(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월28일
(11) 등록번호 10-2670432
(24) 등록일자 2024년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/64 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/64 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7025964
(22) 출원일자(국제) 2018년02월08일
심사청구일자 2021년02월08일
(85) 번역문제출일자 2019년09월04일
(65) 공개번호 10-2019-0115049
(43) 공개일자 2019년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/017436
(87) 국제공개번호 WO 2018/148419
국제공개일자 2018년08월16일
(30) 우선권주장
62/456,161 2017년02월08일 미국(US)
62/627,411 2018년02월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130136450 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
브리스톨-마이어스 스퀴 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
두보우치크, 진, 엠.
미국 06492 코네티컷주 월링포드 리서치 파크웨이 5
구드문드손, 올라푸르, 에스.
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

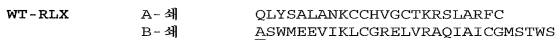
전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **약동학적 인핸서를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 일반적으로, 약동학적 인핸서에 연결된 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드, 예컨대 변형된 인간 렐락신 2 폴리펩티드, 및 예컨대 심혈관 상태 (예컨대 심부전) 및/또는 섬유증과 관련된 상태의 치료를 위한 이러한 폴리펩티드의 치료 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 13/12 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
(72) 발명자
한, 샤오준
미국 06492 코네티컷주 윌링포드 리서치 파크웨이 5
로렌스, 알., 마이클
미국 08540 뉴저지주 호프웰 카터 로드 350
리포브세크, 다사
미국 02453 매사추세츠주 월섬 비버 스트리트 100
마드센, 코트, 에스.
미국 08543 뉴저지주 페닝턴 페닝턴-록키 힐 로드 311
마펠리, 클라우디오
미국 19047 펜실베이니아주 랭혼 브릭스 로드 465
모린, 폴, 이.
미국 08543 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
마이어스, 마이클, 씨.
미국 08540 뉴저지주 호프웰 카터 로드 350

명 세 서

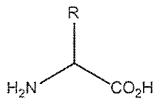
청구범위

청구항 1

비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드이며, 여기서:

(a) 변형된 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하며, 이는 A 쇄 잔기 1에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고, 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 상기 렐락신 A 쇄 및/또는 상기 렐락신 B 쇄에서 0, 1 또는 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 갖고;

(b) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 하기 구조를 가지며:



여기서 R 기는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린에서 발견되는 측쇄 이외의 다른 임의의 치환기이고;

(c) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 2 내지 30개 아미노산을 갖는 펩티드 성분 및 반감기 연장 모이어티를 포함하는 약동학적 인핸서에 연결되어 있고;

(d) 상기 펩티드 성분은 Glu^{Y}, GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139), DRDDRD (서열식별번호: 102), KKKKKK-Glu^{Y} (서열식별번호: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^{Y} (서열식별번호: 104), GGGEEE-Glu^{Y} (서열식별번호: 105), EEEGGG-Glu^{Y} (서열식별번호: 106), KKKGGG-Glu^{Y} (서열식별번호: 107), GGGKKK-Glu^{Y} (서열식별번호: 109), GSHHHHHHGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^{Y} (서열식별번호: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^{Y} (서열식별번호: 113), 또는 KSGGSGG-Glu^{Y} (서열식별번호: 117)이고,

상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 생물학적 활성인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 상기 펩티드 성분이 2 내지 25개의 아미노산으로 이루어지거나;

(b) 상기 펩티드 성분이 2 내지 20개의 아미노산으로 이루어지거나;

(c) 상기 펩티드 성분이 3 내지 10개의 아미노산으로 이루어지거나; 또는

(d) 상기 펩티드 성분이 4 내지 8개의 아미노산으로 이루어지는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩티드 성분이 GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)인 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서,

(a) 상기 반감기 연장 모이어티가 지방산을 포함하고, 여기서 지방산은 펩티드 성분에 공유 연결되어 있거나;

(b) 상기 반감기 연장 모이어티가 포화 지방산을 포함하거나;

(c) 상기 반감기 연장 모이어티가 카르복실산으로 종결된 지방산을 포함하거나;

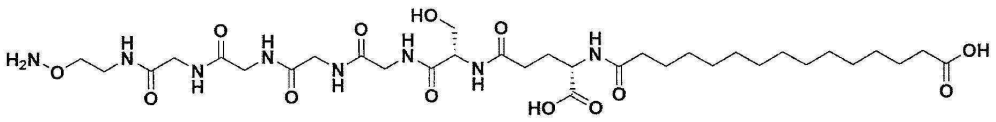
(d) 상기 반감기 연장 모이어티가 화학식 I의 지방산을 포함하고:

-Cn-COOH (화학식 I)

여기서 n은 10 내지 18이고, 여기서 임의로 (i) n은 12 내지 17이거나; 또는 (ii) n은 13, 14 또는 15이거나;

(e) 상기 반감기 연장 모이어티가 -C14-COOH를 포함하거나;

(f) 상기 약동학적 인핸서가



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

(화학식 II)

를 포함하며, 여기서 화학식 II에 나타낸 아미노옥시 기는 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드 내의 비-자연 코딩 아미노산에 연결되어 있거나;

(g) 상기 반감기 연장 모이어티가 아미드 결합을 통해 상기 펩티드 성분에 접합되어 있는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서,

(a) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함하거나;

(b) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 파라-치환된, 오르토-치환된, 또는 메타-치환된 페닐알라닌으로부터 선택되거나;

(c) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함하는 파라-치환된, 오르토-치환된, 또는 메타-치환된 페닐알라닌으로부터 선택되거나; 또는

(d) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서,

(a) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 상기 펩티드 성분에 연결되어 있거나; 또는

(b) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 옥심 연결 또는 트리아졸 연결을 통해 상기 약동학적 인핸서에 연결된 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서,

(a) 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드가 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환된 서열식별번호: 4를 포함하고, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드가 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하며, 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함하고, 여기서 상기 렐락신

B 쇄 폴리펩티드가 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하거나; 또는

(b) 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드가 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환된 서열식별번호: 4를 포함하고, 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함하는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 8

제1항에 있어서,

(a) 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드가 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환된 서열식별번호: 4를 포함하고, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드가 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하며, 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함하고 여기서 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드가 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하거나;

(b) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 옥심 연결을 통해 상기 약동학적 인핸서에 연결되어 있고, 변형된 렐락신 폴리펩티드가 서열식별번호: 35에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하거나; 또는

(c) 상기 비-자연 코딩 아미노산이 옥심 연결을 통해 상기 약동학적 인핸서에 연결되어 있고, 변형된 렐락신 폴리펩티드가 서열식별번호: 35를 포함하는 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함하는 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 9

제1항에 있어서, 렐락신 폴리펩티드가 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하며, 이는 A 쇄 잔기 1에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고, 여기서 상기 비-자연 코딩 아미노산은 펩티드 성분 GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)를 포함하는 상기 약동학적 인핸서에 연결되는 것인 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 10

제1항에 있어서, 렐락신 폴리펩티드가 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드이며, 이는 A 쇄 잔기 1에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고;

여기서 상기 비-자연 코딩 아미노산은

GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)의 펩티드 성분; 및

-C14-COOH를 포함하는 반감기 연장 모이어티

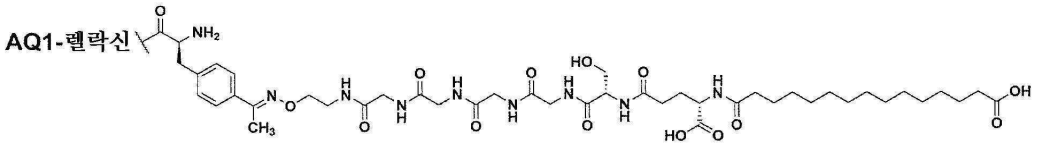
를 포함하는 상기 약동학적 인핸서에 연결된 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하는 것인 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 렐락신 B 쇄가 서열식별번호: 6의 폴리펩티드를 포함하는 것인 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 12

