいし、または天然にはコードされないもしくは天然にコードされるアミノ酸のいずれかの官能基もしくは置換基、または天然にはコードされないもしくは天然にコードされるアミノ酸に付加しているいかの官能基もしくは置換基により連結されてもよい。また、水溶性ポリマーは、天然にはコードされないアミノ酸が組み込まれている h G H ポリペプチドに、自然発生アミノ酸(N末端残基のシステイン、リシンまたはアミン基を含むが、これらに限定されない)により連結させる。場合によっては、本発明の h G H ポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の非天然アミノ酸を含み、この場合、1 つ以上の天然にはコードされないアミノ酸が、水溶性ポリマー(複数を含む)(P E G および/またはオリゴ糖を含むが、これらに限定されない)に連結されている。場合によっては、本発明の h G H ポリペプチドは、水溶性ポリマーに連結された40501

、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の天然にはコードされないアミノ酸をさらに含む。場合によっては、本発明のhGHポリペプチドは、水溶性ポリマーに連結された1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸、および水溶性ポリマーに連結された1つ以上の自然発生アミノ酸を含む。一部の実施態様において、本発明において用いる水溶性ポリマーは、このコンジュゲート形態を基準にしてhGHポリペプチドの半減期を増加させる。

#### 【0422】

本発明のhGHポリペプチドに連結する水溶性ポリマーの数（すなわち、PEG化またはグリコシル化の程度）は、薬理学的、薬物動態学的または薬力学的特性、例えばインビボ半減期、の変更（増加または減少を含むが、これらに限定されない）をもたらすように調整することができる。一部の実施態様において、hGHの半減期は、未修飾ポリペプチドより、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90-パーセント、2倍、5倍、10倍、50倍、または少なくとも約100倍増加される。10

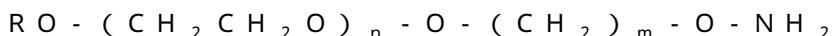
#### 【0423】

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

本発明の一つの実施態様において、カルボキシを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、PEG骨格に直接連結されている末端ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド部分を含有するPEG誘導体で修飾される。20

#### 【0424】

一部の実施態様において、ヒドロキシルアミン末端PEG誘導体は、構造：



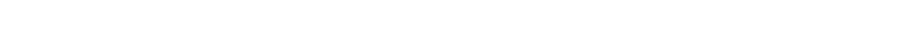
(この構造中、

Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である（すなわち、平均分子量は、5から40kDaの間である）

を有するであろう。

#### 【0425】

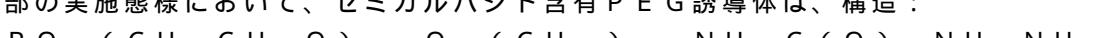
一部の実施態様において、ヒドラジン含有またはヒドラジド含有PEG誘導体は、構造30：



(この構造中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり；mは、2から10であり；nは、100から1,000であり；およびXは、場合によりカルボニル基（C=O）であり、これは存在してもよいし、不在であってもよい）  
を有するであろう。

#### 【0426】

一部の実施態様において、セミカルバジド含有PEG誘導体は、構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である)40

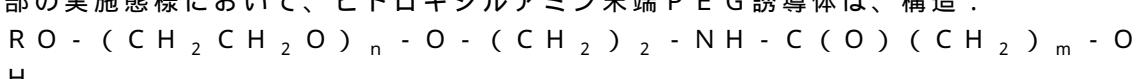
を有するであろう。

#### 【0427】

本発明のもう一つの実施態様において、カルボニル含有アミノ酸を含むhGHポリペプチドは、アミドリンクージによりPEG骨格に連結されている、末端ヒドロキシルアミン、ヒドラジド、ヒドラジンまたはセミカルバジド部分を含有するPEGで修飾される。

#### 【0428】

一部の実施態様において、ヒドロキシルアミン末端PEG誘導体は、構造：

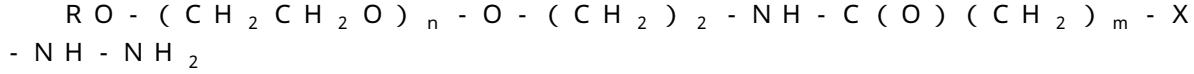


(この構造式中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である(すなわち、平均分子量は、5から40kDaの間である))

を有する。

#### 【0429】

一部の実施態様において、ヒドラジン含有またはヒドラジド含有PEG誘導体は、構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり；mは、2から10であり；nは、100から1,000であり；およびXは、場合によりカルボニル基(C=O)であり、これは存在してもよいし、不在であってもよい)

を有する。

#### 【0430】

一部の実施態様において、セミカルバジド含有PEG誘導体は、構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である)

を有する。

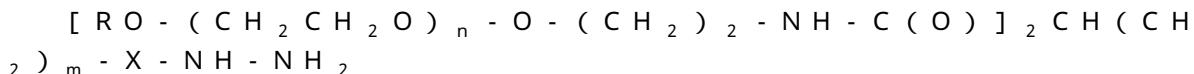
10

#### 【0431】

本発明のもう一つの実施態様において、カルボニル含有アミノ酸を含むhGHポリペプチドは、末端ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド部分を含有する分枝PEGで修飾され、この分枝PEGの各鎖は、10から40kDa、さらに好ましくは5から20kDaの範囲のMWを有する。

#### 【0432】

本発明のもう一つの実施態様において、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、分枝構造を有するPEG誘導体で修飾される。例えば、一部の実施態様において、ヒドラジン末端またはヒドラジド末端PEG誘導体は、次の構造：



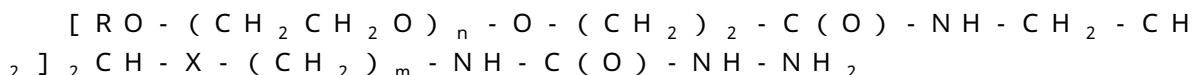
(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり；mは、2から10であり；nは、100から1,000であり；およびXは、場合によりカルボニル基(C=O)であり、これは存在してもよいし、不在であってもよい)

を有するであろう。

20

#### 【0433】

一部の実施態様において、セミカルバジド基を含有するPEG誘導体は、構造：



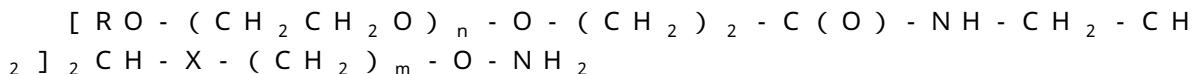
(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、Xは、場合により、NH、O、S、C(O)であるか、存在せず、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である)

を有するであろう。

40

#### 【0434】

一部の実施態様において、ヒドロキシルアミン基を含有するPEG誘導体は、構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、Xは、場合により、NH、O、S、C(O)であるか、存在せず、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である)

50

を有するであろう。

【0435】

水溶性ポリマーをhGHポリペプチドに連結させる程度および部位により、Site IのhGHポリペプチド受容体へIhGHポリペプチドの結合を調節することができる。一部の実施態様では、hGHについてのSpencerら、J.Biol.Chem., 263:7862-7867(1988)に記載されているような平衡結合アッセイにより測定して、約400nMまたはそれ以下のK<sub>d</sub>で、150nMまたはそれ以下のK<sub>d</sub>で、および場合によっては100nMまたはそれ以下のK<sub>d</sub>で、hGHポリペプチドが、Site IのhGHポリペプチド受容体に結合するように、リンクエージをアレンジする。

【0436】

ポリマーの活性化ならびにペプチドのコンジュゲーションについての方法および化学は、文献に記載されており、当該技術分野において公知である。ポリマーの活性化に一般に使用される方法としては、臭化シアン、過ヨウ素酸塩、グルタルアルデヒド、ビエポキシド、エピクロロヒドリン、ジビニルスルホン、カルボジイミド、ハロゲン化スルホニル、トリクロロトリアジンなどでの官能基の活性化が挙げられるが、これらに限定されない(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ら, (1993), IMMobilized AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L.ら、Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991参照)。

【0437】

PEGの官能化およびコンジュゲーションに関する幾つかの総説およびモノグラフは、利用することができる。例えば、Harris, Macromol.Chem.Phys. C25:325-373(1985); Scouten, Methods in Enzymology 135:30-65(1987); Wongら、Enzyme Microbiol.Technol. 14:866-874(1992); Delgadoら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304(1992); Zalipsky, Biocconjugate Chem. 6:150-165(1995)参照。

【0438】

ポリマーの活性化方法は、国際公開第94/17039号、米国特許第5,324,844号、国際公開第94/18247号、同第94/04193号、米国特許第5,219,564号、同第5,122,614号、国際公開第90/13540号、米国特許第5,281,698号および国際公開第93/15189号においても見つけることができ、ならびにCoagulation Factor VII (国際公開第94/15625)、ヘモグロビン(国際公開第94/09027)、酸素担持分子(米国特許第4,412,989号)、リボヌクレアーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ(Veroneseら、App.Biochem.Biotech. 11:141-45(1985))をはじめとする酵素と活性ポリマーとの間のコンジュゲーション方法も見つけることができる。引用したすべての参考文献および特許は、本明細書に参照により組み込まれている。

【0439】

天然にはコードされないアミノ酸、例えばp-アジド-L-フェニルアラニンを含有するhGHポリペプチドのPEG化(すなわち、いずれかの水溶性ポリマーの付加)は、従来のいずれかの方法により行う。例えば、hGHポリペプチドは、アルキン基を末端に

10

20

30

40

50

有するmPEG誘導体でPEG化される。簡単に言うと、攪拌しながら、室温で、過剰な固体mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>≡</sub>CHを、p-アジド-L-Phenyl含有hGHポリペプチドの水溶液に添加する。典型的に、この水溶液は、反応が行われることとなるpH(一般には約4から10)付近のpK<sub>a</sub>を有する緩衝液で、緩衝される。例えばPH7.5でのPEG化に適する緩衝液の例としては、HEPES、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、TRIS-HCl、EPPSおよびTESが挙げられるが、これらに限定されない。pHは、継続的にモニターし、必要に応じて調整する。この反応は、典型的に、約1から48時間の間、継続することができる。

## 【0440】

この後、反応生成物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに付して、遊離mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>≡</sub>CH、および非ブロック化PEGがこの分子の両末端で活性化され、この結果、hGHポリペプチド変異体分子が架橋されたときに形成し得る高分子量のPEG化hGHポリペプチド複合体から、PEG化hGHポリペプチド変異体を分離する。疎水性相互作用クロマトグラフィー中の条件は、遊離mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>≡</sub>CHが、カラムから流出する一方で、1つ以上のPEG基にコンジュゲートした1つのhGHポリペプチド変異体分子を含有する所望の形態が溶離された後、架橋PEG化hGHポリペプチド変異体複合体が溶離されるような条件である。適する条件は、所望のコンジュゲートに対する架橋複合体の相対サイズに依存して変化し、また当業者により容易に決定される。所望のコンジュゲートを含有する溶離物を限外濾過によって濃縮し、ダイアフィルトレーションによって脱塩する。

## 【0441】

必要な場合には、疎水性クロマトグラフィーから得られたPEG化hGHポリペプチドを、親和性クロマトグラフィー；アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー(DAE SEPHAROSEを使用するものを含むが、これに限定されない)；シリカでのクロマトグラフィー；逆相HPLC；ゲル濾過(SEPHADEX G-75を使用するものを含むが、これに限定されない)；疎水性相互作用クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー；金属キレートクロマトグラフィー；限外濾過/ダイアフィルトレーション；エタノール沈降法；硫酸アンモニウム沈降法；クロマトフォーカッシング；置換クロマトグラフィー；電気泳動手順(分取等電点分画電気泳動法を含むが、これに限定されない)または抽出をはじめとする(しかし、これらに限定されない)当業者に公知である1つ以上の手順により、さらに精製することができる。見掛けの分子量は、球状タンパク質標準物質との比較によりGPCによって概算することができる(PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH(Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306)。hGH-PEGコンジュゲートの純度は、タンパク溶解性分解(トリプシン分解を含むが、これに限定されない)、この後の質量スペクトル分析により評価することができる。Pepinsky B.ら、J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3): 1059-66(2001)。

## 【0442】

本発明のhGHポリペプチドのアミノ酸に連結される水溶性ポリマーは、限定ではないが、さらに誘導体化または置換することができる。

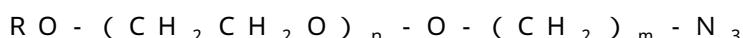
## 【0443】

アジド含有PEG誘導体

本発明のもう一つの実施態様において、hGHポリペプチドは、天然にはコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアルキン部分と反応するであろうアジド部分を含有するPEG誘導体で修飾される。一般に、このPEG誘導体は、1から100kDa一部の実施態様では10から40kDaの平均分子量を有するであろう。

## 【0444】

一部の実施態様において、アジド末端PEG誘導体は、構造：



10

20

30

40

50

(この構造式中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である(すなわち、平均分子量は、5から40kDaの間である))

を有するであろう。

#### 【0445】

もう一つの実施態様において、アジド末端PEG誘導体は、構造：

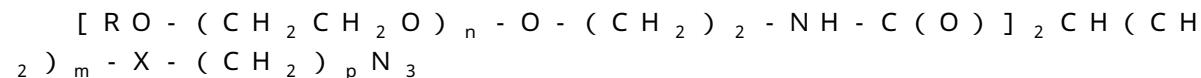


(この構造式中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは、2から10であり、pは、2から10であり、およびnは、100から1,000である(すなわち、平均分子量は、5から40kDaの間である))

を有するであろう。

#### 【0446】

本発明のもう一つの実施態様において、アルキン含有アミノ酸を含むhGHポリペプチドは、末端アジド部分を含有する分枝PEG誘導体で修飾され、この分枝PEGの各鎖は、10から40kDa、カルボキサミド5から20kDaの範囲のMWを有する。例えば、一部の実施態様において、アジド末端PEG誘導体は、次の構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり；mは、2から10であり；Pは、2から10であり；nは、100から1,000であり；およびXは、場合により、O、N、Sまたはカルボニル基(C=O)であり、これは、各場合、存在してもよいし、不在であってもよい)

を有するであろう。

#### 【0447】

##### アルキン含有PEG誘導体

本発明のもう一つの実施態様において、hGHポリペプチドは、天然にはコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアジド部分と反応するであろうアルキン部分を含有するPEG誘導体で修飾される。

#### 【0448】

一部の実施態様において、アルキン末端PEG誘導体は、次の構造：



(この構造式中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは、2から10であり、およびnは、100から1,000である(すなわち、平均分子量は、5から40kDaの間である))

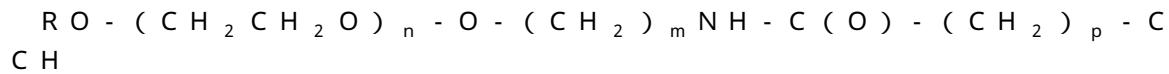
を有するであろう。

#### 【0449】

本発明のもう一つの実施態様において、アルキンを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、アミドリンケージによりPEG骨格に連結されている末端アジドまたは末端アルキン部分を含有するPEG誘導体で修飾される。

#### 【0450】

一部の実施態様において、アルキン末端PEG誘導体は、次の構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり；mは、2から10であり；Pは、2から10であり；nは、100から1,000である)

を有するであろう。

#### 【0451】

本発明のもう一つの実施態様において、アジド含有アミノ酸を含むhGHポリペプチドは、末端アルキン部分を含有する分枝PEG誘導体で修飾され、この分枝PEGの各鎖は

10

20

30

40

50

、10から40kDa、さらに好ましくは5から20kDaの範囲のMWを有する。例えば、一部の実施態様において、アルキン末端PEG誘導体は、次の構造：



(この構造中、Rは、単純アルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり;mは、2から10であり;Pは、2から10であり;nは、100から1,000であり;およびXは、場合により、O、N、Sまたはカルボニル基(C=O)であるか、存在しない)を有するであろう。

#### 【0452】

##### ホスフィン含有PEG誘導体

10

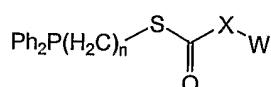
本発明のもう一つの実施態様において、hGHポリペプチドは、活性官能基(エステル、カーボネートを含むが、これらに限定されない)を含有し、この天然にはコードされないアミノ酸の側鎖上に存在するアジド部分と反応するであろうアリールホスフィン基をさらに含むPEG誘導体で修飾される。一般に、PEG誘導体は、1から100kDa、一部の実施態様では10から40kDaの範囲の平均分子量を有するであろう。

#### 【0453】

一部の実施態様において、このPEG誘導体は、構造：

#### 【0454】

#### 【化22】



20

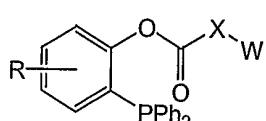
(この構造中、nは、1から10であり;Xは、O、NもしくはSであり得、または存在しなくてもよく;Phは、フェニルであり;およびWは、水溶性ポリマーである)を有するであろう。

#### 【0455】

一部の実施態様において、このPEG誘導体は、構造：

#### 【0456】

#### 【化23】



30

(式中、Xは、O、NもしくはSであり得、または存在しなくてもよく;Phは、フェニルであり;Wは、水溶性ポリマーであり、ならびにRは、H、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリール基であり得る)を有するであろう。R基の具体例としては、-CH<sub>2</sub>、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-C(O)R'、-CONR'R''、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-CNおよび-NO<sub>2</sub>が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR''''は、各々、独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール(1から3個のハロゲンで置換されたアリールを含むが、これに限定されない)、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が、例えば1つより多くのR基を含む場合、これらのR基の各々は、R'、R''、R'''およびR''''基の1つより多くが存在するときの各R'、R''、R'''およびR''''基であるように、独立して選択される。R'およびR''が、同じ窒素原子に取り付けられる場合、これらは、この窒素原子と組み合わざって、5、6または7員環を形成することができる。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含む(しかし、これらに限定されない)ものと考える。置換基に関する上の論議から、用語「アルキル」を、水素基

40

を有するであろう。R基の具体例としては、-CH<sub>2</sub>、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-C(O)R'、-CONR'R''、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-CNおよび-NO<sub>2</sub>が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR''''は、各々、独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール(1から3個のハロゲンで置換されたアリールを含むが、これに限定されない)、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が、例えば1つより多くのR基を含む場合、これらのR基の各々は、R'、R''、R'''およびR''''基の1つより多くが存在するときの各R'、R''、R'''およびR''''基であるように、独立して選択される。R'およびR''が、同じ窒素原子に取り付けられる場合、これらは、この窒素原子と組み合わざって、5、6または7員環を形成することができる。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含む(しかし、これらに限定されない)ものと考える。置換基に関する上の論議から、用語「アルキル」を、水素基

50

以外の基に結合している基(炭素原子を含む)、例えば、ハロアルキル(-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>および-C(H<sub>2</sub>)CF<sub>3</sub>を含むがこれらに限定されない)およびアシリル(-C(O)CH<sub>3</sub>、-C(O)CF<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>などを含むがこれらに限定されない)を包含するものと考えることは、当業者には理解されるであろう。