제1항에 있어서, 하기를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드이며:



(화학식 III)

여기서 상기 AQ1-렐락신은 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하고 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 0개 또는 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하며,

여기서 화학식 III에 도시된 변형된 파라-아세틸-L-페닐알라닌은 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 것인 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 13

제12항에 있어서,

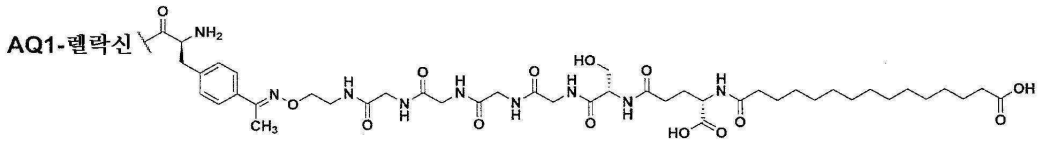
(a) AQ1-렐락신이 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하거나; 또는

(b) AQ1-렐락신이 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 14

제1항에 있어서, 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하며, 아래 화학식 III:



(화학식 III)

에 도시된 바와 같이 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 변형된 파라-아세틸-L-페닐알라닌이 약동학적 인핸서 GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH에 연결된 것인, 변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 15

제1항에 있어서,

(a) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 AQ1-20kDa PEG와 비교하여 신장 공포 형성을 덜 발생시키고/시키거나;

(b) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 AQ1-20kDa PEG와 비교하여 신기능 장애를 발생시키지 않거나 감소된 신기능 장애를 발생시키고, 임의로 여기서 상기 신기능은 추정되는 사구체 여과율, 크레아틴 클리어런스, 인슐린 사구체 여과율 또는 동위원소 사구체 여과율 중 1종 이상을 결정함으로써 측정되고/되거나;

(c) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 투여 후에 신장 혈류를 감소시키지 않고, 임의로 여기서 상기 신장 혈류는 파라-아미노히푸레이트 클리어런스를 결정함으로써 측정되고/되거나;

(d) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 투여 후에 신장 혈류를 증가시킬 수 있고, 임의로 여기서 상기 신장 혈류는 파라-아미노히푸레이트 클리어런스를 결정함으로써 측정되고/되거나;

(e) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 비변형된 렐락신에 비하여 증가된 생체내 반감기를 나타내고/내거나;

(f) 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드가 비변형된 렐락신에 비하여 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 또는 적어도 50-배 증가된 생체내 반감기를 나타내는 것인

변형된 렐락신 폴리펩티드.

청구항 16

질환 또는 질환과 연관된 질환 증상의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 상기 질환은

(a) 심혈관 질환;

(b) 관상 동맥 질환, 심장 발작, 부정맥, 심부전, 심근병증, 및 혈관 질환;

(c) 심부전의 증상;

(d) 심신성 증후군, 신장 기능 장애 동반 심부전, 만성 심부전, 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 급성 심부전, 급성기-후 심부전, 보상성 심부전, 대상부전성 심부전, 우심부전, 좌심부전, 전심부전, 허혈성 심근병증, 확장성 심근병증, 선천성 심장 결손과 연관된 심부전, 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 복합 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 당뇨병성 심부전, 알콜성 심근병증, 심장 축적 장애와 연관된 심부전, 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심근경색 후 재형성, 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 협심증, 고혈압, 폐고혈압, 및 폐동맥 고혈압;

(e) 만성 심부전, 급성 심부전, 급성기-후 심부전, 만성 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 만성 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심근경색 후 재형성, 협심증, 고혈압, 폐고혈압 및 폐동맥 고혈압; 또는

(f) 급성기-후 심부전, 진행성 심부전, 심신성 증후군, 및 신장 기능 장애 동반 심부전

으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, ACE 억제제, β-차단제, 이뇨제, 미네랄로코르티코이드 수용체 길항제, 리아노딘 수용체 조정제, SERCA2a 활성화제, 레닌 억제제, 칼슘 채널 차단제, 아데노신 A1 수용체 효능제, 부분 아데노신 A1 수용체, 도파민 β-히드록실라제 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 세포 신호전달 경로 선택에 대해 편향된 효능작용을 갖는 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 II 수용체 길항제 및 네프릴리신 효소 억제제의 조합물, 네프릴리신 효소 억제제, 가용성 구아닐레이트 시클라제 활성화제, 미오신 ATPase 활성화제, rho-키나제 1 억제제, rho-키나제 2 억제제, 아펠린 수용체 효능제, 니트록실 공여 화합물, 칼슘-의존성 키나제 II 억제제, 항섬유화제, 갈렉틴-3 억제제, 바소프레신 수용체 길항제, FPR2 수용체 조정제, 나트륨이뇨 펩티드 수용체 효능제, 일시적 수용체 전위 바닐로이드-4 채널 차단제, 항부정맥제, I_f "퍼니 전류" 채널 차단제, 니트레이트, 디기탈리스 화합물, 수축촉진제, β-수용체 효능제, 세포 막 재밀봉제, 항고지혈증제, 혈장 HDL-상승제, 항고콜레스테롤혈증제, 콜레스테롤 생합성 억제제, LXR 효능제, FXR 효능제, 프로부콜, 랄록시펜, 니코틴산, 니아신아미드, 콜레스테롤 흡수 억제제, 담즙산 격리제, 음이온 교환 수지, 4급 아민, 콜레스티라민, 콜레스티폴, 저밀도 지단백질 수용체 유도제, 클로피브레이트, 페노피브레이트, 베자피브레이트, 시프로피브레이트, 겜피브로질, 비타민 B6, 비타민 B12, 항산화제 비타민, 항당뇨병제, 혈소판 응집 억제제, 피브리노겐 수용체 길항제, 아스피린 및 피브린산 유도체, PCSK9 억제제, 아스피린, 및 P2Y12 억제제로부터 선택된 적어도 1종의 추가의 치료제와 조합하여 사용하기 위한

제약 조성물.

청구항 18

섬유증과 연관된 질환의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

(a) 섬유증과 연관된 상기 질환이 심장, 폐, 신장, 골수 또는 간의 섬유증, 피부과적 섬유증, 또는 섬유화 안장애를 포함하거나;

(b) 섬유증과 연관된 상기 질환이 비알콜성 지방간염 (NASH), 간경변증, 간경변증-전증, 미만성 실질 폐 질환, 낭성 섬유증, 폐 섬유증, 진행성 거대 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 주사 섬유증, 신섬유증, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 초점성 분절성 사구체경화증, 막성 신병증, IgA 신병증, 골수섬유증, 심부전, 심장 섬유증, 백내장 섬유증, 안구 반흔형성, 췌장 섬유증, 피부 섬유증, 장 섬유증, 심내막심근 섬유증, 심방 섬유증, 종격 섬유증, 복막후 섬유증, 켈로이드, 신원성 전신 섬유증, 경피증, 전신 경화증, 관절섬유증, 페이로니 증후군, 듀피트렌 구축, 당뇨병성 신경병증, 유착성 피막염, 알콜성 간 질환, 지방간질환, 바이러스성 간염, 담관계 질환, 원발성 혈색소증, 윌슨병, 알파 1-항트립신 결핍, 간질성 폐 질환 (ILD), 인간 섬유화 폐 질환, 황반 변성, 망막 망막병증, 유리체 망막병증, 심근 섬유증, 그레이브스 안병증, 약물 유발 맥각중독, 심혈관 질환, 아테롬성동맥경화증/재협착, 비대성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 염증성 장 질환, 및 콜라겐성 결장염으로부터 선택되는 것인

제약 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 항섬유증제, 피르페니돈, LPA1 길항제, LPA1 수용체 길항제, GLP1 유사체, 트랄로키누맙 (IL-13, 아스트라제네카), 비스모데깁 (헷지호그 길항제, 로슈), PRM-151 (펜트락신-2, TGF 베타-1, 프로메디올), SAR-156597 (이중특이적 Mab IL-4&IL-13, 사노피), 심투주맙 ((항-리실 옥시다제-유사 2 (항-LOXL2) 항체, 길리아드), CKD-942, PTL-202 (PDE inh./펜톡시필린/NAC 경구 제어. 방출, 퍼시픽 테르.), 오미팔리십 (경구 PI3K/mTOR 억제제, GSK), IW-001 (경구 sol. 소 제V형 콜라겐 mod., 이뮨웍스), STX-100 (인테그린 알파 V/ 베타-6 ant, 스트로메딕스/ 바이오젠), 액티뮨 (IFN 감마), PC-SOD (미디스마제; 흡입, LTT 바이오-파마 / CKD 팜), 레브리키주맙 (항-IL-13 SC 인간화 mAb, 로슈), AQX-1125 (SHIP1 활성화제, 아퀴녹스), CC-539 (JNK 억제제, 셀진), FG-3019 (피브로젠), SAR-100842 (사노피), 및 오베티콜산 (OCA 또는 INT-747, 인터셉트)으로부터 선택된 적어도 1종의 추가의 치료제와 조합하여 사용하기 위한

제약 조성물.

청구항 21

신부전의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 또는 신기능의 개선, 안정화 또는 회복을 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제조하는 방법이며,

(a) 상기 렐락신 A 쇄 및 상기 렐락신 B 쇄를 포함하는 폴리펩티드를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 폴리펩티드는 상기 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 것인 단계; 및

(b) 상기 비-자연 코딩 아미노산을 상기 약동학적 인핸서에 연결시키는 단계

를 포함하고, 여기서:

(i) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기 및 아미노옥시 기의 반응에 의해 형성된 옥심 연결에 의해 상기 약동학적 인핸서에 연결되어 있고, 여기서 상기 카르보닐 기는 상기 비-자연 코딩 아미노산의 치환기이고 상기 아미노옥시 기는 상기 약동학적 인핸서의 구성성분이거나, 또는 상기 아미노옥시 기는 상기 비-자연 코딩 아미노산의 치환기이고 상기 카르보닐 기는 상기 약동학적 인핸서의 구성성분이고/이거나;

(ii) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 상기 폴리펩티드 내에 리보솜에 의해 혼입된 것인

방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 항섬유증제, 피르페니돈, LPA1 길항제, LPA1 수용체 길항제, GLP1 유사체, 트랄로키누맙 (IL-

13, 아스트라제네카), 비스모데깁 (헷지호그 길항제, 로슈), PRM-151 (펜트락신-2, TGF 베타-1, 프로메디올), SAR-156597 (이중특이적 Mab IL-4&IL-13, 사노피), 심투주맙 ((항-리실 옥시다제-유사 2 (항-LOXL2) 항체, 길리아드), CKD-942, PTL-202 (PDE inh./펜톡시필린/NAC 경구 제어. 방출, 퍼시픽 테르.), 오미팔리십 (경구 PI3K/mTOR 억제제, GSK), IW-001 (경구 sol. 소 제V형 콜라겐 mod., 이뮨웍스), STX-100 (인테그린 알파 V/ 베타-6 ant, 스트로메딕스/ 바이오젠), 액티뮨 (IFN 감마), PC-SOD (미디스마제; 흡입, LTT 바이오-파마 / CKD 팜), 레브리키주맙 (항-IL-13 SC 인간화 mAb, 로슈), AQX-1125 (SHIP1 활성화제, 아퀴녹스), CC-539 (JNK 억제제, 셀진), FG-3019 (피브로젠), SAR-100842 (사노피), 및 오베티콜산 (OCA 또는 INT-747, 인터셉트)으로부터 선택된 적어도 1종의 추가의 치료제와 조합하여 사용하기 위한

제약 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 개시내용

[0002] 본 출원은 2018년 2월 7일에 출원된 미국 가출원 62/627,411 및 2017년 2월 8일에 출원된 미국 가출원 62/456,161의 이익을 주장하며, 상기 열거된 것의 모든 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 개시내용

[0004] 본 출원은 2018년 2월 8일에 생성된 150,746 바이트 크기를 갖는 "46561o2413.txt" 명칭의 파일에 담긴 생물학적 서열 목록을 그의 개시내용의 일부로서 포함하고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0005] 본 개시내용은 일반적으로, 약동학적 인핸서를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드, 예컨대 변형된 인간 렐락신 2 폴리펩티드, 및 예컨대 심혈관 상태 (예컨대 심부전) 및/또는 섬유증과 관련된 상태의 치료를 위한 이러한 폴리펩티드의 치료 용도에 관한 것이다. 예시적인 실시양태에서, 약동학적 인핸서는 비-자연 코딩 아미노산에 연결되고, 이는 렐락신 폴리펩티드 내에 리보솜에 의해 혼입될 수 있다.

[0006] 심부전 (HF)은 오늘날 건강 관리 시스템에 대한 엄청난 부담을 차지하고, 추정 미국 유병률은 5.8백만명이며 전세계적으로 23백만명을 초과한다 (Roger et al., 2012. Circulation, 125(1): e2-e220). HF의 증상은 부적절한 심장 박출량의 결과이고, 질환의 진행 병기에 따라 약화될 수 있다. HF의 주요 증상 및 징후는 다음을 포함한다: 1) 좌심실로부터의 비효과적인 전방 유동으로 인한 폐 부종 및 폐 모세혈관층에서의 증가된 압력에 의해 발생하는 호흡곤란 (호흡의 어려움); 2) 우심실이 대정맥 환류를 수용할 수 없는 경우에 발생하는 하지 부종; 및 3) 신체의 대사적 필요를 충족시키는데 충분한 심장 박출량을 지속시키는 것을 실패한 심장의 불능으로 인한 피로 (Kemp & Conte, 2012. Cardiovascular Pathology, 21:365-371).

[0007] 많은 기여 질환, 위험 인자, 및 병리학적 변화가 궁극적으로 심부전으로 이어질 수 있다 (Jessup & Brozena, 2003. N Engl J Med, 348(20): 2007-2018). HF의 병리생리상태에 수반되는 것으로 생각되는 유해 사건은 심근

경색과 같은 매우 급성 사건으로부터 평생 고혈압과 같은 보다 만성 손상 사건까지 다양하다. 사망률은 진단 5년 내에 HF를 갖는 인간의 ~50%가 사망하는 것으로 높게 유지된다 (Roger et al., 2012. Circulation, 125(1): e2-e220; Roger et al., 2004. Jama, 292(3): 344-50). 심부전은 명백하게 유의한 미충족 의료 필요를 나타낸다.