#### 【0457】

##### 他のPEG誘導体および一般PEG化技法

hGHポリペプチドに連結させることができるPEG分子ならびにPEG化方法の他の具体例としては、例えば、米国特許公開第2004/0001838号；同第2002/0052009号；同第2003/0162949号；同第2004/0013637号；同第2003/0228274号；同第2003/0220447号；同第2003/0158333号；同第2003/0143596号；同第2003/0114647号；同第2003/0105275号；同第2003/0105224号；同第2003/0023023号；同第2002/0156047号；同第2002/0099133号；同第2002/0086939号；同第2002/0082345号；同第2002/0072573号；同第2002/0052430号；同第2002/0040076号；同第2002/0037949号；同第2002/0002250号；同第2001/0056171号；同第2001/0044526号；同第2001/0027217号；同第2001/0021763号；米国特許第6,646,110号；同第5,824,778号；同第5,476,653号；同第5,219,564号；同第5,629,384号；同第5,736,625号；同第4,902,502号；同第5,281,698号；同第5,122,614号；同第5,473,034号；同第5,516,673号；同第5,382,657号；同第6,552,167号；同第6,610,281号；同第6,515,100号；同第6,461,603号；同第6,436,386号；同第6,214,966号；同第5,990,237号；同第5,900,461号；同第5,739,208号；同第5,672,662号；同第5,446,090号；同第5,808,096号；同第5,612,460号；同第5,324,844号；同第5,252,714号；同第6,420,339号；同第6,201,072号；同第6,451,346号；同第6,306,821号；同第5,559,213号；同第5,612,460号；同第5,747,646号；同第5,834,594号；同第5,849,860号；同第5,980,948号；同第6,004,573号；同第6,129,912号、国際公開第97/32607号、EP229,108、EP402,378、国際公開第92/16555号、同第94/04193号、同第94/14758号、同第94/17039号、同第94/18247号、同第94/28024号、同第95/00162号、同第95/11924、同95/13090号、同第95/33490号、同第96/00080号、同第97/18832号、同第98/41562号、同第98/48837号、同第99/32134号、同第99/32139号、同第99/32140号、同第96/40791号、同第98/32466号、同第95/06058、EP439508号、国際公開第97/03106号、同第96/21469号、同第95/13312、EP921131号、国際公開第98/05363号、EP809996号、国際公開第96/41813号、同第96/07670、EP605963、EP510356、EP400472、EP183503およびEP154316(これらは、本明細書に参照により組み込まれている)に記載されているものが挙げられる。本明細書に記載するPEG分子はいずれも、1本鎖、分枝鎖、マルチアーム鎖、一官能性、二官能性、多官能性またはこれらのあらゆる組合せをはじめとする(しかし、これらに限定されない)あらゆる形態で使用することができる。

#### 【0458】

##### 血清アルブミンに対する親和性の強化

様々な分子を本発明のhGHポリペプチドに融合させて、血清中のhGHポリペプチドの半減期を調節することができる。一部の実施態様において、分子を本発明のhGHポリペプチドに連結または融合させて、動物における内在性血清アルブミンに対する親和性を

強化する。

**【0459】**

例えれば、場合によっては、hGHポリペプチドとアルブミン結合配列の組換え融合体を作製する。アルブミン結合配列の具体例としては、連鎖球菌Gタンパクからのアルブミン結合ドメイン（例えれば、Makridesら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 534-542 (1996) およびSjolanderら、J. Immunol. Methods 201: 115-123 (1997) 参照）または例えれば、Dennissら、J. Biol. Chem. 277: 35035-35043 (2002) に記載されているものなどのアルブミン結合ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【0460】**

他の実施態様において、本発明のhGHポリペプチドは、脂肪酸でアシル化される。場合によっては、これらの脂肪酸が、血清アルブミンへの結合を促進する。例えれば、Kurtzhalsら、Biochem. J. 312: 725-731 (1995) 参照。

**【0461】**

他の実施態様において、本発明のhGHポリペプチドは、血清アルブミン（ヒト血清アルブミンを含むが、これに限定されない）と直接融合させる。多種多様な他の分子も本発明においてhGHに連結させて、血清アルブミンまたは他の血清成分への結合を調節することができることは、当業者には理解されるであろう。

**【0462】**

20

X. hGHポリペプチドのグリコシル化

本発明は、糖残基を有する1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸が組み込まれているhGHポリペプチドを包含する。これらの糖残基は、天然のもの（N-アセチルグルコサミンを含むが、これに限定されない）であってもよいし、非天然のもの（3-フルオロガラクトースを含むが、これに限定されない）であってもよい。糖は、NまたはO連結型グリコシドリンクージ（N-アセチルガラクトース-L-セリンを含むが、これに限定されない）または天然でないリンクージ（オキシムまたは対応するCもしくはS連結型グリコシド）のいずれかにより、天然にはコードされないアミノ酸に連結させることができる。

**【0463】**

30

糖（グリコシルを含むが、これに限定されない）部分は、インビボまたはインビトロでhGHポリペプチドに付加させることができる。本発明の一部の実施態様では、カルボニルを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドを、アミノオキシ基で誘導体化した糖で修飾して、オキシムリンクージにより連結された対応するグリコシル化ポリペプチドを生じさせる。天然にはコードされないアミノ酸に取り付けたら、グリコシルトランスフェラーゼおよび他の酵素での処理により糖にさらに手を加えて、hGHポリペプチドに結合したオリゴ糖を生じさせることができる。例えれば、H. Liuら、J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003) 参照。

**【0464】**

40

本発明の一部の実施態様において、カルボニルを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、アミノオキシ誘導体として調製された被定義構造を有するグリカンで直接修飾される。アジド、アルキン、ヒドラジド、ヒドラジンおよびセミカルバジドをはじめとする他の官能基を使用して、天然にはコードされないアミノ酸に糖を連結させることは、当業者には理解されるであろう。

**【0465】**

本発明の一部の実施態様において、アジドまたはアルキニルを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、この後、アルキニルまたはアジド誘導体（これらを含むが、これらに限定されない）それぞれとのHuisingen [3+2] 付加環化反応（これを含むが、これに限定されない）により修飾することができる。この方法により、タンパク質を極めて高い選択性で修飾することができる。

50

## 【0466】

## X I . G H 超遺伝子ファミリーメンバー二量体および多量体

本発明は、G H 超遺伝子ファミリーメンバーの組合せ（h G H を含むが、これに限定されない）ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体（すなわち、三量体、四量体など）にも備えており、この場合、G H 超遺伝子ファミリーメンバーポリペプチド、例えば、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を含有するh G H は、別のG H 超遺伝子ファミリーメンバーもしくはこの変異体または（非G H 超遺伝子ファミリーメンバーもしくはこの変異体である）他のいずれかのペプチドに、このペプチド骨格に直接、またはリンカーにより、結合されている。単量体と比較して増加される分子量のため、G H 超遺伝子ファミリーメンバー、例えばh G H の二量体または多量体コンジュゲートは<sup>10</sup>、単量体G H 超遺伝子ファミリーメンバーを基準にして、異なる薬理学的特性、薬物動態学的特性、薬力学的特性、調節された治療的半減期または調節された血漿半減期をはじめとする新しいまたは望ましい特性を示すことができる。一部の実施態様において、本発明のG H 超遺伝子ファミリーメンバー、例えばh G H の二量体は、G H 超遺伝子ファイミリーメンバー受容体の二量体化を調節するであろう。他の実施態様において、本発明のG H 超遺伝子ファミリーメンバー二量体または多量体は、G H 超遺伝子ファミリーメンバー受容体拮抗薬、作動薬または調節因子として作用するであろう。

## 【0467】

一部の実施態様において、h G H 含有二量体または多量体中に存在する1つ以上のh G H 分子は、Site I I 結合領域内に存在する水溶性ポリマーに連結した天然にはコードされないアミノ酸を含む。従って、二量体または多量体のh G H 分子の各々は、このSite I 界面によるh G H ポリペプチド受容体への結合には利用しやすいが、Site I I 界面による第二のh G H ポリペプチド受容体への結合には利用することができない。このように、h G H ポリペプチド二量体または多量体は、2つの別個のh G H ポリペプチド受容体のSite I 結合部位に係合するが、このh G H 分子は、Site I I 領域内に存在する遺伝的にコードされないアミノ酸に取り付けられた水溶性ポリマーを有するので、これらのh G H ポリペプチド受容体は、h G H ポリペプチドリガンドのSite I I 領域には係合できず、この二量体または多量体は、h G H ポリペプチド拮抗薬として作用する。一部の実施態様では、h G H ポリペプチド含有二量体または多量体中に存在する1つ以上のh G H 分子は、Site I 結合領域内に存在する水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含み、これにより、Site I I 領域に結合することができる。また、一部の実施態様において、h G H ポリペプチド含有二量体または多量体中に存在する1つ以上のh G H 分子が、Site I およびSite I I 結合領域の両方を結合に利用できるようにSite I またはSite I I 結合領域内ではない部位に存在する水溶性ポリマーに連結された天然にはコードされないアミノ酸を含む。一部の実施態様では、結合に利用できるSite I 、Site I I または両方を有するh G H 分子の組合せが用いられる。少なくとも1つの分子が、結合に利用できるSite I を有し、および少なくとも1つの分子が、結合に利用できるSite I I を有するh G H 分子の組合せにより、所望の活性または特性を有する分子を生じさせることができる。加えて、結合に利用できるSite I およびSite I I の両方を有するh G H 分子の組合せにより、超作動薬h G H 分子を生じさせることができる。<sup>30</sup><sup>40</sup>

## 【0468】

一部の実施態様において、G H 超遺伝子ファミリーメンバーポリペプチドは、Asn-Lys アミドリンケージまたはCys-Cys ジスルフィドリンケージにより（これらを含むが、これらに限定されない）直接連結させる。一部の実施態様において、連結されたG H 超遺伝子ファミリーメンバーポリペプチド、および/または連結された非G H 超遺伝子ファミリーメンバーは、二量体化を助長するように異なる天然にはコードされないアミノ酸を含むであろう（これは、第一h G H ポリペプチドの天然にはコードされない1つのアミノ酸中のアルキンと第二G H 超遺伝子ファミリーメンバーの天然にはコードされない第二のアミノ酸中のアジドが、Huisingen [3+2]付加環化によりコンジュゲート<sup>50</sup>

するであろうということを含むが、これに限定されない）。また、第一 G H 超遺伝子ファミリーメンバー、および／または連結された非 G H 超遺伝子ファミリーメンバー、ケトンを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含むポリペプチドは、ヒドロキシルアミンを含有する天然にはコードされないアミノ酸を含む第二の G H 超遺伝子ファミリーメンバーポリペプチドにコンジュゲートすることができ、これらのポリペプチドは、対応するオキシムの形成を経て反応させる。

#### 【 0 4 6 9 】

また、2つのG H 超遺伝子ファミリーメンバーポリペプチド、および／または連結された非 G H 超遺伝子ファミリーメンバーをリンカーにより連結させる。いずれかのヘテロまたはホモ二官能性リンカーを使用して、2つのG H 超遺伝子ファミリーメンバー、および／または連結された非 G H 超遺伝子ファミリーメンバー、同じ一次配列を有してもよいし、異なる一次配列を有してもよいポリペプチドを連結させることができる。場合によっては、G H 超遺伝子ファミリーメンバー、および／または連結された非 G H 超遺伝子ファミリーメンバー、ポリペプチドを共につなぐために使用されるリンカーは、二官能性 P E G 試薬であり得る。

10

#### 【 0 4 7 0 】

一部の実施態様において、本発明は、a) ポリマー骨格の少なくとも第一末端上のアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミンまたはカルボニル含有部分；およびb) このポリマー骨格の第二末端上の少なくとも第二官能基を含む、ダンベル構造を有する水溶性二官能性リンカーを提供する。この第二官能基は、第一官能基と同じであってもよいし、異なっていてもよい。この第二官能基は、一部の実施態様では、第一官能基と反応性ではない。一部の実施態様において、本発明は、分枝状分子構造の少なくとも1つのアームを含む水溶性化合物を提供する。例えば、この分枝状分子構造は、樹枝状であり得る。

20

#### 【 0 4 7 1 】

一部の実施態様において、本発明は、構造：



(この構造中、nは、約5から3,000であり、mは、2から10であり、Xはmアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、アミノオキシ基、ヒドロキシルアミン、アセチルまたはカルボニル含有部分であり得、およびRは、Xと同じであってもよいし異なっていてもよい、キャッシング基、官能基または脱離基である)

30

を有する水溶性活性ポリマーとの反応により形成される、1つ以上のG H 超遺伝子ファミリーメンバー、例えばh G H 、を含む多量体を提供する。Rは、例えば、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アルコキシ、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、1-ベンゾトリアゾールエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、1-ベンゾトリアゾリルカーボネート、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護アミン、ヒドラジン、保護ヒドラジン、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エボキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレートおよびトレシレート、アルケン、ならびにケトンから成る群より選択される官能基であり得る。

40

#### 【 0 4 7 2 】

X I I . h G H ポリペプチド活性およびh G H ポリペプチド受容体に対するh G H ポリペプチドの親和性の測定

h G H 受容体は、McFarlandら、Science, 245: 494-499 (1989) およびLeung, D.ら、Nature, 330: 537-543 (1987) に記載されているように調製することができる。h G H ポリペプチド活性は、用準的なインピトロまたはインビオアッセイを使用して判定することができる。例えば、h G H の存在下で増殖する細胞系（例えば、h F H 受容体またはラクトゲン性受容体を発現す

50

る細胞系)を使用して、hGH受容体結合をモニターすることができる。例えば、Clark, R.ら、J. Biol. Chem. 271(36):21969(1996); Wadaら、Mol. Endocrinol. 12:146-156(1998); Gout, P.W.ら、Cancer Res. 40, 2433-2436(1980); 国際公開第99/03887号参照。天然でないアミノ酸を含む非PEG化hGHポリペプチドについては、BIAcore(商標)バイオセンサ(Pharmacia)を使用することによりこのホルモンのこの受容体に対する親和性を測定することができる。例えば、米国特許第5,849,535号; Spencer, S.A.ら、J. Biol. Chem., 263:7862-7867(1988)参照。hGH活性を検査するためにインビオ動物モデルとしては、例えば、Clarkら、J. Biol. Chem. 271(36):21969-21977(1996)に記載されているものが挙げられる。1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの二量体化能力についてのアッセイは、Cunningham, B.ら、Science, 254:821-825(1991)およびFuh, G.ら、Science, 256:1677-1680(1992)に記載されているように行うことができる。引用したすべての参考文献および特許は、本明細書に参照により組み込まれている。

## 【0473】

アッセイ方法論についての上記コンパイルおよび参考文献は、排他的ではなく、当業者は、所望の最終結果のための検査に有用な他のアッセイを認識するであろう。

## 【0474】

## XIII. 効力、機能的インビオ半減期および薬物動態パラメータの測定

本発明の重要な態様は、水溶性ポリマー部分へのコンジュゲーションを伴うまたは伴わない、hGHポリペプチドの構築により得られる長期生体半減期である。hGHポリペプチド血清濃度の急速な低下が、hGHポリペプチドを、コンジュゲートしたおよびコンジュゲートしていないhGHポリペプチドおよびこれらの変異体での治療への生体応答の評価に重要なものにした。好ましくは、本発明のコンジュゲートしたおよびコンジュゲートしていないhGHポリペプチドおよびこれらの変異体は、静脈内投与後も長期血清半減期を有し、これにより、例えば、ELISA法または一次スクリーニングアッセイによる測定が可能となる。BioSource International(カリフォルニア州、カマリロ)またはDiagnostic Systems Laboratories(テキサス州、ウェブスター)いずれかからのELISAまたはRIAキットを使用することができる。インビオ生体半減期の測定は、本明細書に記載するとおり行うことができる。

## 【0475】

天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの効能および機能的インビオ半減期は、Clark, R.ら、J. Biol. Chem. 271, 36, 21969-21977(1996)に記載されているプロトコルに従って判定することができる。

## 【0476】

天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドについての薬物動態パラメータは、正常な雄Spargue-Dawleyラット(治療グループあたり動物数N=5)において評価することができる。動物に25ug/ラット(静脈内)または50ug/ラット(皮下)の1回量を与え、一般に、水溶性ポリマーにコンジュゲートしていない天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドについては約4時間、および天然にはコードされないアミノ酸を含み、水溶性ポリマーにコンジュゲートしているhGHポリペプチドについては約4日間にわたる、予め定義された時間経過に従って、約5から7個の血液サンプルを採取することとなる。hGHポリペプチドについての薬物動態データは、幾つかの種において十分研究されており、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドについて得られたデータと直接比較することができる。hGHに関連した研究については、Mordenti J.ら、Pharm. Res. 8(11):1351-59(1991)参照。

## 【0477】

本発明のhGHポリペプチドの特異的活性は、当該技術分野において公知である様々なアッセイにより判定することができる。本発明に従って得られ、精製されるhGHポリペプチド突然変異タンパク質またはこれらのフラグメントの生物活性は、本明細書において記載するもしくは言及する方法、または当業者に公知である方法により検査することができる。

## 【0478】

## XIV. 投与および医薬組成物

本発明のポリペプチドまたはタンパク質(hGHシンセターゼ、1つ以上の非天然アミノ酸を含むタンパク質を含むが、これらに限定されない)は、場合により、適する医薬用担体との組合せで(これを含むが、これに限定されない)治療用途に利用される。こうした組成物は、例えば、治療有効量の化合物、および医薬的に許容される担体または賦形剤を含む。こうした担体または賦形剤としては、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、および/またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。調合は、投与方式に適するように行う。一般に、タンパク質の投与方法は、当該技術分野において周知であり、本発明のポリペプチドの投与に適用することができる。

10

## 【0479】

場合により、本発明の1つ以上のポリペプチドを含む治療用組成物は、有効度、組織代謝を確認するために、および投薬量を概算するために、当該技術分野において周知ある方法に従って、1つ以上の適するインビトロおよび/またはインビボ動物疾病モデルにおいて検査する。具体的には、投薬量は、天然アミノ酸相同体に対する本明細書における非天然アミノ酸相同体の活性、安定性または他の適する測定(天然アミノ酸hGHポリペプチドに対する1つ以上の非天然アミノ酸を含むように修飾されたhGHポリペプチドの比較を含むが、これに限定されない)により、すなわち妥当なアッセイにおいて、最初に決定することができる。

20

## 【0480】

投与は、分子を最終的には血液または組織細胞と接触させるように導くために通常使用される経路のいずれかによる。本発明の非天然アミノ酸は、いずれかの適する手法で、場合により1つ以上の医薬的に許容される担体とともに、投与される。本発明に関連してこうしたポリペプチドを患者に投与する、適する方法を利用でき、また、1つより多くの経路を使用して、特定の組成物を投与することはできるが、多くの場合、特定の経路が、別の経路より即効的および効果的な作用または反応をもたらすことができる。

30

## 【0481】

医薬的に許容される担体は、投与される特定の組成物により、ならびにこの組成物を投与するために使用される特定の方法によって、一部、決まる。従って、本発明の医薬組成物の多種多様な適する調合物が存在する。

## 【0482】

ポリペプチド組成物は、静脈内、腹腔内、筋肉内、経皮、皮下、局所、舌下または直腸内手段をはじめとする(しかし、これらに限定されない)多数の経路により投与することができる。修飾されたまたは未修飾の天然でないアミノ酸ポリペプチドを含む組成物は、リボソームによって投与することもできる。こうした投与経路および適切な調合物は、当業者に一般に公知である。

40

## 【0483】

単独で、または他の適する成分との組合せで天然でないアミノ酸を含むhGHポリペプチドは、エーロゾル調合物にして(すなわち、これらは、「霧状にする」ことができる)、吸入により投与することもできる。エーロゾル調合物は、許容可能な加圧噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパンおよび窒素などに入れることができる。

## 【0484】

例えば、関節内(関節の中)、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内および皮下経路などの非

50

経口投与に適する調合物としては、酸化防止剤、緩衝液、静菌薬、およびこの調合物を所期の受容者の血液と等張にする溶質を含有し得る水性および非水性等張滅菌注射溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および保存薬を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液が挙げられる。パッケージされた核酸の調合物は、1回量または複数回分の用量が封入された容器、例えばアンプルおよびバイアルに入った状態で提供することができる。

#### 【0485】

非経口投与および静脈内投与が好ましい投与方法である。特に、現在使用されている調合と共に、非天然アミノ酸相同体療法薬（EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFNs、インターロイキン、抗体および／または他のあらゆる薬学的に產生されたタンパク質）のために既に使用されている投与経路は、本発明のポリペプチドに好ましい投与経路および調合となる。

#### 【0486】

本発明に関連して、患者に投与される用量は、適用に依存して、ある期間にわたって患者の有益な治療応答を得るために、または病原体による感染もしくは適切な活性を抑制するために（これを含むが、これに限定されない）、十分なものである。この用量は、特定のベクターまたは調合物、利用される非天然アミノ酸ポリペプチドの活性、安定性または血清半減期、および患者の状態、ならびに治療する患者の体重または表面積によって決まる。用量のサイズは、特定の患者における特定のベクターまたは調合物などの投与に随伴するあらゆる有害副作用の存在、性質および程度によっても決まる。

#### 【0487】

疾病（癌、遺伝性疾患、糖尿病またはAIDSなど）の治療または予防において投与することができるベクターまたは調合物の有効量を決定する際、医師は、循環血漿レベル、調合物の毒性、疾病的進行、および／または該当する場合には、抗非天然アミノ酸ポリペプチド抗体の生産を評価する。

#### 【0488】

例えば70キログラムの患者に投与される用量は、一般に、現在使用されている治療用タンパク質の投薬量と同等の範囲内であり、それを該当組成物の変化した活性または血清半減期について調整する。本発明のベクターは、抗体投与、ワクチン投与、細胞毒性剤、天然アミノ酸ポリペプチド、核酸、ヌクレオチド類似体および生体応答調節剤などの投与をはじめとするいづれかの公知従来的治療法による治療条件に追加することができる。

#### 【0489】

投与については、本発明の調合物は、該当調合物のLD-50もしくはED-50、および／または患者の体重および総合的な健康状態に適用されるよう（これを含むが、これに限定されない）、様々な濃度での非天然アミノ酸のあらゆる副作用の観察により決定される速度で投与される。投与は、1回量または分割量により遂行することができる。

#### 【0490】

調合物の吸入を受ける患者が、発熱、悪寒または筋肉痛を発現した場合、彼／彼女には、適切な用量のアスピリン、イブプロフェン、アセトアミノフェンまたは他の疼痛／発熱制御薬を与える。吸入に対する反応、例えば発熱、筋肉痛および悪寒を経験する患者は、さらなる吸入の30分前に、アスピリン、アセトアミノフェン、またはジフェニルヒドラミン（これを含むが、これに限定されない）を前投与する。メペリジンは、解熱剤および抗ヒスタミン剤に迅速に応答しない、より重度の悪寒および筋肉痛に使用する。細胞吸入は、この反応の重症度に依存して遅速させるか、中止する。

#### 【0491】

本発明のヒトhGHポリペプチドは、哺乳動物被験者に直接投与することができる。投与は、被験者にhGHポリペプチドを導入するために一般に使用されるいづれかの経路による。本発明の実施態様のhGHポリペプチド組成物としては、経口投与、直腸内投与、局所投与、吸入適用（エーロゾルによるものを含むが、これに限定されない）、口腔内投与（舌下を含むが、これに限定されない）、腔投与、非経口投与（皮下投与、筋肉内投与

10

20

30

40

50

、皮内投与、関節内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、脳内投与、動脈内投与または静脈内投与を含むが、これらに限定されない)、局所投与(すなわち、皮膚および粘膜表面(気道表面の両方の投与を含むが、これに限定されない)および経皮投与に適するものが挙げられるが、あらゆる所定の場合に最も適する経路は、治療する状態の性質および重症度に依存するであろう。投与は、局所的であってもよいし、全身的であってもよい。化合物の調合物は、単位用量または複数回分の用量が封入された容器、例えばアンプルおよびバイアルの中に入った状態で提供することができる。本発明の h G H ポリペプチドは、医薬的に許容される担体との単位用量注射用形態(溶液、懸濁液または乳剤を含むが、これらに限定されない)での混合物で調製することができる。本発明の h G H ポリペプチドは、持続注入(浸透圧ポンプなどのミニポンプ(これらを含むが、これらに限定されない)を使用)、単一のボーラスまたは遅速放出型デポー調合物により投与することもできる。

## 【0492】

投与に適する調合物としては、酸化防止剤、緩衝液、静菌薬、およびこの調合物を等張にする溶質を含有し得る水性および非水性溶液、等張滅菌溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および保存薬を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液が挙げられる。溶液および懸濁液は、以前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

## 【0493】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される担体を含むことができる。医薬的に許容される担体は、投与される特定の組成物、ならびにこの組成物を投与するために用いられる特定の方法により、一部、決まる。従って、本発明の医薬組成物(任意の医薬的に許容される担体、賦形剤または安定剤を含む)の多種多様な適する調合物が存在する(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed. 1985 参照)。

## 【0494】

適する担体としては、リン酸塩、ホウ酸塩、H E P E S、クエン酸塩および他の有機酸を含有する緩衝液；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシン；単糖類、二糖類および他の炭水化物(グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む)；キレート化剤、例えば、E D T A；二価金属イオン、例えば、亜鉛、コバルトもしくは銅；糖アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール；塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム；ならびに／または非イオン性界面活性剤、例えば、T w e e n (商標)、P l u r o n i c s (商標)もしくはP E Gが挙げられる。

## 【0495】

P E Gなどの水溶性ポリマーに連結したものを含む、本発明の h G H ポリペプチドは、持続放出性の系により、またはこれらの一部として投与することもできる。持続放出性組成物としては、フィルムまたはマイクロカプセルをはじめとする(しかし、これらに限定されない)成形品の形態での半透過性ポリマーマトリックス(これらを含むが、これらに限定されない)が挙げられる。持続放出性マトリックスとしては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(Langerら、J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))、エチレンビニルアセテート(Langerら、上記)またはポリ-D-( - )-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133,988号)、ポリラクチド(ポリ乳酸)(米国特許第3,773,919号；欧州特許第58,481号)、ポリグリコリド(グリコール酸のポリマー)、ポリラクチド-co-グリコリド(乳酸とグリコール酸のコポリマー)ポリ無水物、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタメートのコポリマー(U. Sidmanら、Biopolymers, 22, 547-556(1983))、ポリ(オルト)エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫

10

20

30

40

50

酸コンドロイチン、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖類、マレイン酸、ポリアミノ酸、アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンおよびシリコーンなどの生態適合性材料からのものが挙げられる。持続放出性組成物は、リボソームに閉じ込められた化合物も包含する。化合物を含有するリボソームは、本質的に公知である方法により調製される：ドイツ特許第3,218,121号；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:3688-3692(1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4030-4034(1980)；10 欧州特許第52,322号、同第36,676号、同第88,046号、同第143,949号および同第142,641号；日本特許出願83-118008；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号；ならびに欧州特許第102,324号。引用したすべての参考文型および特許出願は、本明細書に参照により組み込まれている。

#### 【0496】

リボソームに閉じ込められたhGHポリペプチドは、例えば、ドイツ特許第3,218,121号；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:3688-3692(1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4030-4034(1980)；20 欧州特許第52,322号、同第36,676号、同第88,046号、同第143,949号および同第142,641号；日本特許出願83-118008；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号；ならびに欧州特許第102,324号に記載されている方法によって調製することができる。リボソームの組成物およびサイズは、周知であり、または当業者により経験的に容易に決定され得る。リボソームの一部の例は、例えば、Park JWら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331(1995)；Lasic DおよびPapahadjopoulos D(ed.) : MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES(1998)；Drummond DCら、Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B(ed.) : CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT(2002)；Park JWら、Clin. Cancer Res. 8:1172-1181(2002)；Nielsen UBら、Biochim. Biophys. Acta 1591(1-3):109-118(2002)；Mamot Cら、Cancer Res. 63:3154-3161(2003)に記載されている。30 引用したすべての参考文型および特許出願は、本明細書に参照により組み込まれている。

#### 【0497】

本発明に関連して、患者に投与される用量は、一定の期間にわたって被験者において有益な応答を生じさせるために十分でなければならない。一般に、一用量あたりの非経口投与される本発明のhGHポリペプチドの全薬学的有効量は、患者の体重の約0.01μg/kg/日から約100μg/kg、または約0.05mg/kgから約1mg/kgの範囲内であるが、これは、治療上の判断によって決まる。投薬の頻度も治療上の判断によつて決まり、ヒトでの使用の承認を受けている市販のhGHポリペプチド製品より多い頻度であつてもよいし、少ない頻度であつてもよい。一般に、本発明のPEG化hGHポリペプチドは、上に記載した投与経路のいずれかにより投与することができる。40

#### 【0498】

XV. 本発明のhGHポリペプチドの治療的使用

本発明のhGHポリペプチドは、多種多様な疾患の治療に有用である。

#### 【0499】

本発明のhGH作動薬ポリペプチドは、例えば、成長不全および免疫疾患の治療、ならびに心機能の刺激に有用であり得る。成長不全の個体としては、例えば、ターナー症候群の個体、GH欠損の個体（子供を含む）、骨端軟骨閉鎖前約2から3年の正常な成長曲線50

において遅延または遅滞の経験がある子供（時として、「ショート・ノーマル・チルドレン」として公知である）、およびGHに対するインスリン様成長因子-I (IGF-I) 応答が、化学的に（すなわち、糖質コルチコイド治療により）、または自然条件により（GHに対するIGF-I応答が自然に減少する成体患者の場合など）遮断された個体が挙げられる。

#### 【0500】

作用薬hGH変異体は、哺乳動物の免疫系をこの免疫機能の上昇により、この上昇が、抗体媒介によるものであろうと、または細胞媒介によるものであろうと、およびこの免疫系が、hGHポリペプチドでの治療を受けた宿主に内在するものであろうと、またはhGHポリペプチドを与えた宿主受容者に供与者から（骨髄移植片として）移植されたものであろうと、刺激するように作用することができる。「免疫疾患」は、薬物（例えば、化学療法薬）治療のために免疫が低減された小さな脾臓を有する個体をはじめとする、個体の免疫系が、正常より低減された抗体または細胞応答を有するあらゆる状態を包含する。免疫疾患に罹患している個体の例としては、例えば、老人患者；化学療法または放射線療法を受けている個体；大病から回復するまたは手術を受けようとしている個体；AIDSに罹患している個体；先天性および後天性B細胞不全、例えば低グロブリン血症、通常の各種無グロブリン血症（common varied gammaglobulinemia）および選択性免疫グロブリン欠損症（例えば、IgA欠損症）に罹患している患者；この患者の免疫応答より短い潜伏時間を持つ狂犬病ウイルスなどのウイルスに感染している患者；ならびにディ・ジョージ症候群などの遺伝性疾患に罹患している個体が挙げられる。10

#### 【0501】

本発明のhGH拮抗薬ポリペプチドは、巨人症および先端巨大症、糖尿病および糖尿病から生じる合併症（糖尿病性網膜症、糖尿病性腎障害）、血管性眼疾患（例えば、増殖性血管新生）、腎症、およびGH反応性悪性病変の治療に有用であり得る。20

#### 【0502】

欠陥性眼疾患としては、例えば、網膜症（例えば、早産または鎌状赤血球性貧血に起因するもの）および黄斑変性が挙げられる。

#### 【0503】

GH反応性悪性病変としては、例えば、ウイルムス腫瘍、肉腫（例えば、骨原性肉腫）、乳癌、大腸癌、前立腺癌および甲状腺癌、ならびにGH受容体mRNAを発現する組織の癌（すなわち、胎盤、胸腺、脳、唾液腺、前立腺、骨髄、骨格筋、器官、脊髄、網膜およびリンパ節の癌、ならびにバーキットリンパ腫、結腸直腸癌、肺癌、リンパ芽球性白血病および黒色腫からの癌）が挙げられる。30

#### 【0504】

hGHの平均量は、様々であり得、特に、資格を有する医師の推奨および処方に基づくであろう。hGHの正確な量は、治療する状態の正確なタイプ、治療する患者の状態、ならびにこの組成物中の他の成分などの因子によって決まる選択事である。

#### 【0505】

##### 実施例

以下の実施例は、例証のために提供するものであり、特許請求の範囲に記載する本発明を制限するものではない。40

#### 【実施例1】

#### 【0506】

この実施例では、天然にはコードされないアミノ酸のhGHへの組み込みの好ましい部位の選択に重要な可能性のある多数のセットのうちの一つを説明する。

#### 【0507】

この実施例は、天然にはコードされないアミノ酸の組み込みに好ましいhGHポリペプチド内の部位を選択する方法を示すものである。受容体の細胞外ドメインの2つの分子と複合体を形成したhGH(hGHbp)から成る結晶構造3HHRを使用して、1つ以上50

の天然にはコードされないアミノ酸を導入することができる好ましい位置を決定した。他のhGH構造（例えば、1AXI）を利用して、結晶構造データセット間の一次および二次構造要素の潜在的变化を検査した。これらの構造の座標は、Protein Data Bank (PDB) (Bersteinら. J. Mol. Biol. 1997, 112, pp 535) から、またはthe World Wide Webのrcsb.orgで利用できるThe Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDBにより入手できる。構造モデル3HHRは、結晶の無秩序さのため割愛した残基148から153およびC末端F191残基を除き、hGHの全成熟22kDa配列を含有する。C53とC165およびC182とC185により形成された2つのジスルフィド架橋が存在する。この実施例で使用した配列番号付けは、配列番号2に示す成熟hGHのアミノ酸配列(22kDa変異体)に従うものである。  
10

#### 【0508】

以下の基準を用いて、天然にはコードされないアミノ酸を導入するためのhGHの各一を評価した：残基は、(a) 3HHR、1AXIおよび1HWGの構造解析(hGHbp单量体または二量体とコンジュゲートしたhGHの結晶構造)に基づき、いずれのhGHbpの結合にも干渉してはならない、(b) アラニンまたは同族体走査型突然変異誘発(Cunninghamら. Science (1989) 244: 1081-1085およびCumminghamら. Science (1989) 243: 1330-1336)による影響を受けてはならない、(c) 表面が露出されており、周囲の残基との最小限のファン・デル・ワールスまたは水素結合相互作用を示さなければならない、(d) hGH変異体(例えば、Tyr35、Lys38、Phe92、Lys140)が欠失しているか、可変的でなければならない、(e) 天然にはコードされないアミノ酸での置換により保存的変化が生じるであろう、ならびに(f) 高可撓性領域(CDループを含むが、これに限定されない)または構造的に堅い領域(ヘリックスBを含むが、これに限定されない)のいずれかにおいて見出すことができる。加えて、Cxプログラム(Pintarら. Bioinformatics, 18, pp 980)を利用してhGH分子に関するさらなる計算を行って、各タンパク質原子についての突出度を評価した。結果として、一部の実施態様では、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸が、以下のhGHの位置の1つ以上(しかし、これらに限定されない)に導入される：位置1の前(すなわち、N末端位置)、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192(すなわち、このタンパク質のカルボキシル末端位置)(配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸)。  
20  
30  
40

#### 【0509】

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、以下の位置の1つ以上で置換される：29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、183、186、および187(配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸)。  
50

**【0510】**

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、以下の位置の1つ以上で置換される：29、33、35、37、39、49、57、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、186、および187（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）。

**【0511】**

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、以下の位置の1つ以上で置換される：35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、131、133、134、135、136、139、140、143、145、および155（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）。

**【0512】**

一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、以下の位置の1つ以上で置換される：30、74、103（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）。一部の実施態様において、1つ以上の天然にはコードされないアミノ酸は、以下の位置の1つ以上で置換される：35、92、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）。

**【0513】**

一部の実施態様において、位置1の前（すなわち、N末端位置）、位置：1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、52、55、57、59、65、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、111、112、113、115、116、119、120、122、123、126、127、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、158、159、161、168、172、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192（すなわち、このタンパク質のカルボキシル末端位置）（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）を含む（しかし、これらに限定されない）これらの位置の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施態様において、これらの位置：30、35、74、92、103、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結されている。一部の実施態様において、35、92、143、145（配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸）の1つ以上における自然には発生しないアミノ酸が、水溶性ポリマーに連結されている。

**【0514】**

hGH拮抗薬の生成のための一部の部位としては、1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、127、もしくは位置1の前での付加、これらのあらゆる組合せ（配列番号2、または配列番号1、3もしくは他のいずれかのG H配列における対応するアミノ酸）が挙げられる。これらの部位は、前記作動薬設計の基準（c）から（e）を利用して選択することができる。この拮抗薬設計は、hGHbpへの結合親和性を増大させるためにSite I残基の部位特異的修飾も包含し得る。

**【実施例2】**

10

20

30

40

50

**【 0 5 1 5 】**

この実施例では、大腸菌における天然にはコードされないアミノ酸を含む h G H ポリペプチドのクローニングおよび発現を詳述する。この実施例では、修飾された h G H ポリペプチドの生物活性の一評価方法も説明する。

**【 0 5 1 6 】**

h G H およびこのフラグメントのクローニング方法は、米国特許第 4 , 6 0 1 , 9 8 0 号；同第 4 , 6 0 4 , 3 5 9 号；同第 4 , 6 3 4 , 6 7 7 号；同第 4 , 6 5 8 , 0 2 1 号；同第 4 , 8 9 8 , 8 3 0 号；同第 5 , 4 2 4 , 1 9 9 号；および同第 5 , 7 9 5 , 7 4 5 号（これらは、本明細書に参照により組み込まれている）において詳述されている。  
完全長 h G H または N 末端シグナル配列を欠く熟成形態の h G H をコードする c D N A を配列番号 2 1 および配列番号 2 2 にそれぞれ示す。 10

**【 0 5 1 7 】**

直交性 t R N A ( O - t R N A ) および直交性アミノアシル t R N A シンセターゼ ( O - R S ) を含む導入翻訳系を使用して、天然にはコードされないアミノ酸を含有する h G H を発現させる。この O - R S は、天然にはコードされないアミノ酸を有する O - t R N A を優先的にアミノアシル化する。そしてまた、この翻訳系は、コードされたセレクター コドンに応答して、この天然にはコードされないアミノ酸を h G H に挿入する。