[0008] 인간 렐락신 2 호르몬 (또한 H2 렐락신으로도 불림)은 분만 전 생식관의 재형성을 담당하고, 이에 따라 출산 과정을 용이하게 하는 것으로 공지된 53개의 아미노산으로 구성된 6-kDa 펩티드이다. 우세하게는 임신 호르몬이지만, 렐락신은 또한 비-임신 여성 뿐만 아니라 남성에서도 검출되었다. 인간 렐락신은 인슐린, 다수의 인슐린 유사 펩티드 (INSL3-6), 및 인슐린-유사 성장 인자 (IGFI 및 IGFII)를 포함하는 인슐린 펩티드 패밀리의 구성원이다 (Van Der Westhuizen et al., 2007. Curr Drug Targets, 8(1): 91-104). 이들 이종이량체 펩티드는 각각이 2개의 디술피드 결합에 의해 연결된 2개의 펩티드 쇄 (A & B)로 구성된 것, 및 단일 분자내 디술피드 결합을 함유하는 A-쇄와 모두 구조적으로 관련된다.

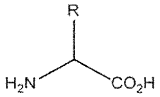
[0009] 렐락신 패밀리 펩티드 수용체 1 (RXFP1)로 불리는 렐락신 2 (H2)에 대한 수용체는 마우스와 인간 사이에 85% 아미노산 동일성으로 보존되고, 이는 인간 및 다른 종에서 본질적으로 편재적으로 발현된다 (Halls et al., 2007. Br J Pharmacol, 150(6): 677-91).

[0010] 인간 임신 동안, 태아가 필요로 하는 영양 요구량을 충족시키기 위해, 여성 신체는 전신 혈관 저항 (SVR)에서 유의한 ~30% 감소 및 수반되는 심장 박출량의 ~50% 증가를 겪는다 (Jeyabalan, 2010: Renal and Electrolyte Disorders. Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Clapp and Capeless, 1997. Am J Cardiol, 80(11): 1469-73). 추가의 혈관 적응은 효율적인 심실-동맥 커플링을 유지하는데 중요한 전체적인 동맥 탄성의 ~30% 증가, 뿐만 아니라 대사 노폐물 제거에 중요한, 신장 혈류 (RBF) 및 사구체 여과율 (GFR) 둘 다의 ~50% 증가를 포함한다 (Jeyabalan, 2010: Renal and Electrolyte Disorders. Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Poppas et al., 1997. Circulation, 95(10): p. 2407-15). 설치류에서의 전임상 연구 뿐만 아니라 다양한 환자 설정에서 수행된 임상 연구 둘 다는 렐락신이 이러한 적응 생리학적 변화를 매개하는데 있어서, 적어도 어느 정도까지 수반된다는 증거를 제공한다 (Conrad, 2011. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 301(2), R267-275; Teichman et al., 2009. Heart Fail Rev, 14(4), 321-329.). 많은 이들 적응 반응은, 과도한 섬유증, 불량한 동맥 탄성, 및 불량한 신기능이 모두 심부전 환자에서 공통적인 특징이라는 점에서 HF 환자에게 유익할 수 있을 것이다 (Mohammed et al., 2015. Circulation, 131(6), 550-559), (Wohlfahrt et al., 2015. Eur J Heart Fail, 17(1), 27-34; Dammon et al., 2011. Prog Cardiovasc Dis, 54(2), 144-153). HF를 갖는 환자의 추정 30%가 중등도 내지 중증 신장애를 앓기 때문에 (Triposkiadis and Skoularigis, 2012. Curr Heart Fail Rep, (4):354-62), 렐락신과 같은 작용제는 혈류 유동 및 전해질 취급 둘 다를 개선시킴으로써, HF 환자에게 특히 유익할 수 있다.

[0011] 렐락신 펩티드는 짧은 약동학적 반감기를 갖고: HF의 치료를 위해 개발된 재조합 인간 렐락신 펩티드인 세렐락신은 5-15분의 짧은 제1-기 약동학적 반감기를 갖고, 치료 유용성을 위해 48시간 연속 정맥내 주입을 필요로 한다 (REASANZ (serelaxin) Briefing Document Prepared by Novartis for FDA Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting. February 26, 2014). 심부전과 같은 만성 질환의 경우, 개선된 약동학적 프로파일을 갖는 렐락신 분자는 연속 정맥내 주입을 뛰어넘는, 만성 질환을 앓고 있는 환자를 위한 치료로서 보다 적용가능할 수 있는 약물 투여의 대안적 경로에 대한 기회를 제공한다.

발명의 내용

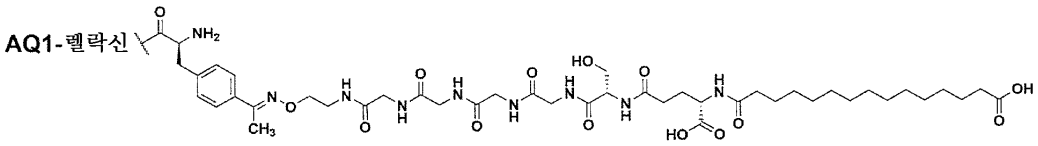
[0012] 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기서 (a) 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호(SEQ ID NO): 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하고, 이는 A 쇄 잔기 1, A 쇄 잔기 2, A 쇄 잔기 5, A 쇄 잔기 13, A 쇄 잔기 18, B 쇄 잔기 5, B 쇄 잔기 7, 및 B 쇄 잔기 25로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고, 임의로 상기 렐락신 A 쇄 및/또는 상기 렐락신 B 쇄에서 최대 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 갖고; (b) 상기 비-자연 코딩 아미노산은

[0013] 구조:  를 갖고,

[0014] 여기서 R 기는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신,

히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린에서 발견되는 측쇄 이외의 다른 임의의 치환기이고; (c) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 2 내지 30개 아미노산의 펩티드 성분 및 반감기 연장 모이어티를 포함하는 약동학적 인핸서에 연결된다.

[0015] 또한, 하기 구조를 갖는 AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)-C14-COOH를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 본원에 제공되며:



[0016] (화학식 III)

[0017] 여기서 상기 AQ1-렐락신은 서열식별번호: 35에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 화학식 III에 도시된 변형된 파라-아세틸-페닐알라닌은 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치한다.

[0018] 또한, 본원에 기재된 화학식 III의 구조를 갖는, AQ1-렐락신-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)-C14-COOH를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기서 AQ1-렐락신은 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 화학식 III에 도시된 변형된 파라-아세틸-페닐알라닌은 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치한다.

[0019] 또한, 도 8에 제시된 구조를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0020] 또한, 도 9에 제시된 구조를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.

[0022] 또 다른 측면에서, 렐락신-연관 장애의 치료를 위한 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드의 유효량 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.

[0023] 또 다른 측면에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 렐락신과 연관된 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 심혈관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 심혈관 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0025] 또 다른 측면에서, 심부전의 증상의 치료 또는 완화를 필요로 하는 환자에게 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 심부전의 증상을 치료 또는 완화하는 방법이 본원에 제공된다.

[0026] 또 다른 측면에서, 섬유증과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0027] 또 다른 측면에서, 신부전의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 신부전을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[0028] 또 다른 측면에서, 신기능의 개선, 안정화 또는 회복을 필요로 하는 환자에게 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 신기능을 개선, 안정화 또는 회복시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0029] 또 다른 측면에서, (a) 상기 렐락신 A 쇄 및 상기 렐락신 B 쇄를 포함하는 폴리펩티드를 제공하는 단계이며, 여

기서 상기 폴리펩티드는 상기 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 비-자연 코딩 아미노산을 상기 약동학적 인핸서에 연결시키는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제조하는 방법이 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1. 비-자연 코딩 아미노산의 부재 하의 인간 렐락신 2 폴리펩티드의 서열. A 쇄 (서열식별번호: 4) 및 B 쇄 (서열식별번호: 6) 폴리펩티드는 도 5에 도시된 바와 같이 디술피드 결합에 의해 연결된다. B 쇄 내의 위치 1은 인간 렐락신 2 폴리펩티드 B 쇄 (서열식별번호: 5)에 비해 변형되고 (밑줄표시된 위치, 제시된 바와 같이 아스파르트산이 알라닌으로 치환됨), 이는 효력에 유의하게 불리한 영향을 미치지 않으면서 제조를 개선시키는 것으로 관찰되었다. 본원의 작업 실시예에서, 이러한 폴리펩티드는 "야생형" 또는 WT-RLX로 지칭된다.