**【 0 5 1 8 】**

【表4】

表2: O-RS および O-tRNA 配列<sup>Tyr</sup><sub>CuA</sub>

配列番号 4	M.ヤナシ mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CuA</sub>	tRNA
配列番号 5	最適化されたアンドーサフ <sup>®</sup> レッサ tRNA	tRNA
配列番号 6	最適化された AGGA フレームシフトサフ <sup>®</sup> レッサ tRNA	tRNA
配列番号 7	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-Az-PheRS(6)	RS
配列番号 8	p-ペソゾイル-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-BpaRS(1)	RS
配列番号 9	フロハルギル-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ フロハルギル-PheRS	RS
配列番号 10	フロハルギル-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ フロハルギル-PheRS	RS
配列番号 11	フロハルギル-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ フロハルギル-PheRS	RS
配列番号 12	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-Az-PheRS(1)	RS
配列番号 13	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-Az-PheRS(3)	RS
配列番号 14	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-Az-PheRS(4)	RS
配列番号 15	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ p-Az-PheRS(2)	RS
配列番号 16	p-アセチルフェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ (LW1)	RS
配列番号 17	p-アセチルフェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ (LW5)	RS
配列番号 18	p-アセチルフェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ (LW6)	RS
配列番号 19	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ (AzPheRS-5)	RS
配列番号 20	p-アジド-L-フェニルアラニンを組み込むためのアミノアシル tRNA シンセターゼ (AzPheRS-6)	RS

## 【0519】

修飾された hGH 遺伝子および直交性アミノアシル tRNA シンセターゼ / tRNA 対（所望の天然にはコードされないアミノ酸に対して特異的なもの）を含有するプラスミドでの大腸菌の形質転換により、天然にはコードされないアミノ酸を hGH ポリペプチドに部位特異的に組み込むことができる。0.01から 100 mM の間の特定の天然にはコードされないアミノ酸を含有する培地中、37℃で成長させた形質転換大腸菌は、高い忠実度および効率で修飾された hGH を発現する。天然にはコードされないアミノ酸を含有する His 標識 hGH を大腸菌宿主により封入体または凝集体として生産させる。これらの

10

20

30

40

50

凝集体を6MグアニジンHCl中、変性条件下で可溶化し、親和精製する。50mM TRIS-HCl(pH8.0)、40μM CuSO<sub>4</sub>、および2%(w/v)Sarkosyl中で一晩、4℃で透析することにより、リフォールディングを行う。この後、この材料を、20mM TRIS-HCl(pH8.0)、100mM NaCl、2mM CaCl<sub>2</sub>に透析し、続いて、Hisタグを除去する。Boisselら、(1993)268:15983-93参照。hGHの精製方法は、当該技術分野において周知であり、SDS-PAGE、ウエスタンプロット分析またはエレクトロスプレー・イオン化トラップ質量分析などにより確認される。

#### 【0520】

図6は、精製されたhGHポリペプチドのSDS-PAGEである。His標識突然変異hGHタンパク質は、このゲルを負荷する前に、ProBond Nickel-Chelating Resin(カリフォルニア州、カールズバッドのInvitrogen)を使用し、この製造業者により提供された標準的なHis標識タンパク質精製手順により精製し、続いて、アニオン交換カラムを使用して精製した。レーン1は、分子量マーカーを示し、レーン2は、天然でないアミノ酸が組み込まれていないN-His-hGHを表す。レーン3から10は、位置:Y35、F92、Y111、G131、R134、K140、Y143、およびK145の各々にそれぞれ天然でないアミノ酸p-アセチル-フェニルアラニンを含む、N-His-hGHを含む。

#### 【0521】

修飾されたhGHポリペプチドの生物活性をさらに評価するために、hGHのこの受容体との相互作用の下流マーカーを測定するアッセイを用いた。hGHのこの内在生産受容体との相互作用は、ヒトIM-9リンパ球細胞系において、転写ファミリーメンバーのシグナルトランデューサおよびアクチベータのチロシンリン酸化を導く。STAT5の2つの形態、STAT5AおよびSTAT5Bは、IM-9 DNAライブラリから同定された。例えば、Silvaら、Mol. Endocrinol.(1996)10(5):508-518参照。IM-9細胞上のヒト成長ホルモン受容体は、ラット成長ホルモンもヒトプロラクチンも、検出可能なSTAT5リン酸化を生じさせなかつたので、ヒト成長ホルモンに対して選択的である。重要なこととしては、ラットGHR(L43R)細胞外ドメインおよびG120R含有hGHは、pSTAT5リン酸化を刺激したhGHに対して有効に競合する。

#### 【0522】

IM-9細胞を本発明のhGHポリペプチドで刺激した。ヒトIM-9リンパ球は、ATCC(バージニア州、マナッサス)から購入し、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシン(サンディエゴ、カールズバッドのInvitrogen)および10%熱不活性化ウシ胎仔血清(ユタ州、ローガンのHyclone)を補足した RPMI 1640中で成長させた。このIM-9細胞を一晩、アッセイ培地(フェノールレッド不含RPMI、10mM Heps、1%熱不活性化チャコール/デキストラン処理FBS、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリンおよびストレプトマイシン)中で飢餓させ、この後、12点用量範囲のhGHポリペプチドで、10分間、37℃で刺激した。刺激した細胞を1%ホルムアルデヒドで固定した後、氷上で1時間、90%氷冷メタノールで透過性化した。STAT5リン酸化レベルは、一次ホスホ-STAT5抗体(マサチューセッツ州、ベヴァリーのCell Signaling Technology)で30分間、室温で、この後、PEにコンジュゲートした二次抗体で細胞内染色することにより検出した。FACS Arrayでサンプル収集を行い、得られたデータをFlowjoソフトウェア(オレゴン州、ッシュランドのTree Star Inc.)で解析した。SigmaPlotを利用してタンパク質濃度に対して平均蛍光強度(MFI)をプロットした用量応答曲線からEC<sub>50</sub>値を導出した。

#### 【0523】

以下の表3は、突然変異hGHポリペプチドを用いて生成させたIM-9データをまとめたものである。異なる位置で天然でないアミノ酸置換された様々なhGHポリペプチドを

10

20

30

40

50

説明したようにヒトIM-9細胞で検査した。具体的には、図7、パネルAは、His標識hGHポリペプチドについてのIM-9データを示すものであり、図7、パネルBは、Y143に対する天然でないアミノ酸p-アセチル-フェニルアラニン置換を含むHis標識hGHについてのIM-9データを示すものである。同アッセイを用いて、PEG化されている天然でないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの生物活性を評価した。

【0524】

【表5】

表3			
GH	EC <sub>50</sub> (nM)	GH	EC <sub>50</sub> (nM)
WHO WT	0.4 ± 0.1 (n=8)	G120R	>200,000
N-6His WT	0.6 ± 0.3 (n=3)	G120pAF	>200,000
ラットGH WT	>200,000	G131pAF	0.8 ± 0.5 (n=3)
Y35pAF	0.7 ± 0.2 (n=4)	P133pAF	1.0
E88pAF	0.9	R134pAF	0.9 ± 0.3 (n=4)
Q91pAF	2.0 ± 0.6 (n=2)	T135pAF	0.9
F92pAF	0.8 ± 0.4 (n=9)	G136pAF	1.4
R94pAF	0.7	F139pAF	3.3
S95pAF	16.7 ± 1.0 (n=2)	K140pAF	2.7 ± 0.9 (n=2)
N99pAF	8.5	Y143pAF	0.8 ± 0.3 (n=3)
Y103pAF	130,000	K145pAF	0.6 ± 0.2 (n=3)
Y111pAF	1.0	A155pAF	1.3

【実施例3】

【0525】

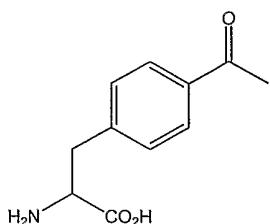
この実施例では、カルボニル含有アミノ酸の導入およびこの後のアミノオキシ含有PEGとの反応を詳述する。

【0526】

この実施例では、ケトンを含有する天然にはコードされないアミノ酸を導入し、それを、この後、約5,000のMWのアミノオキシ含有PEGと反応させる、hGHポリペプチドの生成方法を示す。実施例1の基準に従って同定した残基35、88、91、92、94、95、99、101、103、111、120、131、133、134、135、136、139、140、143、145、および155(hGH)の各々を、以下の構造：

【0527】

【化24】



を有する天然にはコードされないアミノ酸で別々に置換する。

【0528】

p-アセチル-フェニルアラニンのhGHへの部位特異的組み込みに利用する配列は、配列番号2(hGH)、ならびに上の実施例2に記載の配列番号4(muttRNA, M.ヤナシイ m t R N A T Y r c u A)および16、17または18(TyrRS LW 1、5、6)である。

【0529】

10

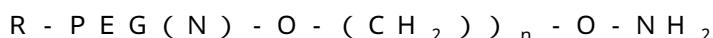
20

30

40

50

修飾したら、このカルボニル含有アミノ酸を含む h GH ポリペプチド変異体を、次の形態：



(式中、Rは、メチルであり、nは、3であり、Nは、約5,000 MWである) のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させる。25 mM MES(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 6.0)、25 mM Hepes(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 7.0)中、または10 mM 酢酸ナトリウム(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 4.5)中、10 mg/mLで溶解したp-アセチルフェニルアラニンを含有する精製h GHを、10から100倍過剰なアミノオキシ含有PEGと反応させ、この後、10から16時間、室温で攪拌する(Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475)。この後、このPEG-h GHを即時精製および分析のために適切な緩衝液で希釈する。

#### 【実施例4】

#### 【0530】

アミドリンケージによりPEGに連結されたヒドロキシルアミンから成るPEGとのコンジュゲーション。

#### 【0531】

以下の構造を有するPEG試薬を、実施例3に記載の手順を用いて、ケトンを含有する天然にはコードされないアミノ酸にカップリングさせる：



(式中、R=メチル、n=4、およびNは、適切には20,000 MWである)。反応、精製および分析条件は、実施例3に記載したとおりである。

#### 【実施例5】

#### 【0532】

この実施例では、h GHポリペプチドへの2つの別個の天然にはコードされないアミノ酸の導入を詳述する。

#### 【0533】

この実施例では、以下の残基：E30、E74、Y103、K38、K41、K140、およびK145の中の2つの位置にケトン官能基を含む天然にはコードされないアミノ酸が組み込まれているh GHポリペプチドの生成方法を示す。このh GHポリペプチドは、サブレッサコドンをこの核酸内の2つの別個の部位に導入すること以外は、実施例1および2に記載したとおり調製する。

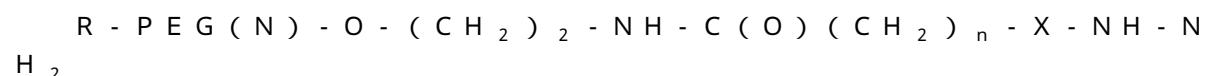
#### 【実施例6】

#### 【0534】

この実施例では、ヒドラジン含有PEGへのh GHポリペプチドのコンジュゲーションおよびこの後のインサイチュー還元を詳述する。

#### 【0535】

カルボニル含有アミノ酸が組み込まれているh GHポリペプチドは、実施例33および3に記載の手順に従って調製する。修飾したら、以下の構造を有するヒドラジン含有PEGをこのh GHポリペプチドにコンジュゲートさせる：



(式中、R=メチル、n=2、N=10,000 MW、およびXは、カルボニル(C=O)基である)。p-アセチルフェニルアラニンを含有する精製h GHを、25 mM MES(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 6.0)、25 mM Hepes(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 7.0)に、または10 mM 酢酸ナトリウム(ミズーリ州、セントルイスの Sigam Chemical)(pH 4.5)に、0.1から10 mg/mLの間で溶解し、1から100倍過剰なヒドラジン含有PEGと反応させ、10から50 mMの最終濃度になる

10

20

30

40

50

ように  $H_2O$  に溶解した原液 1 M NaCNBH<sub>3</sub> (ミズーリ州、セントルイスの Sigma Chemical) の添加により、対応するヒドラゾンをインサイチューで還元する。反応は、暗所、4 から室温で、18 から 24 時間行う。50 mM の最終 Tris 濃度までのまたは即時精製のために適切な緩衝液で希釈した 1 M Tris (ミズーリ州、セントルイスの Sigma Chemical) (約 pH 7.6) の添加により、反応を停止させる。

## 【実施例 7】

## 【0536】

この実施例では、hGH ポリペプチドへのアルキン含有アミノ酸の導入および mPEG - アジドでの誘導体化を詳述する。

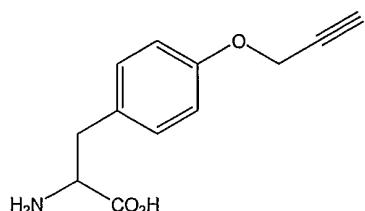
10

## 【0537】

以下の残基、35、88、91、92、94、95、99、101、131、133、134、135、136、140、143、145、および 155 を、以下の天然にはコードされないアミノ酸 (配列番号 2) :

## 【0538】

## 【化 25】



20

で各々置換する。

## 【0539】

hGH への p - プロパルギル - チロシンの部位特異的組み込みに利用する配列は、配列番号 2 (hGH)、ならびに上の実施例 2 に記載の配列番号 4 (mutt tRNA<sub>M</sub> やナシイ mtRNA<sub>Tyr</sub><sup>r</sup><sub>CuA</sub>) および 9、10 または 11 である。プロパルギルチロシンを含有する hGH ポリペプチドを大腸菌において発現させ、実施例 3 に記載した条件を用いて精製する。

30

## 【0540】

プロパルギル - チロシンを含有する精製 hGH を、PB 緩衝液 (100 mM リン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH = 8) 中、0.1 から 1.0 mg / mL の間で溶解し、10 から 1000 倍過剰のアジド含有 PEG をこの反応混合物に添加する。次に、触媒量の CuSO<sub>4</sub> および Cu 線をこの反応混合物に添加する。この混合物をインキュベート (約 4 時間、室温もしくは 37 度、または一晩、4 度のインキュベーションを含むが、これらに限定されない) した後、H<sub>2</sub>O を添加し、この混合物を透析膜に通して濾過する。実施例 3 に記載した同様の手順 (これを含むが、これに限定されない) により、サンプルを付加について分析することができる。

## 【0541】

40

この実施例では、PEG は、以下の構造 :

R - PEG (N) - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - NH - C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - N<sub>3</sub>  
(式中、R は、メチルであり、n は、4 であり、N は、m10,000 MW である)  
を有するであろう。

## 【実施例 8】

## 【0542】

この実施例では、hGH ポリペプチド中の大きな疎水性アミノ酸のプロパルギルチロシンでの置換を詳述する。

## 【0543】

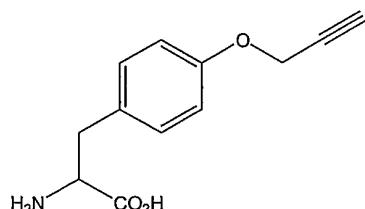
hGH の以下の領域 : 1 - 5 (N 末端)、6 - 33 (A ヘリックス)、34 - 74 (A

50

ヘリックスとBヘリックスの間の領域、A - Bループ)、75 - 96 (Bヘリックス)、97 - 105 (BヘリックスとCヘリックスの間の領域、B - Cループ)、106 - 129 (Cヘリックス)、130 - 153 (CヘリックスとDヘリックスの間の領域、C - Dループ)、154 - 183 (Dヘリックス)、184 - 191 (C末端) (配列番号2) の1つの中に存在するPhe、TrpまたはTyrを、実施例7に記載したような以下の天然にはコードされないアミノ酸で置換する:

【0544】

【化26】



10

【0545】

修飾したら、アルキン含有アミノ酸を含むhGHポリペプチド変異体にPEGを取り付ける。このPEGは、以下の構造:



を有し、カップリング手順は、実施例7におけるものに従うこととなる。これにより、大きな疎水性の自然発生アミノ酸の1つとほぼ等比体積である天然にはコードされないアミノ酸を含み、このポリペプチド内の別個の部位がPEG誘導体で修飾されている、hGHポリペプチド変異体が生じることとなる。

20

【実施例9】

【0546】

この実施例では、1つ以上のPEGリンカーによって分けられているhGHポリペプチドホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体の生成を詳述する。

【0547】

実施例7において生成させたアルキン含有hGHポリペプチド変異体を、次の形態:

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

(式中、nは、4であり、PEGは、約5,000の平均MWを有する)

30

の二官能性PEG誘導体と反応させて、2つのhGH分子がPEGによって物理的に分けられている対応するhGHポリペプチドホモ二量体を生じさせる。類似の手法で、hGHポリペプチドを1つ以上の他のポリペプチドとカップリングさせて、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体を形成することができる。カップリング、精製および分析は、実施例7および3の場合のように行うこととなる。

【実施例10】

【0548】

この実施例では、hGHポリペプチドへの糖部分のカップリングを詳述する。

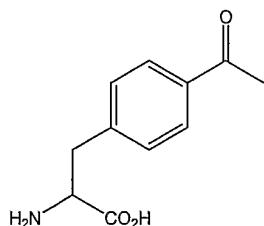
40

【0549】

以下: 29、30、33、34、35、37、39、40、49、57、59、66、69、70、71、74、88、91、92、94、95、98、99、101、103、107、108、111、122、126、129、130、131、133、134、135、136、137、139、140、141、142、143、145、147、154、155、156、159、183、186、および187のうちの1つの残基を、実施例3に記載したように、下記の天然にはコードされないアミノ酸で置換する。

【0550】

## 【化27】



## 【0551】

修飾したら、このカルボニル含有アミノ酸を含むhGHポリペプチド変異体を、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の連結型アミノオキシ類似体と反応させる。このhGHポリペプチド変異体(10mg/mL)とアミノオキシ糖(21mM)を100mM酢酸ナトリウム緩衝水溶液(pH5.5)中で混合し、37度で7から26時間インキュベートする。150mM HEPES緩衝液(pH7.4)中、周囲温度で48時間、この糖にコンジュゲートしたhGHポリペプチドをUDP-ガラクトース(16mM)および-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(0.4単位/mL)とともにインキュベートすることにより、第一の糖に第二の糖を酵素的にカップリングさせる(Schambacherら.J.Biol.Chem.1970,245,5057-5061)。

## 【実施例11】

## 【0552】

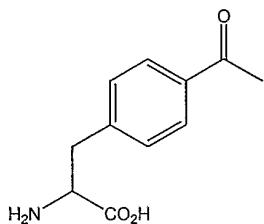
この実施例では、PEG化hGHポリペプチド拮抗薬の生成を詳述する。

## 【0553】

以下の残基：1、2、3、4、5、8、9、11、12、15、16、19、22、103、109、112、113、115、116、119、120、123、または127(hGH、配列番号2、または配列番号1もしくは3における対応するアミノ酸)のうちの1つを、実施例3に記載したように、下記の天然にはコードされないアミノ酸で置換する。

## 【0554】

## 【化28】



## 【0555】

修飾したら、このカルボニル含有アミノ酸を含むhGHポリペプチド変異体を、次の形態：



(式中、Rは、メチルであり、nは、4であり、Nは、20,000MWである)のアミノオキシ含有PEG誘導体と反応させて、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチド拮抗薬(このポリペプチド内の単一の部位が、PEG誘導体で修飾されている)を生じさせる。カップリング、精製および分析は、実施例3の場合のとおりである。

## 【実施例12】

## 【0556】

hGH分子が直接連結されているhGHポリペプチドホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体の生成

10

20

30

40

50

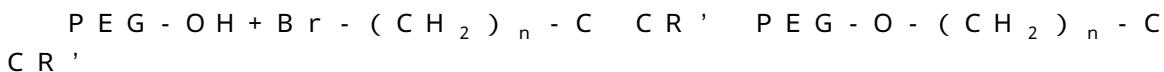
アルキン含有アミノ酸を含む hGH ポリペプチド変異体を、アジド含有アミノ酸を含む別の hGH ポリペプチド変異体に直接カップリングさせることができ、これらの変異体の各々が、実施例 10 (しかし、これに限定されない) に記載した部位での天然にはコードされないアミノ酸置換を含む。これにより、2つの hGH ポリペプチド変異体が Site

I I 結合界面で物理的につなぎ合わされている、対応する h G H ポリペプチドホモ二量体を生が生じることになる。類似の手法で、h G H ポリペプチドを 1 つ以上のポリペプチドとカップリングさせて、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体を形成することができる。カップリング、精製および分析は、実施例 3、6 および 7 の場合のとおり行う。

【实施例 1 3】

10

( 0 5 5 7 )



A

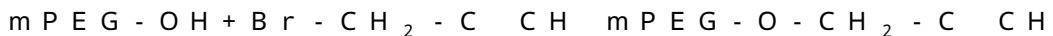
B

ポリアルキレングリコール(PEG-OH)をハロゲン化アルキル(A)と反応させて、エーテル(B)を形成する。これらの化合物において、nは、1から9の整数であり、およびR'は、直鎖または分枝鎖飽和または不飽和C1からC20アルキルまたはヘテロアルキル基である。R'は、C3からC7飽和もしくは不飽和環状アルキルもしくは環状ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリールもしくはヘテロアリール基、または置換もしくは非置換アルカリール(このアルキルは、C1からC20飽和もしくは不飽和アルキルである)もしくはヘテロアルカリール基であってもよい。典型的に、PEG-OHは、800から40,000ダルトン(Da)の分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)またはモノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)である。

20

### 【实施例 1 4】

〔 0 5 5 8 〕

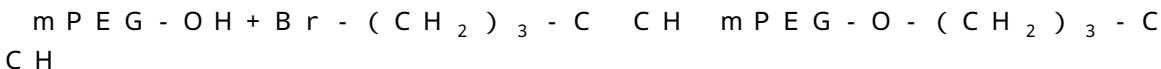


20,000Daの分子を有するmPEG-OH(mPEG-OH 20kDa; 2.0g、0.1mmol、Sunbio)を、THF(35mL)中のNaH(12mg、0.5mmol)で処理した。キシレン中の80重量%溶液として溶解した臭化プロパルギルの溶液(0.56mL、5mmol、50当量、Aldrich)および触媒量のKIを、次いで、この溶液に添加し、得られた混合物を加熱して2時間還流させた。その後、水(1mL)を添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)を添加し、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、約2mLに体積を減少させた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液をエーテル(150mL)に一滴ずつ直接添加した。生じた沈殿を回収し、数回分の冷ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥させて、プロパルギル-O-PEGを得た。

30

【实施例 15】

〔 0 5 5 9 〕

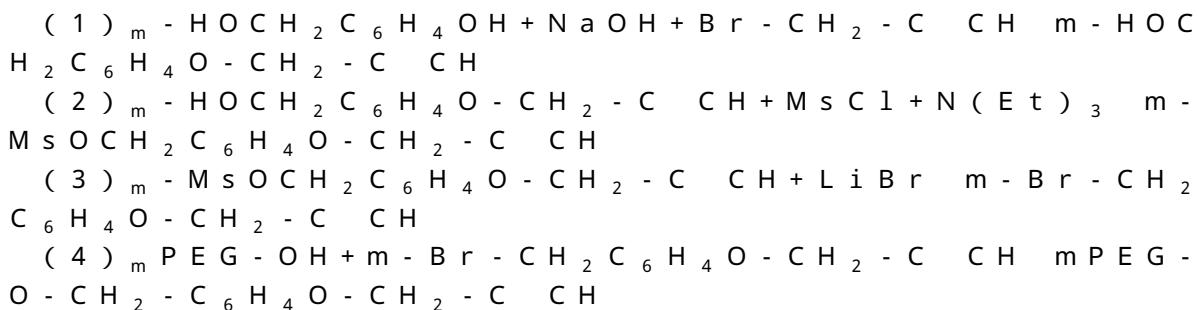


20,000Daの分子を有するmPEG-OH(mPEG-OH 20kDa; 2.0g、0.1mmol、Sunbio)を、THF(35mL)中のNaH(12mg、0.5mmol)で処理した。50当量の5-ブロモ-1-ペンチン(0.53mL、5mmol、Aldrich)および触媒量のKIを、この後、この混合物に添加した。得られた混合物を加熱して16時間還流させた。この後、水(1mL)を添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)を添加し、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、約2mLに体積を減少させた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液をジエチルエーテル(150mL)に一滴ずつ直接添加した。生じた沈殿を回収し、数回分の冷ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥させて、対応するアルキンを得た。5-クロロ-1-ペンチンを同様の反応に用いることができる。

18

## 【実施例 16】

## 【0560】



THF (50 mL) および水 (2.5 mL) 中の 3 - ヒドロキシベンジルアルコール (2.4 g、20 mmol) の溶液に、先ず、粉末水酸化ナトリウム (1.5 g、37.5 mmol)、次に、キシレン中の 80 重量% 溶液として溶解した臭化プロパルギルの溶液 (3.36 mL、30 mmol) を添加した。この反応混合物を 6 時間、還流させながら加熱した。この混合物に 10 % クエン酸 (2.5 mL) を添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物を酢酸エチル (3 × 15 mL) で抽出し、併せた有機層を NaCl 飽和溶液 (10 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮して、3 - プロパルギルオキシベンジルアルコールを得た。

## 【0561】

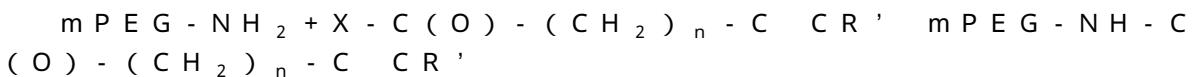
塩化メタンスルホニル (2.5 g、15.7 mmol) およびトリエチルアミン (2.8 mL、20 mmol) を、0 °C CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の化合物 3 (2.0 g、11.0 mmol) の溶液に添加し、この反応物を冷蔵庫内に 16 時間置いた。通常の処理によって、このメシレートを淡黄色の油として得た。この油 (2.4 g、9.2 mmol) を THF (20 mL) に溶解し、LiBr (2.0 g、23.0 mmol) を添加した。この反応混合物を加熱して 1 時間還流させ、次いで、室温に冷却した。この混合物に水 (2.5 mL) を添加し、真空下で溶媒を除去した。この残留物を酢酸エチル (3 × 15 mL) で抽出し、併せた有機層を NaCl 飽和溶液 (10 mL) で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮して、所望の臭化物を得た。

## 【0562】

mPEG-OH 20 kDa (1.0 g、0.05 mmol、Sunbio) を THF (20 mL) に溶解し、この溶液を氷浴で冷却した。NaH (6 mg、0.25 mmol) を激しく攪拌しながら数分間かけて添加し、この後、上で得られた臭化物 (2.55 g、11.4 mmol) および触媒量の KI を添加した。冷却浴を取り外し、得られた混合物を加熱して 12 時間還流させた。水 (1.0 mL) をこの混合物に添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) を添加し、有機層を分離し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、約 2 mL に体積を減少させた。エーテル溶液 (150 mL) に一滴ずつ添加することによって、白色の沈殿を生じさせ、それを回収して、この PEG 誘導体を得た。

## 【実施例 17】

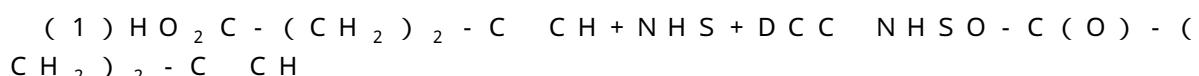
## 【0563】

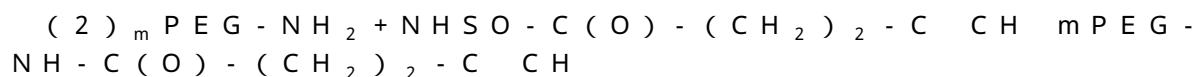


上に示したように、末端官能基を含有するポリ(エチレングリコール)ポリマーとアルキン官能基を含有する反応性分子とをカップリングさせることにより、末端アルキン含有ポリ(エチレングリコール)ポリマーも得ることができる。n は、1 と 10 の間である。R' は、H であってもよいし、C1 から C4 の小さなアルキル基であってもよい。

## 【実施例 18】

## 【0564】





4-ペンチン酸(2.943g、3.0mmol)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(3.80g、3.3mmol)およびDCC(4.66g、3.0mmol)を添加し、この溶液を一晩、室温で攪拌した。得られた粗製NHSエステル7を、さらに精製せずに後続の反応で使用した。

#### 【0565】

5,000Daの分子量を有するmPEG-NH<sub>2</sub>(mPEG-NH<sub>2</sub>、1g、Sunbio)をTHF(50mL)に溶解し、この混合物を4に冷却した。NHSエステル7(400mg、0.4mmol)を激しく攪拌しながら少しづつ添加した。この混合物を3時間攪拌させておき、この間に室温に温めた。次いで、水(2mL)を添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)を添加し、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、約2mLに体積を減少させた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液をエーテル(150mL)に一滴ずつ添加した。生じた沈殿を回収し、真空下で乾燥させた。

#### 【実施例19】

#### 【0566】

この実施例は、ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホニルエステル(これは、ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホネートまたはメシレートと呼ぶこともできる)の調製を表すものである。対応するトシレートおよびハロゲン化物を同様の手順で調製することができる。

#### 【0567】



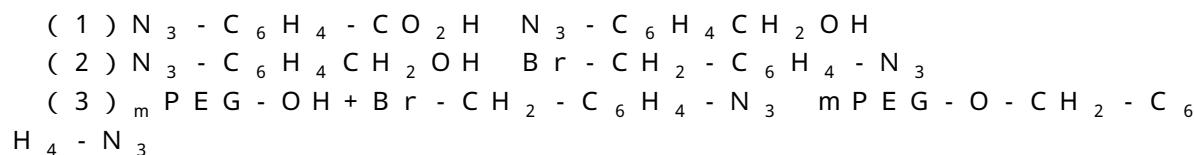
150mLのトルエン中のmPEG-OH(MW=3,400、25g、10mmol)を窒素下で2時間、共沸蒸留し、この溶液を室温に冷却した。40mLの乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>および2.1mLの乾燥トリエチルアミン(15mmol)をこの溶液に添加した。この溶液を氷浴で冷却し、1.2mLの蒸留塩化メタンスルホニル(15mmol)を一滴ずつ添加した。この溶液を室温、窒素下で一晩攪拌し、2mLの無水エタノールの添加により反応を停止させた。この混合物を真空下で蒸発させて溶媒、主としてトルエン以外のものを除去し、濾過し、再び真空下で濃縮し、この後、100mLのジエチルエーテル中に沈殿させた。濾液を数回分の冷ジエチルエーテルで洗浄し、真空下で乾燥させて、このメシレートを得た。

#### 【0568】

このメシレート(20g、8mmol)を75mLのTHFに溶解し、この溶液を4に冷却した。この冷却溶液にアジ化ナトリウム(1.56g、24mmol)を添加した。この反応物を加熱して窒素下で2時間還流させた。この後、溶媒を蒸発させ、残留物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)で希釈した。有機画分をNaCl溶液で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。20mLに体積を減少させ、この生成物を150mLの冷乾燥エーテルへの添加により沈殿させた。

#### 【実施例20】

#### 【0569】



4-アジドベンジルアルコールは、米国特許第5,998,995号(これは、本明細書に参照により組み込まれている)に記載されている方法を使用して製造することができる。塩化メタンスルホニル(2.5g、15.7mmol)およびトリエチルアミン(2.8mL、20mmol)を、0でCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の4-アジドベンジルアルコール(1.75g、11.0mmol)の溶液に添加し、この反応物を冷蔵庫内に16時間置い

10

20

30

40

50

た。通常の処理によりこのメシレートを淡黄色の油として得た。この油(9.2 mmol)をTHF(20mL)に溶解し、LiBr(2.0g, 23.0 mmol)を添加した。この反応混合物を加熱して1時間還流させ、この後、室温に冷却した。この混合物に水(2.5mL)を添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物を酢酸エチル(3×15mL)で抽出し、併せた有機層をNaCl飽和溶液(10mL)で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮して、所望の臭化物を得た。

## 【0570】

mPEG-OH 20kDa(2.0g, 0.1mmol, Sunbio)をTHF(35mL)中のNaH(12mg, 0.5 mmol)で処理し、臭化物(3.32g, 15 mmol)を触媒量のKIと共にこの混合物に添加した。得られた混合物を加熱して12時間還流させた。水(1.0mL)をこの混合物に添加し、真空下で溶媒を除去した。残留物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25mL)を添加し、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、約2mLに体積を減少させた。エーテル溶液(150mL)に一滴ずつ添加することによって、沈殿を生じさせ、これを回収して、mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>を得た。

## 【実施例21】

## 【0571】

NH<sub>2</sub>-PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H + N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-NH  
S N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)NH-PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H  
NH<sub>2</sub>-PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H(MW3, 400Da, 2.0g)をNaHCO<sub>3</sub>の飽和水溶液(10mL)に溶解し、この溶液を0℃に冷却した。プロピオン酸3-アジド-1-N-ヒドロキシスクシンイミド(5当量)を激しく攪拌しながら添加した。3時間後、20mLのH<sub>2</sub>Oを添加し、この混合物をさらに45分間、室温で攪拌した。0.5NのNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でこのpHを3に調整し、NaClを約15重量%の濃度になるまで添加した。この反応混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL×3)で抽出し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮した。冷ジエチルエーテルで沈殿させた後、生成物を濾過によって回収し、真空下で乾燥させて、オメガ-カルボキシ-アジドPEG誘導体を得た。

## 【実施例22】

## 【0572】

mPEG-OMs+HCCLi mPEG-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CC-H  
当該技術分野において公知であるように調製し、THF中で-78℃に冷却したリチウムアセチリド(4当量)の溶液に、THFに溶解したmPEG-OMsの溶液を、激しく攪拌しながら一滴ずつ添加した。3時間後、この反応物を放置して室温に温め、1mLのブタノールの添加により反応を停止させた。次いで、20mLのH<sub>2</sub>Oを添加し、この混合物をさらに45分間、室温で攪拌した。0.5NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でこのpHを3に調整し、約15重量%の濃度になるまでNaClを添加した。この反応混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL×3)で抽出し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濃縮した。冷ジエチルエーテルで沈殿させた後、生成物を濾過によって回収し、真空下で乾燥させて、1-(ブト-3-イニルオキシ)-メトキシポリエチレングリコール(mPEG)を得た。

## 【実施例23】

## 【0573】

L.Wangら、(2001), Science 292:498-500; J.W.Chinら、Science 301:964-7(2003); J.W.Chihら、(2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J.W.Chih, & P.G.Schultz, (2002), Chem Bio Chem 11:1135-1137; J.W.Chihら、(2002), PNAS United States of America 99:11020-11024:およびL.Wang, & P.G.Schultz, (2002), Chem. Comm., 1-10を使用して、アジド含有およびアセチレン含有アミノ酸をタンパク質に部位特異的に組み込んだ。アミノ酸を組み込

んだら、リン酸緩衝液( P B ) ( pH 8 ) 中、 2 m M P E G 誘導体、 1 m M Cu S O<sub>4</sub> 、および~ 1 m g Cu 線の存在下、 37 度で 4 時間、付加環化反応を行った。

#### 【実施例 24】

##### 【0574】

この実施例では、 p - アセチル - D , L - フェニルアラニン( p A F ) および m - P E G - ヒドロキシルアミン誘導体の合成を説明する。

##### 【0575】

Zhang , Z . , Smith , B . A . C . , Wang , L . , Brock , A . , Cho , C . & Schulitz , P . G . , Biochemistry , ( 2003 ) 42 , 6735 - 6746 に以前に記載された手順を用いて、ラセミ p A F を合成した。 10

##### 【0576】

m - P E G - ヒドロキシルアミン誘導体を合成するために、以下の手順を完了した。室温( R T )で 1 時間攪拌した、ジクロロメタン( D C M 、 70 m L )中の( N - t - B o c - アミノオキシ )酢酸( 0 . 382 g 、 2 . 0 mmol )および 1 , 3 - ジイソプロピルカルボジイミド( 0 . 16 m L 、 1 . 0 mmol )の溶液に、メトキシ - ポリエチレングリコールアミン( m - P E G - NH<sub>2</sub> 、 7 . 5 g 、 0 . 25 mmol 、 Bio Vec tra からの M t . 30 K )およびジイソプロピルエチルアミン( 0 . 1 m L 、 0 . 5 mmol )を添加した。この反応物を室温で 48 時間攪拌し、この後、約 100 m L に濃縮した。この混合物を冷エーテル( 800 m L )に一滴ずつ添加した。 t - B o c 保護生成物が沈殿し、それを濾過により回収し、エーテル 3 × 100 m L により洗浄した。 D C M ( 100 m L )での再溶解およびエーテル( 800 m L )中での沈殿、 2 回により、それをさらに精製した。この生成物を真空中で乾燥させることにより、 7 . 2 g ( 96 % )を生じた( N M R および N i h d r i n 試験により確認)。 20

##### 【0577】

上で得られた保護生成物の( 7 . 0 g )の脱 B o c を、 50 % T F A / D C M ( 40 m L )中、 0 度で 1 時間、次いで、室温で 1 . 5 時間行った。真空中で大部分の T F A を除去した後、残留物へのジオキサン中 4 N の H C l ( 1 m L )の添加により、このヒドロキシルアミン誘導体の T F A 塩を H C l 塩の転化させた。沈殿を D M S ( 50 m L )に溶解し、エーテル( 800 m L )に再び溶解した。最終生成物( 6 . 8 g 、 97 % )を濾過によって回収し、エーテル 3 × 100 m L で洗浄し、真空中で乾燥させ、窒素下で保管した。他の P E G ( 5 K 、 20 K )ヒドロキシルアミン誘導体は、同じ手順を用いて合成した。 30

#### 【実施例 25】

##### 【0578】

この実施例では、天然でないアミノ酸を含む h G H ポリペプチドに使用する発現および精製方法を説明する。宿主細胞を直交性 t R N A 、直交性アミノアシル t R N A シンセターゼ、および h G H 構築物で形質転換されている。

##### 【0579】

形質転換 D H 10 B ( f i s 3 ) 細胞の冷凍グリセロールストックの少量( small stab )を、先ず、 100 μ g / m L のアンピシリン含有する 2 m L の合成培地( 口イシン、イソロイシン、微量金属およびビタミンを補足したグルコース最小培地 )中、 37 度で増殖させた。 O D<sub>600</sub> が、 2 から 5 に達したら、 100 μ g / m L のアンピシリン含有する 60 μ L を 60 m L の新たな合成培地に移し、 2 から 5 の O D<sub>600</sub> まで 37 度で再び増殖させた。この培養物の 50 m L を、 5 リットル発酵槽( Sartorius B B I )内の 100 μ g / m L のアンピシリン含有する 2 リットルの合成培地に移した。発酵槽の pH は、炭酸カリウムで 6 . 9 に制御し、温度は 37 度に制御し、空気流量は 5 L p m に制御し、およびポリアルキレン脱泡剤 K F O F 119 ( Lubrizol )で泡を制御した。攪拌速度は、溶解酸素レベル 30 % を維持するように自動調整し、攪拌速度が最大値に達したら、純粋な酸素を使用して、空気のスパージングを補足した。 37 度で 8 時間後、培養物に 50 X 濃度の合成培地を指數増加速度で供給して、 0 . 15 時 40 50