도 2. A 쇄 위치 1에서 치환된 비-자연 코딩 아미노산, 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF, 밑줄표시됨)을 갖는 인간 렐락신 2 폴리펩티드인 RLX-AQ1 ("AQ1")의 서열. A 쇄 (서열식별번호: 35) 및 B 쇄 (서열식별번호: 6)는 도 5에 도시된 위치에서 디술피드 결합에 의해 연결된다.

도 3. B 쇄 위치 25에서 치환된 비-자연 코딩 아미노산, 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF, 밑줄표시됨)을 갖고, 추가로 A 쇄 위치 1이 글루타민의 아스파라긴으로의 치환을 함유하는 (밑줄표시됨) 인간 렐락신 2 폴리펩티드인 RLX-BM25/AN1 ("BM25/AN1")의 서열. A 쇄 (서열식별번호: 36) 및 B 쇄 (서열식별번호: 37)는 도 5에 도시된 위치에서 디술피드 결합에 의해 연결된다.

도 4. RLX-AQ1의 발현을 위한 프리프로-렐락신 폴리펩티드의 개략도. 프리프로-렐락신 폴리펩티드 (서열식별번호: 38)는 이. 콜라이(E. coli) 또는 또 다른 발현 시스템에서 발현된다. 비-자연 코딩 아미노산 예컨대 pAcF는 프리프로-렐락신 폴리펩티드 서열 내로 리보솜에 의해 혼입되어 약동학적 인핸서 ("PK 연장제")에의 후속 연결을 용이하게 할 수 있다. 이. 콜라이 발현에 특이적인 리더 서열은 회색 원으로 표시된다. 부가된 펩티드 절단 부위 및 Lys에서 Gly로의 치환을 갖는 프로인슐린으로부터 유래된 C-펩티드 (연결 펩티드)는 흑색 원으로 표시된다. 리더 서열 및 C-펩티드는 효소적 절단에 의해 제거된다 (절단 부위는 비라벨링된 화살표에 의해 표시됨). B 쇄 잔기 1 ("B1")에서의 알라닌 치환 (서열식별번호: 6에 존재함)은 리더 서열 제거를 돕는다. 부위 특이적 PK 인핸서 부착을 위한 pAcF 잔기가 표시된다. A 및 B 쇄는 HUGO로 명명된 RLN2와 정렬되고, 이는 렐락신2 전사체 변이체 1 cDNA로부터 유래된다 (refseq NM_134441).

도 5. A 쇄 위치 1에서 비-자연 코딩 아미노산을 통해 약동학적 인핸서 ("PK 연장제")에 연결된, A 쇄 (서열식별번호: 36) 및 B 쇄 (서열식별번호: 6)를 포함하는 성숙 RLX-AQ1의 구조도.

도 6A-6B. mRNA 농도를 측정하기 위해 qRT-PCR을 사용한, TGF-베타 처리된 인간 심장 섬유모세포에서의 평활근 알파-액틴 유전자 발현의 변화에 대한 WT-RLX (도 6A) 및 AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH (도 6B) 효과. 막대 위의 숫자는 기준선으로 설정된 단지 비히클만에 의한 경우의 TGF-베타 대비 퍼센트 감소를 나타낸다. 평균 ± SEM; *P < 0.05. Veh = 비히클. nM = 나노몰.

도 7A-7D. 암컷 스프라그 돌리 래트에서의 PEG-관련 신장 피질 세관 상피 공포형성. 래트로부터의 신장을 비히클 또는 렐락신 유사체로 1일 1회 피하로 (SQ) 처리하였다. PEG 함유 렐락신 유사체 (도 7B 및 7C)는 대형 유착 공포의 존재를 특징으로 하는 현저한 피질 세관 공포형성을 나타낸다. 공포는 비히클 (도 7A) 또는 비-PEG화 렐락신 (도 7D) 처리된 동물에서는 관찰되지 않는다. 도 7A: 비히클 (10 mM 시트레이트 완충제 pH 5.5 중 150 mM Arg) 10일 동안 SQ. 도 7B: AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH (1.5 kD PEG) 7일 동안 SQ, 40 mg/kg/일. 도 7C: AQ1-20-kDa-PEG (20 kD PEG) 10일 동안 SQ, 15 mg/kg/일. 도 7D: AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH 7일 동안 SQ, 40 mg/kg. 배율 40x, H&E.

도 8. 화학식 III에 도시된 AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH의 구조.

도 9. 화학식 III에 도시된 AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH의 구조.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 정의

[0032] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한 복수 지시대상을 포함

한다. 따라서, 예를 들어, "렐락신", "렐락신 폴리펩티드" 또는 "변형된 렐락신 폴리펩티드"에 대한 언급은 1개 이상의 이러한 단백질에 대한 언급이며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 그의 등가물 등을 포함한다.

[0033] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0034] 용어 "약동학적 연장제," "약동학적 인핸서," "PK 연장제," 및 "PK 인핸서"는 상호교환가능하게 사용되고, 각각 변형된 렐락신 폴리펩티드의 비접합된 형태 또는 야생형 렐락신 폴리펩티드와 같은 비교자와 비교하여, 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생체내 단백질분해적 분해 또는 다른 활성-저하 화학적 변형을 방지하거나, 지연시키거나 또는 완화시키고/거나, 반감기 (혈청 반감기 및/또는 치료 반감기)를 증가시키고/거나, 흡수율 증가, 독성 감소, 용해도 개선, 응집 감소, 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생물학적 활성 및/또는 표적 선택성 증가, 및/또는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 면역원성 감소를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 약동학적 또는 생물물리학적 특성을 개선시키거나 변경시키는, 임의로 비-자연 코딩 아미노산을 통해 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드에 공유 연결된 ("접합된" 또는 "융합된") 제약상 허용되는 모이어티, 도메인 또는 분자를 지칭한다. 본원에 기재된 PK 인핸서는 1개 이상의 아미노산, 및 반감기 연장 모이어티를 포함하는 펩티드 성분을 포함할 수 있다.