間<sup>-1</sup>の比増殖速度を維持した。OD<sub>600</sub>が、100に達したら、パラ-アセチル-フェニルアラニンのラセミ混合物を3.3 mMの最終濃度になるまで添加し、温度を28に下げた。0.75時間後、イソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシドを0.25 mMの最終濃度になるまで添加した。細胞をさらに8時間、28で増殖させ、ペレット化し、さらなる処理まで-80で保管した。

#### 【0580】

His標識突然ヘリhGHタンパク質は、ProBond Nickel-Chelating Resin(カリフォルニア州、カールズバッドのInvitrogen)を使用して、Invitroganのインストラクションマニュアルにより提供された標準的なHis標識タンパク質精製手順により精製し、この後、アニオン交換カラムを使用して精製した。  
10

#### 【0581】

精製したhGHを8 mg/mLに濃縮し、緩衝液を反応緩衝液(20 mM 酢酸ナトリウム、150 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 4.0)に交換した。MPEG-Oxyamine粉末を、このhGH溶液に、20:1のPEG:hGHモル比で添加した。穏やかに攪拌しながら、28で2日間、反応を行った。このPEG-hGHを、アニオン交換カラムにより、未反応PEGおよびhGHから精製した。

#### 【0582】

動物実験に入る前に、各PEG化突然変異hGHの量を3回のアッセイにより評価した。PEG-hGHの純度は、非還元条件下でMES SDSランニングバッファを用いて4から12%アクリルアミドNuPAGE Bis-Trisゲルをランすることにより検査した(Invitrogen)。クマシーブルーでゲルを染色した。PEG-hGHバンドは、比重走査を基に95%より高い純度であった。各PEG-hGHにおける内毒素レベルは、Charles River Laboratories(マサチューセッツ州、ウィルミントン)からのKTA<sup>2</sup>キットを使用する反応速度LALアッセイにより検査し、1用量あたり5 EU未満であった。PEG-hGHの生物活性を(実施例2で述べた)IM-9 pSTAT5バイオアッセイで評価し、EC<sub>50</sub>値は、15 nM未満であった。  
20

#### 【実施例26】

#### 【0583】

この実施例では、天然でないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの精製および均質性を評価する方法を説明する。  
30

#### 【0584】

図8は、位置92に天然でないアミノ酸を含むhGHポリペプチドのSDS-PAGEである。このゲルのレーン3、4および5は、5 kDa、20 kDaまたは30 kDaいずれかのPEG分子に共有結合により連結している位置92のp-アセチル-フェニルアラニンを含むhGHを示すものである。PEG化されている天然でないアミノ酸を含むさらなるhGHポリペプチドを図11に示す。核PEG-hGHタンパク質の5 μgを各SDS-PAGEに負荷した。図11、パネルA:レーン1、分子量マーカー；レーン2、WHO r h GH参照標準物質(2 μg)；レーン3および7、30 KPEG-F92 pAF；レーン4、30 KPEG-Y35 pAF；レーン5、30 KPEG-R134 pAF；レーン6、20 KPEG-R134 pAF；レーン8、WHO r h GH参照標準物質(20 μg)。図11、パネルB:レーン9、分子量マーカー、レーン10、WHO r h GH参照標準物質(2 μg)；レーン11、30 KPEG-F92 pAF；レーン12、30 KPEG-K145 pAF；レーン13、30 KPEG-Y143 pAF；レーン14、30 KPEG-G131 pAF；レーン15、30 KPEG-F92 pAF/G120R、およびレーン16 WHO r h GH参照標準物質(20 μg)。図9は、IM-9細胞におけるPEG化hGHポリペプチド(5 kDa、20 kDa、または30 kDa PEG)の生物活性を示すものであり、方法は、実施例2において説明したとおり行った。  
40  
50

## 【0585】

hGH-P EGコンジュゲートの純度は、タンパク質溶解性分解（トリプシン分解を含むが、これに限定されない）、続く質量スペクトル分析により評価することができる。Pe pinsky B.ら、J. Pharmcol. & Exp. Ther. 297(3) : 1059 - 66 (2001)。トリプシン消化を行うための方法は、the European Pharmacopoeia (2002) 第四版, pp. 1938) にも記載されている。記載されているこれらの方法への修正を行った。サンプルを、一晩、50 mM TRIS-HCl (pH 7.5) 中で透析した。rhGHポリペプチドを、37 の水浴内で4時間、66:1の質量比でトリプシン (TPCK処理トリプシン、Worthington)と共にインキュベートした。これらのサンプルを数分間、氷上でインキュベートして、消化反応を停止させ、この後、HPLC分析の間は4 に保った。0.1%トリフルオロ酢酸中、消化サンプル (~200 μg) を、25 × 0.46 cm Vy dac C-8カラム (5 μM ビーズサイズ、100 細孔サイズ) に負荷し、30 、1 mL / 分の流量で、70分にわたって0から80%アセトニトリルの勾配で溶離した。トリプシンペプチドの溶離は、214 nmでの吸光度によりモニターした。

## 【0586】

図10、パネルAは、hGHの一次構造を描いたものであり、トリプシン分解部位を指摘し、ならびに天然でないアミノ酸置換、F92pAFを矢印で指定している (Bekerら Biotechnol Appl Biochem. (1988) 10 (4) : 326 - 337からのものを修正した図)。パネルBは、PEG化されている天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドから生じさせたペプチド (30K PEG His<sub>6</sub>-F92pAF rhGH、Aと標識してあるもの)、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドから生じさせたペプチド (His<sub>6</sub>-F92pAF rhGH、Bと標識してあるもの)、および野生型hGHから生じさせたペプチド (WHO rhGH、Cと標識してあるもの)の重ね合わせマップを示すものである。WHO rhGHのトリプシンマップとHis<sub>6</sub>-F92pAF rhGHのトリプシンマップの比較は、2つのピーク（ペプチドピーク1およびペプチドピーク9）のみがシフトしており、残りのピークは同じであることを示す。これらの違いは、ピーク1のシフトを生じさせる、発現されたHis<sub>6</sub>-F92pAF rhGHのN末端上のHis<sub>6</sub>の付加に起因しており、これに対して、ピーク9におけるシフトは、残基92のフェニルアラニンのp-アセチル-フェニルアラニンでの置換により生じる。パネルC - パネルBからのピーク9の拡大図を示す。His<sub>6</sub>-F92pAF rhGHトリプシンマップと30K PEG His<sub>6</sub>-F92pAF rhGHトリプシンマップの比較は、His<sub>6</sub>-F92pAF rhGHがPEG化するとピーク9が消えることを示し、従って、修飾がペプチド9に特異的であることが確認される。

## 【実施例27】

## 【0587】

この実施例では、各々が天然でないアミノ酸を含む2つのhGHポリペプチドから成るホモ二量体を説明する。

## 【0588】

図12は、位置92でのp-アセチル-フェニルアラニン置換を含むHis標識hGHポリペプチドからのIM-9アッセイ結果と、hGHのPEG化について実施例25で説明したような官能基および反応性を有する二官能性のリンカーをでつなぎ合わされたこの修飾されたポリペプチドからのIM-9アッセイ結果とを比較するものである。

## 【実施例28】

## 【0589】

この実施例では、hGH拮抗薬として作用する単量体および二量体hGHポリペプチドを説明する。

## 【0590】

G120R置換がSite IIに導入されたhGH突然変異タンパク質は、单一のh

10

20

30

40

50

G H受容体に結合することができるが、2つの受容体を二量体化することはできない。この突然変異タンパク質は、おそらく細胞内シグナル伝達経路を活性化することなく受容体部位を占有することにより、インビトロでh G H拮抗薬として作用する(Fuh, G.ら、Science 256: 1677-1680(1992))。図13、パネルAは、G120R置換を有するh G HによるpSTAT5のリン酸化を測るIM-9アッセイデータを示すものである。同じ位置(G120)に天然でないアミノ酸が組み込まれたh G Hポリペプチドは、図13、パネルBに示すように、h G H拮抗薬としても作用する分子を生じさせた。図13、パネルBに示すh G H拮抗薬の二量体は、h G HのPEG化について実施例25で説明したような官能基および活性を有する二官能性のリンカーでつなぎ合わせることにより構築した。図14は、このダイマーも、IM-9アッセイにおいて生物活性を欠くことを示すものである。

## 【0591】

G120pAF置換を含むh G Hポリペプチドと、PEGリンカーによりつなぎ合わされたG120pAF修飾h G Hポリペプチドの二量体とを比較する追加アッセイを行った。STAT5のリン酸化を導入したWHO h G Hを、この単量体およびPEGリンカーによりつなぎ合わされた二量体の用量応答曲線と比較した。表面受容体競合試験も行い、これは、この単量体および二量体が、IM-9およびラットGHR(L43R)/BAF3細胞上の細胞表面受容体結合についてG Hと競合することを示した。二量体は、単量体より強力な拮抗薬として作用した。表4は、これらの試験からのデータを示すものである。

## 【0592】

## 【表6】

表4			
細胞系	IM-9	IM-9	ラットGHR (L43R)/BAF3
アッセイ	pSTAT5 の阻害	表面受容体競合	表面受容体競合
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)
G120pAF 単量体	3.3	8.4	3.1
(G120pAF)二量体, PEG	0.7	2.7	1.4
リンカー			

## 【実施例29】

## 【0593】

この実施例では、h G H活性およびh G Hポリペプチドのh G H受容体に対する親和性の測定を詳述する。

## 【0594】

ラットG H受容体のクローニングおよび精製 ラットG H受容体の細胞外ドメイン(GHR ECD、アミノ酸S29-T238)を、C末端6 Hisタグを有するフレーム内のNde I部位とHind III部位の間のpET20bベクター(Novagen)にクローニングした。L43からRへの突然変異を導入して、ヒトG H受容体結合部位にさらに近づけた(Souzaら、Proc Natl Acad Sci U S A. (1995) 92(4): 959-63)。30で4から5時間、0.4 mM IPTGと共にインキュベートすることにより、BL21(DE3)大腸菌細胞(Novagen)において組換えタンパク質を生産させた。これらの細胞を溶解した後、このペレットを、ダンスにおいて懸濁させることにより、30mLの50mM Tris(pH7.6)、100mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100で4回、およびTriton X-100を含まない同緩衝液で2回洗浄した。この時点で、封

10

20

30

40

50

入体は、95%より多くのGHR ECDから成り、これらを0.1M Tris (pH 11.5)、2M 尿素中で可溶化した。この封入体溶液のアリコートを、50mM Tris (pH 7.8)、1M L-アルギニン、3.7mM シスタミン、6.5mM システアミンで平衡させたS100 (Sigma) ゲル濾過カラムに通すことにより、リフォールディングを遂行した。可溶性タンパク質を含有する画分を併せ、50mM Tris (pH 7.6)、200mM NaCl、10%グリセロールに対して透析した。このサンプルを短時間、遠心分離して、一切の沈殿を除去し、Talon樹脂 (Clontech) のアリコートと共に、製造業者のインストラクションに従ってインキュベートした。5mM イミダゾールを補足した20容量の透析緩衝液でこの樹脂を洗浄した後、透析緩衝液中の120mM イミダゾールでタンパク質を溶離した。最後に、サンプルを、一晩、50mM Tris (pH 7.6)、30mM NaCl、1mM EDTA、10%グリセロールに対して透析し、短時間、遠心分離して一切の沈殿を除去し、20%グリセロール最終濃度に調整し、アリコートにして、-80°Cで保管した。  
= 65, 70  
0 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup> の計算吸光係数を使用してOD(280)によりこのタンパク質の濃度を測定した。

## 【0595】

GHのGHRに対する結合のBiacore (商標) 分析

製造業者により推奨されているような標準的なアミンカップリング手順を使用して、Biacore (商標) で、可溶性GHR ECDの約600から800RUを固定化した。たとえ受容体の優位な部分が、この技法により不活性化されたとしても、このレベルの不動化は、結合反応速度を顕著に変化させることなく約100から150RUの最大特異的GH結合応答を生じさせるために十分であることが判明した。例えば、Cunninghamら J Mol Biol. (1993) 234 (3) : 554 - 63 およびWells JA. Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93 (1) : 1 - 6 参照。

## 【0596】

HBS-EP緩衝液 (Biacore (商標)、Pharmacia) 中の様々な濃度の野生型または突然変異GH (0.1から300nM) を、40μL / 分の流量で4から5分間、GHR表面に注入し、注入後15分間、解離をモニターした。15秒パルスの4.5M MgCl<sub>2</sub>により、この表面を再生した。少なくとも100の再生サイクル後、結合親和性の最小損失 (1から5%) しか観察されなかった。固定化された受容体がない参照細胞を用いて、一切の緩衝液バルク効果および非特異的結合を減算した。

## 【0597】

GH滴定試験から得られた結合反応速度データをBiaEvaluation 4.1ソフトウェア (BIACORE (商標)) で処理した。「Bivalent analyte」会合モデルは、提案された経時的1:2 (GH:GHR) 二量体化と一致する、申し分のないフィット (一般には3未満のカイ二乗値) を提示した (Wells JA. Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93 (1) : 1 - 6)。平衡解離定数 (Kd) は、個々の速度定数の比 (k<sub>off</sub> / k<sub>on</sub>) として計算した。

## 【0598】

表5は、CM5チップ上に固定化したラットGHR ECD (L43R) を使用したときのBiacore (商標) からの結合パラメータを示すものである。

## 【0599】

【表7】

表5			
GH	$k_{on} \times 10^{-5}$ 1/M*s	$k_{off} \times 10^4$ , 1/s	$K_d$ , nM
WHO WT	6.4	3.8	0.6
N-6His WT	9	5.6	0.6
ラットGH WT	0.33	83	250
N12pAF	12.5	4.6	0.4
R16pAF	6.8	4.8	0.7
Y35pAF	7.8	5.3	0.7
E88pAF	6.8	5.4	0.8
Q91pAF	6.6	4.9	0.7
F92pAF	8.6	5.0	0.6
R94pAF	5.6	6.0	1.1
S95pAF	0.7	3.1	4.3
N99pAF	2.2	3.8	1.7
Y103pAF	~ 0.06	~ 6	> 100
Y111pAF	8.4	4.8	0.6
G120R	2.2	22	10
G120pAF	1.1	23	20
G131pAF	6.0	5.3	0.9
P133pAF	6.4	4.9	0.8
R134pAF	8.4	5.8	0.7
T135pAF	7.2	4.5	0.6
G136pAF	6.2	4.3	0.7
F139pAF	6.8	4.4	0.7
K140pAF	7.2	3.7	0.5
Y143pAF	7.8	6.7	0.9
K145pAF	6.4	5.0	0.8
A155pAF	5.8	4.4	0.8
F92pAF-5KD PEG	6.2	2.3	0.4
F92pAF-20KD PEG	1.7	1.8	1.1
F92pAF-30KD PEG	1.3	0.9	0.7
R134pAF-5KD PEG	6.8	2.7	0.4
R134pAF-30KD PEG	0.7	1.7	2.4
Y35pAF-30KD PEG	0.9	0.7	0.7
(G120pAF)二量体	0.4	1.5	3.4
(F92pAF)二量体	3.6	1.8	0.5

10

20

30

40

## 【0600】

## C H R 安定細胞系

RPMI 1640、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシン、10%熱不活性化ウシ胎仔血清、50 uM 2-メルカプトエタノール、およびIL-3源として10%WEHI-3細胞系調整培地の中で、IL-3依存性マウス細胞系、BAF3を型どおり継代させた。すべての細胞培養物は、5%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下、37℃で維持した。

## 【0601】

BAF3細胞系を使用して、ラットGHR(L43)安定細胞クローン、2E2-2B

50

12-F4を樹立した。簡単に言うと、 $1 \times 10^7$ 中等度集密BAF3細胞を、完全長ラットGHR(L43R)cDNAを含有する15ugの線状pCDNA3.1プラスミドとともにエレクトロポレーションに付した。トランスフェクトされた細胞を放置して、48時間回復させた後、800ug/mL G418および5nM WHO hGHを含有する培地内で限界希釀法によりクローニングした。ヒトGHR(ミネソタ州、ミネアポリスのR&D Systems)に対する抗体での表面染色により、GHR発現トランスフェクタントを特定し、FACS Array(カリフォルニア州、サンディエゴのBD Biosciences)で分析した。良好なレベルのGHRを発現しているトランスフェクタントを、次いで、(下で説明するような) BrdU増殖アッセイで、WHO hGHに対する増殖活性についてスクリーニングした。表面受容体発現および増殖能力について常にプロフィールしながら、1.2mg/mL G418および5nM hGHの存在下での所望のトランスフェクタントのサブクローニングをさらに2ラウンド繰り返すことにより、安定にトランスフェクトされたラットGHR(L43R)細胞クローンを樹立した。このようにして樹立した細胞クローン、2E2-2B12-F4を、hGHが不在の状態でBAF3培地+1.2mg/mL G418中で型どおり維持した。

#### 【0602】

##### BrdU標識による増殖

血清飢餓状態のラットGHR(L43R)発現BAF3細胞系、2E2-2B12-F4を、96ウエルプレート内、細胞数 $5 \times 10^4$ /ウエルの密度でプレーティングした。12点容量範囲のhGHタンパク質で細胞を活性化すると同時に、50uM BrdU(ミズーリ州、セントルイスのSigma)で標識した。培養状態で48時間後、細胞を、100uLのBD Cytofix/Cytoperm 溶液(BD Biosciences)で30分間、室温で、固定/透過性化した。BrdUエピトープを露出するために、固定/透過性化した細胞を、30ug/ウエルのDNアーゼ(Sigma)で1時間、37で処理した。APCコンジュゲート型抗BrdU抗体(BD Biosciences)での免疫蛍光染色により、FACS Arrayでサンプルを分析できるようになった。

#### 【0603】

表6は、pSTAT5(IM-9)およびBrdU増殖アッセイでプロフィールしたPEG hGH突然変異体の生体活性を示すものである。

#### 【0604】

【表8】

表6		
hGH	pSTAT5 EC <sub>50</sub> (nM)	増殖 EC <sub>50</sub> (nM)
WHO WT	1.0	1.0
Y35pAF	1.3	1.6 ± 0.8 (n=3)
Y35pAF-30KPEG	10	5.4 ± 2.8 (n=4)
Y35pAF-40KPEG	53.3	24.0 ± 11.0 (n=3)
F92pAF	2.2 ± 0.4 (n=9)	1.4 ± 0.7 (n=4)
F92pAF-5KPEG	5.1 ± 0.4 (n=3)	ND
F92pAF-20KPEG	10.5 ± 0.8 (n=3)	ND
F92pAF-30KPEG	8.8 ± 1.2 (n=8)	4.1 ± 0.9 (n=3)
F92pAF/G120R	>200,000	>200,000
F92pAF/G120R-30KPEG	>200,000	>200,000
G131pAF	2.3 ± 1.8 (n=2)	2.1 ± 1.1 (n=3)
G131pAF-30KPEG	23.8 ± 1.7 (n=2)	4.6 ± 2.4 (n=3)
R134pAF	1.1 ± 0.2 (n=2)	1.7 ± 0.3 (n=3)
R134pAF-20KPEG	5.3	ND
R134pAF-30KPEG	11.3 ± 1.1 (n=2)	2.5 ± 0.7 (n=4)
Y143pAF	1.6 ± 0.1 (n=2)	1.8 ± 0.6 (n=2)
Y143pAF-30KPEG	12.3 ± 0.9 (n=2)	6.6 ± 2.7 (n=3)
K145pAF	2.3 ± 0.5 (n=2)	3.0 ± 1.4 (n=2)
K145pAF-30KPEG	20.6 ± 9.8 (n=2)	5.3 ± 3.5 (n=3)

## 【実施例30】

## 【0605】

この実施例では、PEG化hGHのインビトロおよびインビオ活性を測定する方法を説明する。

## 【0606】

細胞結合アッセイ

細胞 ( $3 \times 10^6$ ) を、PBS / 1% BSA ( $100 \mu L$ ) 中、様々な濃度(体積:  $10 \mu L$ ) の非標識GH、hGHまたはGM-CSFの不在または存在下、および $^{125}$ I-GHの存在下、0で、90分間、二重重複でインキュベートする。次に、 $350 \mu L$  遠心分離管内で、 $200 \mu L$  の氷冷FCSを用いて細胞を浮遊させ、層化し、遠心分離( $1000 g$ ; 1分)する。この管の端を切断することによりペレットを回収し、ガンマカウンタ(Packard)でペレットおよび上清を別々にカウントする。

## 【0607】

特異的結合(cpm)は、競合物質(二重重複の平均)マイナス結合(cpm)の不在下、100倍過剰の非標識GH(非特異的結合)の存在下での全結合として決定する。非特異的結合を各細胞タイプについて測定する。実験は、 $^{125}$ I-GHの同じ調製物を使用して別の日に行う。 $^{125}$ I-GHは、GH受容体生産細胞への結合を示す。この結合は、非標識天然GHまたはhGHにより用量依存的に阻害されるが、GM-CSFおよび負の対照によっては阻害されない。天然GHに類似した天然 $^{125}$ I-GHの結合について競合するhGHのこの能力は、これらの受容体が、両方の形態を等しく十分に認識することを示唆している。

## 【0608】

PEG化hGHのインビオ試験

PEG-hGH、未修飾hGHおよび緩衝溶液をマウスまたはラットに投与する。結果

10

20

30

40

50

は、未修飾 hGH と比較して本発明の PEG 化 hGH の勝った活性および延長された半減期を示すであろう（これは、有意な体重増加によって示される）。

#### 【0609】

コンジュゲートしたおよびコンジュゲートしていない hGH およびこれらの変異体のインビポ半減期の測定

すべての動物実験は、セントルイス大学の施設内動物管理使用委員会 (the Institutional Animal Care and Use Committee of St. Louis University) により承認されたプロトコルのもと、AAALAC 認証施設内で行った。12 時間昼夜サイクルの室内のケージにラットを個別に収容した。動物は、認定 Purina rodent chow 5001 および水に任意に接近できるようにした。下垂体を切除したラット用の飲料水は、5% グルコースを追加で含むものであった。

#### 【0610】

##### 薬物動態試験

動物実験に入る前に、各 PEG 化突然変異 hGH の量を 3 つのアッセイにより評価した。PEG - hGH の純度は、非還元条件下で MES SDS ランニングバッファを用いて 4 から 12% アクリルアミド NuPAGE Bis - Tris ゲルをランすることにより検査した（カリフォルニア州、カールズバッドの Invitrogen）。クマシープルーデゲルを染色した。PEG - hGH バンドは、比重走査を基に 95% より高い純度であった。各 PEG - hGH における内毒素レベルは、Charles River Laboratories (マサチューセッツ州、ウィルミントン) からの KTA<sup>2</sup> キットを使用する反応速度 LAL アッセイにより検査し、1 用量あたり 5 EU 未満であった。PEG - hGH の生物活性を（実施例 2 で述べた）IM - 9 pSTAT5 バイオアッセイで評価し、EC<sub>50</sub> 値は、15 nM 未満であることが確認された。

#### 【0611】

Charles River Laboratories から入手した雄 Sprague - Dawley ラット（261 から 425 g）において、PEG で修飾された成長ホルモン化合物の薬物動態特性を、互いに、および非 PEG 化成長ホルモンと比較した。首尾よくカテーテルを取り付けた後、動物を投薬前に治療グループ（1 グループにつき 3 から 6 匹）に割り付けた。1 mg / kg の化合物を 0.41 から 0.55 mL / kg の投薬量で動物に皮下投与した。留置カテーテルにより様々な時点で血液サンプルを回収し、EDTA 被覆遠心分離管に入れた。遠心分離後、血漿を回収し、分析するまで -80° で保管した。化合物濃度は、BioSource International (カリフォルニア州、カマリロ) または Diagnostic System Laboratories (テキサス州、ウェブスター) いずれかからの抗体サンドイッチ型成長ホルモン ELSA キットを使用して測定した。投薬した類似体に対応する標準物質を使用して濃度を計算した。薬物動態パラメータは、モデリングプログラム WinnNonlin (Pharsight、バージョン 4.1) を使用して概算した。線形上昇 / 対数下降の台形関数での非区画分析を使用し、濃度データに均一に重み付けした。

#### 【0612】

図 15 は、ラットにおける 1 回の皮下投与後の平均 (+/- S.D.) 血漿濃度を示すものである。ラット（グループあたり、n = 3 から 4）に、1 mg / kg の hGH 野生型タンパク質 (WHO hGH)、His 標識 hGH ポリペプチド (His - hGH)、または 30 kDa PEG に共有結合により連結している位置 92 の天然でないアミノ酸 p - アセチル - フェニルアラニンを含む His 標識 hGH ポリペプチド (30KPEG - pAF92 (His) hGH) のボーラス 1 回量を与えた。血漿サンプルを示されている時間間隔で採取し、記載されている注入化合物についてアッセイした。30KPEG - pAF92 (His) hGH は、対照 hGH と比較して劇的に延長された循環時間を有した。

#### 【0613】

図 16 は、ラットにおける 1 回の皮下投与後の平均 (+/- S.D.) 血漿濃度を示す

10

20

30

40

50

ものである。ラット(グループあたり、n = 3から6)に、1 mg / kgのタンパク質をボーラス1回量を与えた。6つの異なる位置各々で30 kDa PEGに共有結合により連結している天然でないアミノ酸p-アセチル-フェニルアラニンを含むhGHポリペプチドを、WHO hGHおよび(his)-hGHと比較した。血漿サンプルを示されている時間間隔で採取し、記載されている注入化合物についてアッセイした。図7は、図16に示したhGHポリペプチドの1回量投与についての薬物動態パラメータを示すものである。濃度対時間曲線を非区画分析(Pharsight、バージョン4.1)により評価した。示されている値は、平均(+/-標準偏差)である。Cmax:最大濃度;終末 $t_{1/2}$ :終末半減期;AUC<sub>0->inf</sub>:無限大に外挿される濃度-時間曲線の曲線下面積;MRT:平均滞留時間;C1/f:見掛けの全血漿クリアランス;Vz/f:終末基の間の見掛けの分布容積。

## 【0614】

## 【表9】

表7:正常な雄Sprague-Dawleyラットにおける1回量1mg/kgボーラス皮下投与についての薬物動態パラメータ値

化合物(n)	パラメータ					
	Cmax (ng/ml)	終末 $t_{1/2}$ (h)	AUC <sub>0-&gt;inf</sub> (ngXhr/ ml)	MRT (h)	Cl/f (ml/hr/ kg)	Vz/f (ml/kg)
WHO hGH (3)	529 (+127)	0.53 (+0.07)	759 (+178)	1.29 (+0.05)	1,368 (+327)	1051 (+279)
(his)hGH (4)	680 (+167)	0.61 (+0.05)	1,033 (+92)	1.30 (+0.17)	974 (+84)	853 (+91)
30KPEG-pAF35(his)hGH (4)	1,885 (+1,011)	4.85 (+0.80)	39,918 (+22,683)	19.16 (+4.00)	35 (+27)	268 (+236)
30KPEG-pAF92(his)hGH (6)	663 (+277)	4.51 (+0.90)	10,539 (+6,639)	15.05 (+2.07)	135 (+90)	959 (+833)
30KPEG-pAF131(his)hGH (5)	497 (+187)	4.41 (+0.27)	6,978 (+2,573)	14.28 (+0.92)	161 (+61)	1,039 (+449)
30KPEG-pAF134(his)hGH (3)	566 (+204)	4.36 (+0.33)	7,304 (+2,494)	12.15 (+1.03)	151 (+63)	931 (+310)
30KPEG-pAF143(his)hGH (5)	803 (+149)	6.02 (+1.43)	17,494 (+3,654)	18.83 (+1.59)	59 (+11)	526 (+213)
30KPEG-pAF145(his)hGH (5)	634 (+256)	5.87 (+0.09)	13,162 (+6,726)	17.82 (+0.56)	88 (+29)	743 (+252)

## 【0615】

## 薬力学的試験

下垂体を切除した雄Sprague-DawleyラットをCharles River Laboratoriesから入手した。下垂体は、週齢3から4週で手術により除去された。動物を3週の期間にわたって順化させ、この間の体重をモニターした。この試験の開始前の7日の期間に体重が0から8g増えた動物は、組み入れ、治療グループにランダムに割り付けた。ラットにボーラス量または1日量を皮下投与した。この試験を通して、ラットを毎日、順次、計量し、麻酔、瀉血し、投薬した(適用可能な場合)。ヘパリンで処理した毛細管を使用して眼窩から血液を採取し、EDTA被覆遠心分離管に入れた。遠心分離により血漿を単離し、分析するまで-80で保管した。

## 【0616】

図17は、ラットにおける1回の皮下投与後の平均(+/-S.D.)血漿濃度を示すものである。ラット(グループあたり、n = 5から7)に、2.1 mg / kgのタンパク質をボーラス1回量を与えた。2つの異なる位置(位置35、92)で30 kDa PEGに共有結合により連結している天然でないアミノ酸p-アセチル-フェニルアラニンを含むhGHポリペプチドからの結果を示す。血漿サンプルを示されている時間間隔で採取し、記載されている注入化合物についてアッセイした。

10

20

30

40

50

## 【0617】

ペプチド IGF - 1 は、ソマトメジンまたはインスリン様成長因子のファミリーの 1 メンバーである。IGF - 1 は、成長ホルモンの成長促進効果の多くを媒介する。規定ラット / マウス IGF - 1 標準物質 (Diagnostic Systems Laboratories) に対する競合結合酵素イムノアッセイキットを使用して、IGF - 1 濃度を測定した。両側分布、対応なし、等分散を用いる t 検定により有意差を決定した。図 18 、パネル A は、下垂体を切除したラットにおける化合物の評価を示すものである。ラット (1 グループあたり n = 5 から 7) に 1 回量または 1 日量を皮下投与した。動物を、毎日、順次、計量し、麻酔し、瀉血し、投薬した (適用可能な場合)。プラシーボ治療、野生型 hGH (hGH) 、 His 標識 hGH ((His)hGH) 、および位置 35 および 92 で 30 kDa PEG に共有結合により連結している p - アセチル - フェニルアラニンを含む hGH ポリペプチドについての体重の結果を示す。図 18 、パネル B - PEG 化されている天然にはコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドの 1 回量の投与後の循環血清 IGF - 1 レベルに対する効果を示す図である。図 18 、パネル A において、30 KPEG - pAF35 (His)hGH 化合物についての 9 日目の体重増加が、30 KPEG - pAF92 (His)hGH 化合物と統計学的に異なっており (p < 0.005) 、より大きな体重増加が観察された。

## 【0618】

図 18 、パネル C は、下垂体を切除した (hypophysectomized) ラットにおける化合物の評価を示すものである。ラット (1 グループあたり n = 11) に 1 回量または 1 日量を皮下投与した。動物を、毎日、順次、計量し、麻酔し、瀉血し、投薬した (適用可能な場合)。プラシーボ治療、野生型 hGH (hGH) 、および位置 92 、 134 、 145 、 131 および 143 で 30 kDa PEG に共有結合により連結している p - アセチル - フェニルアラニンを含む hGH ポリペプチドについての体重の結果を示す。図 18 、パネル D - プラシーボ治療および野生型 hGH と比較して、PEG 化されている (位置 92 、 134 、 145 、 131 、 143) 天然にはコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドの 1 回量の投与後の循環血清 IGF - 1 レベルに対する効果を示す図である。図 18 、パネル E は、PEG 化されている (位置 92 、 134 、 145 、 131 、 143) 天然にはコードされないアミノ酸を含む hGH ポリペプチドに対応する平均 (+/- S.D.) 血漿濃度を示すものである。血漿サンプルを示している時間間隔で採取し、記載されている注入化合物についてアッセイした。棒は、標準偏差を表す。

## 【実施例 31】

## 【0619】

天然にはコードされないアミノ酸を含む PEG 化 hGH の安全性および / または有効度のヒト臨床試験

目的 皮下投与される、天然にはコードされないアミノ酸を含む PEG 化組換えヒト hGH の安全性および薬物動態を、市販の hGH 製品 (Humatrope (商標) (Eli Lilly & Co.) 、 Nutropin (商標) (Genentech) 、 Norditropin (商標) (Novo-Nordisk) 、 Genotropin (商標) (Pfizer) および Saizen / Serostim (商標) (Serono) ) の 1 つ以上と比較すること。

## 【0620】

患者 年齢範囲 20 から 40 の間、体重 60 から 90 kg の間の健康な 18 人のボランティアが、この試験に登録した。被験者は、血液学または血清化学に関する臨床的に有意な異常検査値、ならびに負の尿毒素スクリーニング、HIV スクリーニングおよび B 型肝炎抗原を有さないであろう。彼らは、以下のいかなる証拠も有してはならない：高血圧；あらゆる原発性血液疾患の履歴；有意な肝臓病、腎臓病、心血管疾患、胃腸疾患、尿生殖器疾患、代謝性疾患、神経疾患の履歴；貧血または発作疾患の履歴；細菌もしくは哺乳動物由来の製品、PEG またはヒト血清アルブミンに対する既知感受性；カフェイン含有飲料の常用者および大量消費者；いずれかの他の臨床試験への参加、または試験開始の 3

0日以内に輸血または血液供与を受けている；試験開始の3ヶ月以内にhGHに暴露されている；試験開始の7日以内に病気にかかっている；ならびに試験開始の14日以内に試験前身体検査または臨床試験評価で有意な異常を有する。すべての被検は、安全性について評価することができ、薬物動態分析のためのすべての血液採取は、計画されたとおり採取する。すべての試験は、施設内倫理委員会の承認および患者の同意をもって行う。

#### 【0621】

試験計画 これは、健康な男性ボランティアにおけるI相、一施設、非盲検、無作為化、二点交叉試験となる。18人の被験者を2つの治療シーケンスグループ（被験者9人／グループ）のうちの1つに無作為に割り付ける。天然にはコードされないアミノ酸を含む本PEG化hGHおよび選択された市販の製品の等用量を使用して、上腿におけるボーラス皮下注射として、2つの別の投薬期間でGHを投与する。市販の製品の投与の用量および頻度は、このパッケージラベルに指示されているとおりである。追加の被験者グループを組み入れることにより、市販の製品を使用して、追加の投薬、投薬頻度、または望みどおりの他のパラメータを本試験に追加してもよい。各投薬期間は、14日のウォッシュアウト期間により分けられている。投薬期間と投薬期間の間ではなく、2つの投薬期間各自の前少なくとも12時間および後72時間は、患者を試験施設内に拘束した。PEG化hGHの追加の投薬頻度または他のパラメータに対して同様に検査しなければならない場合には、追加の被験者グループを追加することができる。ヒトでの使用の承認を受けている多数の調合物をこの試験において使用することができる。Humatrope（商標）（Eli Lilly & Co.）、Nutropin（商標）（Genentech）、Norditropin（商標）（Novo-Nordisk）、Genotropin（商標）（Pfizer）およびSaizen/Serostim（商標）（Serono）は、ヒトでの使用の承認を受けている市販のGH製品である。hGHの実験用調合物は、天然にはコードされないアミノ酸を含むPEG化hGHである。

10

20

30

#### 【0622】

採血 hGHの投与前および後に直接静脈穿刺により連続血液採取する。血清GH濃度を判定するための静脈血液サンプル（5mL）を、投薬前約30、20および10分の時点（3つのベースラインサンプル）ならびに投薬後のほぼ次の時点を得る：30分、ならびに1、2、5、8、12、15、18、24、30、36、48、60および72時間。各血清サンプルを2つのアリコートに分ける。すべての血清サンプルは、-20で保管する。血清サンプルは、ドライアイスを用いて出荷される。1日目の最初の投薬直前、4日目の朝、16位置目の投薬直前、および19日目の朝に絶食時臨床検体検査（血液学、血清化学および尿検査）を行う。

30

#### 【0623】

生体分析方法 ELISAキット手順（テキサス州、ウェブスターのDiagnostic Systems Laboratory [DSL]）を血清GH濃度の判定に使用する。

#### 【0624】

安全性の判定 各投薬（1日目および16日目）の直前ならびに各投薬の6、24、48および72時間後に、生命徵候を記録する。安全性の判定は、悪性事象の発生数およびタイプならびにベースラインからの臨床検体検査の変化に基づく。加えて、血圧をはじめとする生命徵候測定に関する試験前からの変化および身体検査の結果を評価する。

40

#### 【0625】

データ分析 投薬前30、20および10分の時点で採取した3つのサンプルからのGHレベルの平均から決定される平均ベースラインGH濃度を投薬後の各値から減算することにより、投薬後血清濃度値を投薬前ベースラインGH濃度について補正する。投薬前GH濃度は、これらがこのアッセイの定量レベルより下である場合には、平均値の計算に含めない。ベースラインGH濃度について補正した血清濃度データから、薬物動態パラメータを決定する。薬物動態パラメータは、最新版のBIOAVLソフトウェアを使用して、Digital Equipment Corporation VAX 8600コ

50

ンピュータシステムで、機種非依存型の方法により計算する。以下の薬物動態パラメータを決定する：ピーク血清濃度（ $C_{\max}$ ）；ピーク血清濃度までの時間（ $t_{\max}$ ）；線形台形法則を使用して計算したゼロ時から最終血液採取時までの濃度 - 時間曲線の曲線下面積（AUC）（ $AUC_{0-72}$ ）；および排出速度定数からコンピュータ計算される、終末排出半減期（ $t_{1/2}$ ）。排出速度定数は、対数 - 線形濃度 - 時間プロットの終末線形領域における連続データ点の線形解析により概算される。薬物動態パラメータの平均、標準偏差（SD）および変動係数（CV）を治療ごとに計算する。パラメータ平均の比（保存されるフォーミュレーション / 保存されないフォーミュレーション）を計算する。

#### 【0626】

安全性の結果 有害事象の発生は、治療グループ全体にわたって等しく分散されている。ベースラインならびに試験前臨床検体検査および血圧からの臨床的に有意な変化はなく、ならびに身体検査の結果および生命徵候測定に関する試験前から顕著な変化はない。2つの治療グループについての安全性プロフィールは、同様に見える。