[0035] 용어 "반감기 연장 모이어티"는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 비접합된 형태 또는 야생형 렐락신 폴리펩티드와 같은 비교자와 비교하여, 반감기 (혈청 반감기 및/또는 치료 반감기)를 증가시키고/거나, 흡수율 증가, 독성 감소, 용해도 개선, 응집 감소, 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생물학적 활성 및/또는 표적 선택성 증가, 제조성 증가, 및/또는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 면역원성 감소를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 약동학적 또는 생물물리학적 특성을 개선시키거나 변경시키는, 임의로 비-자연 코딩 아미노산을 통해, 직접적으로 또는 링커 (예를 들어 펩티드 성분 또는 PEG)를 통해, 예를 들어 PK 연장제 성분으로서 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드에 공유 연결된 ("접합된" 또는 "융합된") 제약상 허용되는 모이어티, 도메인 또는 분자를 지칭한다. 용어 반감기 연장 모이어티는 비-단백질성, 반감기 연장 모이어티, 예컨대 지방산 또는 그의 유도체, 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 불연속형 PEG, 히드록시에틸 전분 (HES), 지질, 분지형 또는 비분지형 아실 기, 분지형 또는 비분지형 C8-C30 아실 기, 분지형 또는 비분지형 알킬 기, 및 분지형 또는 비분지형 C8-C30 알킬 기; 및 단백질성 반감기 연장 모이어티, 예컨대 혈청 알부민, 트랜스페린, 애드넥틴 (예를 들어, 알부민-결합 또는 약동학 연장 (PKE) 애드넥틴), Fc 도메인, 및 비구조화 폴리펩티드, 예컨대 XTEN 및 PAS 폴리펩티드 (예를 들어, 아미노산 Pro, Ala, 및/또는 Ser로 구성된 입체형태적으로 무질서한 폴리펩티드 서열), 및 상기 중 임의의 것의 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "링커" 또는 "스페이서"는 반감기 연장 모이어티를 변형된 렐락신 폴리펩티드에 연결시키는 임의의 성분일 수 있다. 예시적인 링커는 작은 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성 중합체 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리덱스트란, 및 예를 들어 최대 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10개 또는 최대 6개 아미노산 길이의 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0036] 용어 "펩티드 성분"은 PK 연장제의 성분을 지칭하고, 최대 50개 아미노산 길이의 펩티드를 포함한다. 예시적인 펩티드 성분은 최대 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 아미노산 길이의 펩티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 펩티드 성분은 반감기 연장 모이어티를 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드에 공유 연결시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 성분은 2-50개 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 성분은 2-30개 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 성분은 3-20개 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 성분은 5-10개 아미노산을 포함할 수 있다.

[0037] 용어 "안정성" 또는 "열적 안정성"은 가열되었을때 폴리펩티드가 언폴딩에 저항하는 능력을 지칭한다. 일반적으로, 분자의 열적 안정성이 높을 수록 폴리펩티드가 언폴딩되는데 요구되는 온도가 높다. 폴리펩티드의 열적 안정성을 결정하는 예시적인 방법은 시차 주사 열량측정법 (DSC) 및 열 주사 형광법이다. 열적 안정성은, 예를 들어 증가된 열적 안정성을 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0038] 용어 "응집"은 다른 분자 (예컨대, 동일한 폴리펩티드의 다른 분자)와 비-공유 연결된 복합체를 형성함으로써, 고분자량 복합체를 형성하는 폴리펩티드의 경향을 지칭한다. 응집체의 형성을 측정하는 예시적인 방법은 분석용 크기 배제 크로마토그래피를 포함한다. 응집의 상대량은, 예를 들어 감소된 응집을 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0039] 용어 "탈아미드화"는 탈아미드화 반응을 자발적으로 진행함으로써, 아미노산의 화학적 구조를 변화시키고, 폴리펩티드의 기능에 잠재적으로 영향을 미치는 폴리펩티드 내 아미노산 잔기의 경향을 지칭한다. 탈아미드화를 측

정하는 예시적인 방법은 영상화 모세관 등전 포커싱 (icIEF)을 포함한다. 탈아미드화 상대량은, 예를 들어 감소된 탈아미드화를 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0040] 용어 "생체내 단백질분해"는 살아있는 시스템에 도입되었을때 (예를 들어, 유기체에 주사되었을때), 상기 유기체에서 일어나는 프로테아제에 의해 발생할 수 있는 폴리펩티드의 절단을 지칭한다. 단백질분해는 폴리펩티드의 생물학적 활성 또는 반감기에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 야생형 렐락신은 절단을 진행하여, 말단절단된 불활성 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 렐락신의 생체내 단백질분해를 측정하는 예시적인 방법은 메소 스케일 디스커버리 (MSD)-기반 전기화학발광 면역흡착 검정 (ECLIA)이다. 생체내 단백질분해의 상대량은, 예를 들어 감소된 생체내 단백질분해를 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0041] 용어 "용해도"는 또 다른 물질에 용해될 수 있는 물질의 양, 예를 들어 수용액에 용해될 수 있는 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 양을 지칭한다. 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 용해도를 측정하는 예시적인 방법은 플러그 유동 용해도 시험이다. 상대 용해도는, 예를 들어 증가된 용해도를 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0042] 용어 "생물학적 활성" 또는 "생물활성"은 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포손, 프리온, 곤충, 진균, 식물, 동물 및 인간을 포함하나 이에 제한되지는 않는 유기체와 관련하여 생물계, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미치는 분자의 능력을 지칭한다. 예를 들어, 비변형된 또는 변형된 렐락신과 관련하여, 생물학적 활성은 렐락신에 의해 수행되는 기능 중 임의의 것을 포함한다. 예를 들어, "생물학적 활성" 변형된 렐락신 폴리펩티드는 인간 및 비-인간 RXFP1 오르토로그를 포함한 렐락신 2 수용체 RXFP1의 활성화, 인간 및 비-인간 오르토로그를 포함한 RXFP2와 같은 또 다른 렐락신 수용체의 활성화, 시험관내 또는 생체내 항섬유화 활성, 인간, 비-인간 동물 및/또는 모델 시스템에서와 관계 없이 심부전 또는 섬유화 질환의 치료에서의 효능, 및 본원에 개시된 바와 같은 다른 생물학적 활성, 예를 들어, 전신 혈관 저항 (SVR) 감소, 심장 박출량 증가, 전체적 동맥 탄성 증가, 신장 혈류 (RBF) 및/또는 사구체 여과율 (GFR) 증가를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 야생형 렐락신의 생물학적 활성 중 1종 이상을 나타낼 수 있다. 분자가 야생형 렐락신 (예컨대 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 5의 야생형 렐락신 폴리펩티드)의 적어도 1종의 생물학적 활성을 보유하는지 결정하는 예시적인 방법은 시험관내 활성 검정 또는 수용체-결합 검정, 예를 들어, 세포내 cAMP 축적 검정을 포함할 수 있다. 생물학적 활성의 상대 수준은, 예를 들어 생물학적 활성을 갖거나 또는 의도되는 치료 용도를 위해 충분히 높은 생물학적 활성을 갖는, 예를 들어 시험관내 또는 생체내 활성 검정에서 비교자의 EC50보다 5-배 미만, 10-배 미만, 20-배 미만, 50-배 미만, 또는 100-배 미만으로 더 높은 EC50을 갖는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 비교 화합물과 관련하여 결정될 수 있다.

[0043] 본원에 기재된 비교 화합물 변형, 예컨대 본원에 기재된 변형이 결여된 또 다른 서열일 수 있다. 예를 들어, 비교 화합물은 PK 연장제에 대한 연결이 없는 동일한 변형된 렐락신 폴리펩티드 서열일 수 있다. 예시적인 비교 화합물은 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 5의 야생형 렐락신 폴리펩티드, 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 6의 변형된 렐락신 폴리펩티드, 서열식별번호: 36 및 서열식별번호: 6의 변형된 렐락신 폴리펩티드, 서열식별번호: 35 및 서열식별번호: 6의 변형된 렐락신 폴리펩티드, 또는 또 다른 비교 화합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 비교 화합물은 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 반감기 연장 모이어티 (예를 들어 PEG, 또는 지방산)에 연결될 수 있는, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비교 화합물은 링커, 중합체, 생물학적 활성 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 반감기 연장 모이어티에 연결될 수 있는 또는 연결되지 않을 수 있는, 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비교 화합물은 추가의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 아실화 또는 비-아실화 형태와의 비교가 수행될 수 있고; 전자의 경우에는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하거나 포함하지 않는 폴리펩티드와 비교가 수행될 수 있다.

[0044] 용어 "상응하는"은 참조 서열과의 비교에 의해 확인되는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 내의 위치 ("에 상응하는 위치" 또는 "상응하는 위치") 또는 영역 ("에 상응하는 영역" 또는 "상응하는 영역")을 지칭한다. 참조 서열은 야생형 또는 비변형된 서열, 예컨대 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 5의 야생형 렐락신 폴리펩티드일 수 있다. 상응하는 위치 또는 영역은 참조 서열과의 서열 정렬에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, "렐락신 A 쇄에서 아미노산 1에 상응하는 위치"는 서열이 서열식별번호: 4와 정렬되었을때 서열식별번호: 4에서의 아미노산 1과 동일한 정렬 칼럼에 있는 서열 내 위치를 지칭한다. 정렬 시, 아미노산 또는 뉴클레오티드는 참조 서열에서의 상응하는 위치의 아미노산 또는 뉴클레오티드와 매칭될 수 있거나 또는 매칭되지 않을 수

있다.

[0045] 상응하는 위치 또는 상응하는 영역을 확인하는데 사용되는 정렬은 통상적인 정렬 알고리즘 예컨대 블라스트(Blast) (Altschul et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10), 스미스-워터만(Smith-Waterman) (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25;147(1):195-7), 또는 니들만-분쉬(Needleman-Wunsch) (Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53)를 사용하여 수득될 수 있다. 니들만-분쉬 알고리즘은 최고-점수의 전체적 정렬 (즉, 정렬이 갭에서 시작하고/거나 종료할 수 있지만, 둘 다의 서열의 모든 잔기를 함유하는 정렬)을 수득하기 위해 사용될 수 있다. 블라스트, 스미스-워터만 또는 니들만-분쉬를 사용하는 것에 관계 없이, 최고 점수의 정렬은 "디폴트" 파라미터, 예컨대 블로섬62(BLOSUM62) 점수화 매트릭스, 갭 오픈 패널티 11, 및 갭 연장 패널티 1, 및 (쌍별 정렬을 위해 블라스트를 사용하는 경우) 워드 크기 3을 사용하여 확인될 수 있다.

[0046] 용어 "섬유증과 연관된 질환"은 섬유증이 발생한 것으로 관찰되었거나 또는 섬유증이 질환 병인, 진행 또는 증상과 연관되거나 그에 기여하는 것으로 공지되었거나 또는 그렇게 생각되는, 또는 질환 진행에 따라 섬유증이 발생하는 것으로 공지되었거나 또는 그렇게 생각되는 질환, 장애 및 상태를 포함한다. 섬유증은 췌장, 폐, 심장, 신장, 간, 눈, 신경계, 골수, 림프절, 심내막심근 또는 복막후강과 같은 기관 또는 조직에 영향을 미칠 수 있다. 섬유증과 연관된 예시적인 질환은 비알콜성 지방간염 (NASH), 간 섬유증, 간경변증-전증, 간경변증, 미만성 실질 폐 질환, 낭성 섬유증, 폐 또는 폐의 섬유증, 진행성 거대 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 주사 섬유증, 신장 또는 신섬유증, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 초점성 분절성 사구체경화증, 막성 신병증, IgA 신병증, 골수섬유증, 심부전, 대사 심부전, 심장 섬유증, 백내장 섬유증, 백내장, 안구 반흔형성, 췌장 섬유증, 피부 섬유증, 장 섬유증, 장 협착, 심내막심근 섬유증, 심방 섬유증, 종격 섬유증, 크론병, 복막후 섬유증, 켈로이드, 신원성 전신 섬유증, 경피증, 전신 경화증, 관절섬유증, 페이로니 증후군, 듀피트렌 구축, 당뇨병성 신경병증, 유착성 피막염, 알콜성 간 질환, 지방간질환, 바이러스성 간염, 담관계 질환, 원발성 혈색소증, 약물-관련 간경변증, 잠재성 간경변증, 윌슨병, 알파 1-항트립신 결핍, 간질성 폐 질환 (ILD), 인간 섬유화 폐 질환, 황반 변성, 망막 망막병증, 유리체 망막병증, 심근 섬유증, 그레이브스 안병증, 약물 유발 맥각중독, 심혈관 질환, 아테롬성동맥경화증/재협착, 비대성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 및 염증성 장 질환 (콜라겐성 결장염을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 간 섬유증, 신장 또는 신섬유증, 폐 또는 폐의 섬유증, 및 심장 또는 심장의 섬유증을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 간 섬유증일 수 있다. 일부 실시양태에서, 섬유증과 연관된 질환은 NASH일 수 있다.

[0047] 용어 "실질적으로 정제된"은 그의 자연 발생 환경에서, 즉 천연 세포에서, 또는 재조합 생산되는 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 경우 숙주 세포에서 발견되는 바와 같은, 단백질과 통상적으로 동반되거나 또는 상호작용하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않을 수 있는 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 지칭한다. 세포내 물질이 실질적으로 존재하지 않을 수 있는 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 (건조 또는 습윤 중량 기준)의 오염 단백질을 갖는 단백질 제제를 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 방법에 의해 생산된, "실질적으로 정제된" 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 적절한 방법, 예컨대 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC, 및 모세관 전기영동에 의한 결정 시, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 및 보다 구체적으로 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99%의 순도 수준, 또는 그 초과의 순도 수준을 가질 수 있다.

[0048] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는 삽입을 위해 사용되는 방법, 예를 들어 적집 흡수, 형질도입, f-교배, 또는 관련 기술분야에서 재조합 숙주 세포를 생성하는 것으로 공지된 다른 방법에 관계 없이, 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 지칭한다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 비통합 벡터, 예를 들어 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 또는 대안적으로 숙주 게놈 내에 통합될 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "진핵생물"은 계통발생학적 영역 유카리아(Eucarya)에 속하는 유기체, 예컨대 동물 (포유동물, 곤충, 파충류, 조류 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 섬모충, 식물 (단자엽식물, 쌍자엽식물, 조류 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 진균, 효모, 편모충, 미포자충, 원생생물 등을 지칭한다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "비-진핵생물"은 비-진핵 유기체 또는 원핵 유기체를 지칭한다. 예를 들어, 비-진핵 유기체는 유박테리움 (에스케리키아 콜라이(에스케리키아 콜라이), 써무스 써모필루스(Thermus thermophilus), 바실

루스 스테아로써모필루스(Bacillus stearothermophilus), 슈도모나스 플루오레센스(Pseudomonas fluorescens), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 계통발생학적 영역 또는 고세균 (메타노코쿠스 잔나쉬이(Methanococcus jannaschii), 메타노박테리움 써모아우토트로피쿰(Methanobacterium thermoautotrophicum), 할로박테리움(Halobacterium) 예컨대 할로페락스 볼카니이(Haloferax volcanii) 및 할로박테리움 종 NRC-1, 아르카에오글로부스 풀기두스(Archaeoglobus fulgidus), 피로코쿠스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus), 피로코쿠스 호르코쉬이(Pyrococcus horikoshii), 아에로피룸 페르닉스(Aeuropyrum pernix) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 계통발생학적 영역에 속할 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "배지" 또는 "배지들"은 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 숙주 세포, 포유동물 숙주 세포, CHO 세포, 원핵생물 숙주 세포, 이. 콜라이, 또는 슈도모나스 숙주 세포를 포함하는 임의의 숙주 세포, 및 세포 내용물을 지지 또는 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반-고체 또는 경질 지지체를 포함한다. 따라서, 상기 용어는 숙주 세포가 성장한 배지, 예를 들어 증식 단계 전 또는 증식 단계 후의 배지를 포함하여, 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 분비된 배지를 포괄할 수 있다. 상기 용어는 또한, 예컨대 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드가 세포내에서 생산되고 숙주 세포가 용해 또는 파열되어 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 방출시키는 경우에는, 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충제 또는 시약을 포괄할 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "렐락신"은, 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 아미노산 서열 및 공간 구조가 널리 공지되어 있는 인간 렐락신, 구체적으로 인간 렐락신 2 (또한 H2 렐락신 또는 RLN2로도 공지됨)를 지칭한다. 인간 렐락신은 디술피드 결합에 의해 가교된 24개 아미노산 A-쇄 및 29개 아미노산 B-쇄로 구성된다 (도 5 참조). 적절하게 가교된 야생형 렐락신은 3개의 디술피드 가교를 함유한다: 하나는 A-쇄의 위치 11 및 B-쇄의 위치 11 사이, 제2는 A-쇄의 위치 24 및 B-쇄의 위치 23 사이, 및 제3은 A-쇄의 위치 10 및 15 사이.

[0053] 본원에 사용된, "변형된 렐락신 폴리펩티드" 또는 "변형된 렐락신"은 상호교환가능하게 사용되고, 야생형 렐락신 (예를 들어, 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 5의 야생형 인간 렐락신)과 상이하고 전형적으로 렐락신 2의 적어도 1종의 생물학적 활성을 갖는 그러한 폴리펩티드 및 단백질, 뿐만 아니라 그의 렐락신 유사체, 렐락신 이소형, 렐락신 모방체, 다형성 (예를 들어, 자연 발생 렐락신 서열 변이체), 렐락신 단편, 하이브리드 렐락신 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 상동체, 글리코실화 패턴 변이체, 변이체, 스플라이스 변이체, 및 뮤테인을 포함할 것이다. 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드" 및 "변형된 렐락신"은 1종 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 렐락신 폴리펩티드를 포괄한다.

[0054] 자연 발생 렐락신 내의 매우 다양한 아미노산 위치에서의 치환이 변형된 렐락신 폴리펩티드 내로 혼입될 수 있다. 치환은 용해도 또는 안정성을 조정하고, 효능제 활성을 증가시키고, 생체내 또는 시험관내 반감기를 증가시키고, 프로테아제 저항성을 증가시키고, 면역원성 또는 독성을 감소시키고, 정제 또는 제조성을 용이하게 하는 것 등을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드" 또는 "변형된 렐락신"에 포괄된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비-자연 코딩 아미노산 치환(들)이 변형된 렐락신 폴리펩티드 내의 다른 부가, 치환 또는 결실과 조합되어, 또 다른 렐락신 폴리펩티드 (예를 들어, 서열식별번호: 4 및 서열식별번호: 5의 야생형 렐락신 폴리펩티드, 또는 또 다른 렐락신 폴리펩티드, 예컨대 상기 부가, 치환 또는 결실이 없는 동일한 렐락신 폴리펩티드, 또는 또 다른 비변형된 또는 변형된 렐락신 비변형된 또는 변형된 폴리펩티드)와 관련하여 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생물학적 특질에 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 렐락신 폴리펩티드의 안정성 (단백질분해 열화에 대한 저항성을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 증가시키거나 또는 그의 수용체에 대한 변형된 렐락신 폴리펩티드의 친화도를 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 렐락신 폴리펩티드의 제약 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 다른 부가, 치환 또는 결실은 변형된 렐락신 폴리펩티드의 용해도 (이. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현되는 경우를 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 증가시킬 수 있거나, 제조성을 증가시킬 수 있거나, 또는 응집을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 부가, 치환 또는 결실은 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서의 발현 후에 폴리펩티드의 용해도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-천연 아미노산의 혼입을 위한 또 다른 부위에 더하여, 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서의 발현 후에 폴리펩티드의 용해도를 증가시키는 자연 코딩 또는 비-천연 아미노산으로의 치환을 위한 부위(들)이 선택될 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조정하는 추가의 삽입, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 변형된 렐락신의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조정할 수 있다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 렐락신 폴리펩티드 수용체, 결합 단백

질, 또는 회합 리간드에 대한 친화도를 조정하거나, 렐락신 수용체에의 결합 후 신호 전달을 조정하거나, 생체내 또는 순환 반감기를 조정하거나, 치료 반감기를 조정하거나, 폴리펩티드의 안정성을 조정하거나, 프로테아제에 의한 절단을 조정하거나, 용량을 조정하거나, 방출 또는 생체이용률을 조정하거나, 정제를 용이하게 하거나, 탈아미드화를 감소시키거나, 응집을 감소시키거나, 저장 수명 또는 시험관내 반감기를 개선시키거나, 또는 특정 투여 경로를 개선 또는 변경시킬 수 있다. 유사하게, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 검출 (GFP를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 정제 또는 폴리펩티드의 다른 특질을 개선시키는 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 항체-결합 도메인 (FLAG 또는 폴리-His를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 다른 친화성 기반 서열 (FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 연결 분자 (비오틴을 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함할 수 있다.

[0056] 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드" 는 또한 자연-발생 렐락신의 생물학적 활성 단편, 생물학적 활성 변이체 및 입체이성질체 뿐만 아니라 자연-발생 렐락신의 효능제, 모방체, 및 길항제 변이체, 및 그의 폴리펩티드 융합체를 포함한다. 아미노 말단, 카르복실 말단 또는 둘 다에서 추가의 아미노산을 포함하는 융합체는 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드"에 포괄된다. 예시적인 융합체는 예를 들어 리더 또는 신호 펩티드가 결여된 렐락신의 성숙 형태 또는 그의 부분의 재조합 발현으로부터 생성된 렐락신 A 쇄 및/또는 B 쇄의 N-말단에 메티오닌이 연결된 메티오닐 렐락신 (예를 들어 메티오닌은 예를 들어 이. 콜라이에서의 재조합 발현으로부터 생성되는 렐락신 A 쇄 및/또는 B 쇄의 N-말단에 연결됨), 정제를 목적으로 하는 융합체 (폴리-히스티딘 또는 친화성 에피토프를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 혈청 알부민 결합 펩티드, 예컨대 PKE 애드넥틴을 갖는 융합체 및 혈청 단백질, 예컨대 혈청 알부민을 갖는 융합체, 및 렐락신 및 1개 이상의 다른 분자 ("융합 파트너"), 예를 들어 비제한적으로 혈청 알부민, Fc 도메인, 이뮤노글로불린 불변 영역, 비구조화 폴리펩티드 및 애드넥틴을 포함하는 융합 단백질 및 그의 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 임의의 이러한 단편은 단백질로부터 표준 생화학적 방법에 의해, 또는 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0057] 달리 지시되는 경우를 제외하고, 일반적으로 본원에 사용된 용어 "렐락신 폴리펩티드" 및 "렐락신"은 비변형된 (즉, 야생형) 렐락신 및 변형된 렐락신 폴리펩티드 둘 다를 포괄한다.

[0058] 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드"는 중합체, 예컨대 PEG 또는 PK 연장제와 접합된 폴리펩티드를 포함하며, 이는 임의로 시스테인, 리신 또는 다른 잔기의 1개 이상의 유도체화를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 링커, 중합체, 또는 PK 연장제를 포함할 수 있고, 여기서 링커, 중합체 또는 PK 연장제가 접합되는 아미노산은 본 개시내용에 따른 비-천연 아미노산일 수 있거나, 또는 이는 리신 또는 시스테인과의 커플링과 같은 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 자연 코딩 아