#### 【0627】

薬物動態の結果 1つ以上の市販のhGH製品（Humatropope（商標）（Eli Lilly & Co.）、Nutropin（商標）（Genentech）、Norditropin（商標）（Novo-Nordisk）、Genotropin（商標）（Pfizer）およびSaizen/Serostim（商標）（Serono）を含むが、これらに限定されない）の1回量を受けた後の18人すべての被験者における平均血清GH濃度 - 時間プロフィール（ベースラインGHレベルについて未補正）を、測定した各時点で、天然にはコードされないアミノ酸を含む本PEG化hGHと比較する。すべての被験者は、正常な生理範囲内の投薬前ベースラインGH濃度を有さねばならない。薬物動態パラメータは、投薬前平均ベースラインGH濃度について補正した血清データから決定し、ならびに $C_{\max}$ および $t_{\max}$ を決定する。（Humatropope（商標）（Eli Lilly & Co.）、Nutropin（商標）（Genentech）、Norditropin（商標）（Novo-Nordisk）、Genotropin（商標）（Pfizer）およびSaizen/Serostim（商標）（Serono））から選択される臨床コンパレータ（複数を含む）についての平均 $t_{\max}$ は、天然にはコードされないアミノ酸を含む本PEG化hGHについての $t_{\max}$ より有意に短い。検査した市販のhGH製品についての終末半減期値は、天然にはコードされないアミノ酸を含む本PEG化hGHについての終末半減期と比較して、有意に短い。

#### 【0628】

本試験は、健康な男性被験者において行うが、同様の吸収特性および安全性プロフィールが、他の患者集団、例えば、癌もしくは慢性腎疾患に罹患している男性もしくは女性患者、小児腎疾患患者、自己血貯血プログラムを受けている患者、または選択的な手術が予定されている患者にも期待されるであろう。

#### 【0629】

結論として、天然にはコードされないアミノ酸を含むPEG化hGHの皮下投与1回量は、安全であり、健康な男性患者に許容されるであろう。有害事象発生率、臨床検査値、生命徵候、および身体検査の結果の比較を基に、市販の形態のhGHおよび天然にはコードされないアミノ酸を含むPEG化hGHは、等価であろう。天然にはコードされないアミノ酸を含むPEG化hGHは、患者およびヘルスケア提供者に大きな臨床的有用性をもたらす。

#### 【0630】

本明細書に記載の実施例および実施態様が、例証をのみを目的とするものであること、本明細書に記載の実施例および実施態様にかんがみて様々な変形および変更が、当業者に示唆されるであろうということ、こうした変形および変更が、本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に包含されることは、理解される。本明細書において引用したすべての出版物、特許および特許出願は、あらゆることを目的として、これら全文、本明細書に参照により組み込まれている。

10

20

30

40

50

【0631】

【表10】

表8:引用した4ヘリックスバンドル配列

SEQ ID #	配列名
1	hGHの完全長アミノ酸配列
2	hGHの成熟アミノ酸配列(アイソフォーム1)
3	hGHの残基32から46が欠失している20kDa hGH変異体
21	完全長hGHのヌクレオチド配列
22	成熟hGHのヌクレオチド配列

10

【図面の簡単な説明】

【0632】

【図1】4ヘリックスバンドル型タンパク質の一般構造を示す図である。

【図2】4ヘリックスバンドル型タンパク質成長ホルモン(GH)の一般構造を示す図である。

【図3】4ヘリックスバンドル型タンパク質エリスロポエチン(EPO)の一般構造を示す図である。

【図4】4ヘリックスバンドル型タンパク質インターフェロンアルファ-2(IFN-2)の一般構造を示す図である。

【図5】4ヘリックスバンドル型タンパク質顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の一般構造を示す図である。

【図6】天然にはコードされないアミノ酸p-アセチルフェニルアラニンを次の各位置: Y35、F92、Y111、G131、R134、K140、Y143、またはK145に含むhGHの発現を実証する、クマシープルーカラーリングSDS-PAGEを示す図である。

【図7-1】パネルAおよびB:IM9細胞上の天然にはコードされないアミノ酸を含むhGH(パネルB)および野生型hGH(パネルA)の生物活性を示す図である。

【図7-2】パネルAおよびB:IM9細胞上の天然にはコードされないアミノ酸を含むhGH(パネルB)および野生型hGH(パネルA)の生物活性を示す図である。

【図8】この天然にはコードされないアミノ酸へのPEGの共有結合性リンクエージ(5、20および30kDa)によりPEG化される天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHの生産を実証する、クマシープルーカラーリングSDS-PAGEを示す図である。

【図9】IM9細胞上の天然にはコードされないアミノ酸を含む、様々なPEG化形態のhGHの生物活性の実証を示す図である。

【図10-1】パネルA:hGHの一次構造を示し、トリプシン切断部位を指摘し、天然でないアミノ酸置換、F92pAFを矢印で指定した図(Beckerら.Biochem.hnol Appl Biochem.(1988)10(4):326-337から修正した図)である。

【図10-2】パネルB:PEG化されている天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドから生成させたペプチド(Aと標識したもの)、天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドから生成させたペプチド(Bと標識したもの)、およびWHO-rhGHから生成させたペプチド(Cと標識したもの)の、トリプシン重ね合わせマップを示す図である。パネルC:パネルBからのピーク9の拡大図である。

【図11】パネルAおよびB:精製PEG-hGHポリペプチドのクマシープルーカラーリングSDS-PAGE分析を示す図である。

【図12】IM9細胞上のhGH二量体分子の生物活性を示す図である。

【図13】パネルA:G120R置換を有するhGH拮抗薬によるpSTAT5のリン酸化を測定するIM-9アッセイのデータを示す図である。パネルB:同じ位置(G120)に天然でないアミノ酸が組み込まれているhGHポリペプチドによるpSTAT5のリ

20

30

40

50

ン酸化を測定するIM-9アッセイのデータを示す図である。

【図14】図13、パネルBに示すhGH拮抗薬の二量体も、IM-9アッセイにおいて生物活性を欠くことを示す図である。

【図15】ラットにおけるPEG化されている天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの血清半減期と、PEG化されていないhGHポリペプチドの血清半減期との比較を示す図である。

【図16】PEG化されている天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドのラットにおける血清半減期の比較を示す図である。

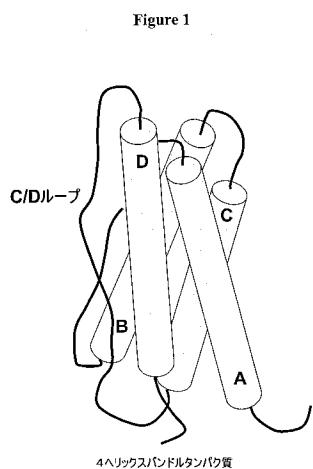
【図17】PEG化されている天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドのラットにおける血清半減期の比較を示す図である。ラットに2.1mg/kgを1回投薬した。

【図18-1】パネルA：PEG化されている（位置35、92）天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの1回量を投薬した後のラットの体重増加に対する影響を示す図である。パネルB：PEG化されている（位置35、92）天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの1回量を投薬した後の循環血漿中IGF-1レベルに対する影響を示す図である。

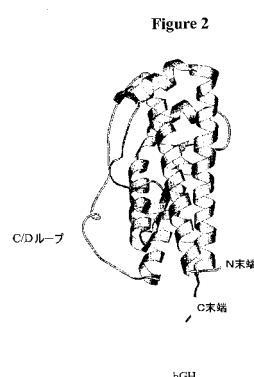
【図18-2】パネルC：PEG化されている（位置92、134、145、131、143）天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの1回量を投薬した後のラットの体重増加に対する影響を示す図である。パネルD：PEG化されている（位置92、134、145、131、143）天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドの1回量を投薬した後の循環血漿中IGF-1レベルに対する影響を示す図である。

【図18-3】パネルE：PEG化されている（位置92、134、145、131、143）天然にはコードされないアミノ酸を含むhGHポリペプチドのラットにおける血清半減期の比較を示す図である。

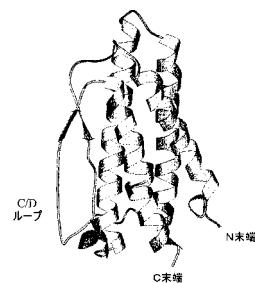
【図1】



【図2】

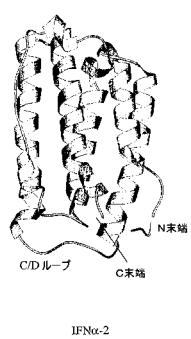


【図3】



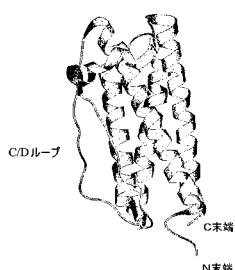
【図4】

Figure 4



【図5】

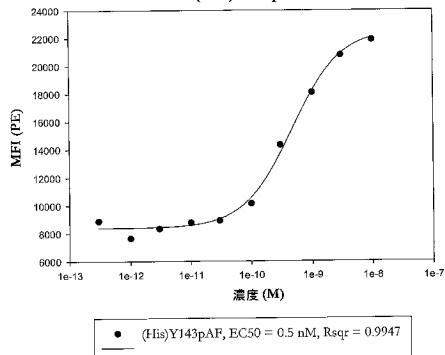
Figure 5



【図7-2】

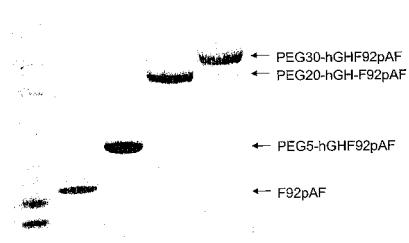
Figure 7, パネルB:

(His)Y143pAF



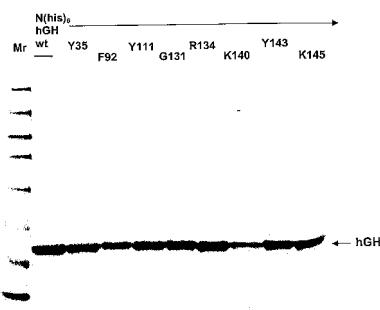
【図8】

Figure 8



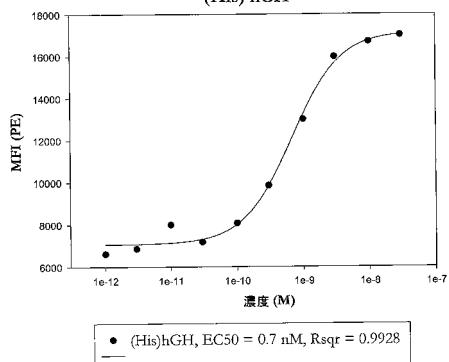
【図6】

Figure 6



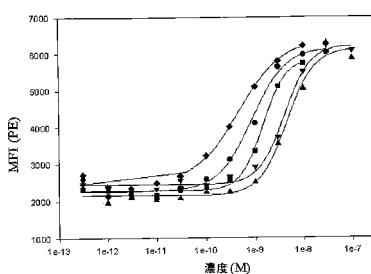
【図7-1】

(His) hGH



【図9】

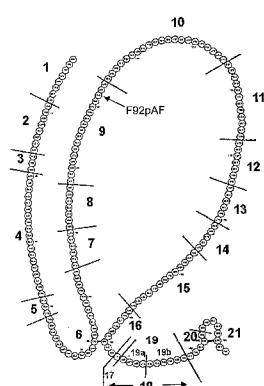
Figure 9



- (His)F92pAF, EC50 = 0.9 nM
- (His)F92pAF-5K, EC50 = 1.5 nM
- ▲ (His)F92pAF-20K, EC50 = 4.6 nM
- ▼ (His)F92-pAF-30K, EC50 = 4.1 nM
- ◆ (His)hGH, EC50 = 0.5 nM

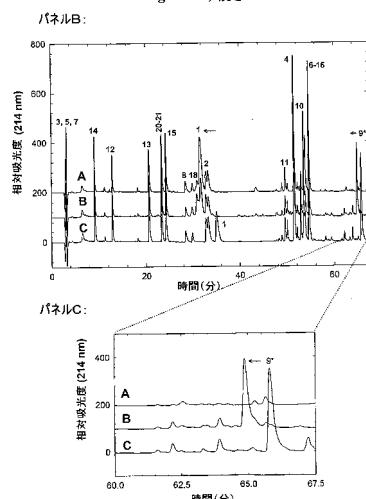
## 【図 10 - 1】

Figure 10, パネルA:



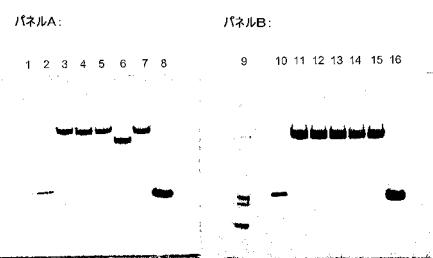
## 【図 10 - 2】

Figure 10, 続き

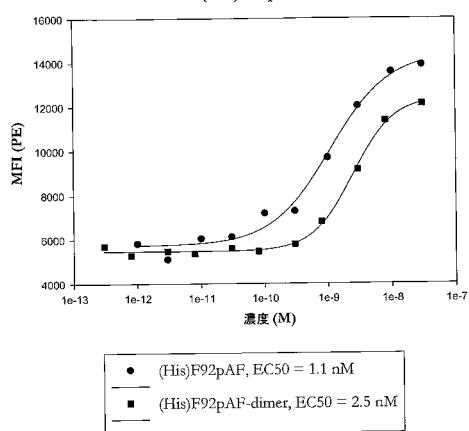


## 【図 11】

Figure 11

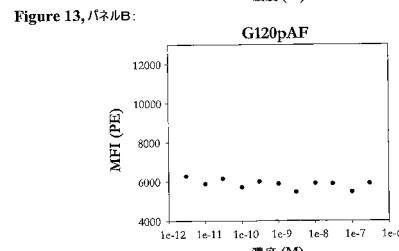
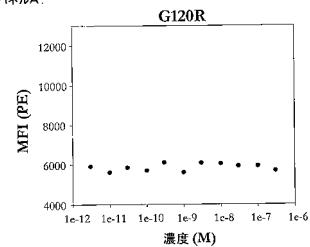


## 【図 12】

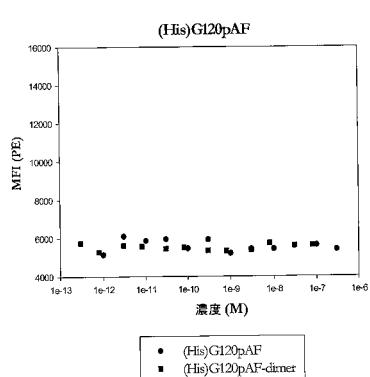
Figure 12  
(His)F92pAF

## 【図 13】

Figure 13, パネルA:



【 図 1 4 】



**Figure 14**

【 図 15 】

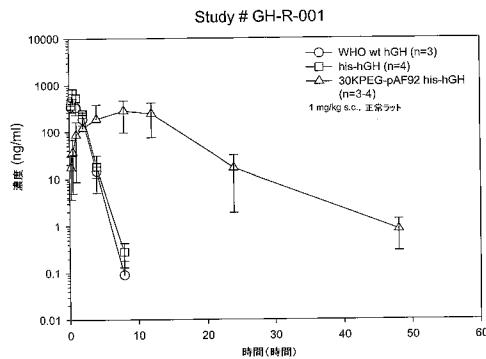
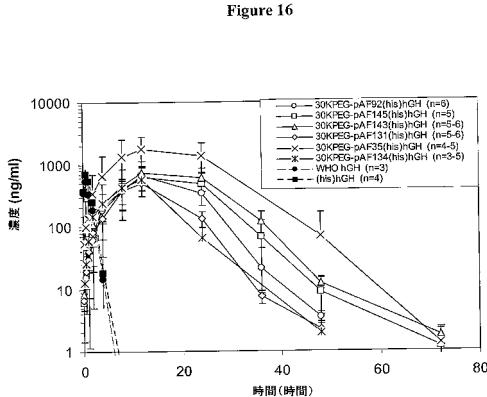


Figure 15

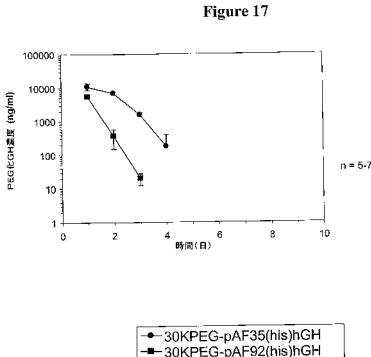
Study # GH-R-001

【図16】



**Figure 16**

【図17】



**Figure 17**

【図 18 - 1】

Figure 18, パネルA

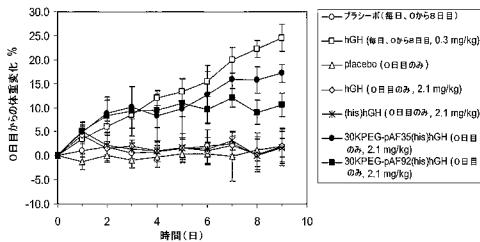


Figure 18, パネルB

【図 18 - 2】

Figure 18, パネルC

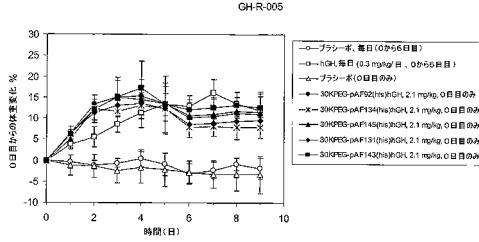
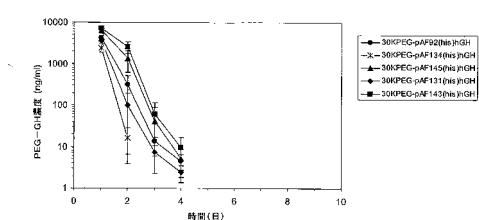


Figure 18, パネルD

### 【図 18 - 3】

Figure 18. パネルE



【配列表】

0004889505000001.xml

---

フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 60/581,175  
 (32) 優先日 平成16年6月18日(2004.6.18)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)
- (31) 優先権主張番号 60/580,885  
 (32) 優先日 平成16年6月18日(2004.6.18)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)
- (31) 優先権主張番号 60/638,616  
 (32) 優先日 平成16年12月22日(2004.12.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)
- (74) 代理人 100103920  
 弁理士 大崎 勝真
- (74) 代理人 100124855  
 弁理士 坪倉 道明
- (72) 発明者 チヨー, ホー・スン  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92122、サン・ディエゴ、フィオーレ・テラス・5225  
 、アパートメント・ナンバー・107
- (72) 発明者 ダニエル, トマス  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホヤ、ラ・ホヤ・メサ・ドライブ・5951
- (72) 発明者 デイマルチ, リチャード  
 アメリカ合衆国、インディアナ・46033、カーメル、ウイルミントン・ドライブ・10890
- (72) 発明者 ヘイズ, アンナ - マリア  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホヤ、ビア・アリカンテ・3187・ナンバ  
 -・251
- (72) 発明者 ウイルソン, トロイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・91108、サン・マリノ、オールド・ミル・ロード・575
- (72) 発明者 シム, ピー - チエン  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92122、サン・ディエゴ、シヤルマン・ドライブ・756  
 4・ナンバー・1827
- (72) 発明者 リツツインガー, ディビッド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92064、ポーウエイ、アルボリートス・ドライブ・139  
 76

審査官 神谷 昌男

- (56) 参考文献 国際公開第2002/085923 (WO, A1)  
 特表2001-510033 (JP, A)  
 米国特許第05849535 (US, A)  
 特開2002-209593 (JP, A)  
 J. Biol. Chem., 1994年, 269(22), 15892-7  
 J. Biotechnol., 1998年, 65, 183-90  
 Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004年, 14, 5743-5  
 J. Am. Chem. Soc., 2003年, 125, 11782-3

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90  
 C12N 9/00-9/99  
 CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed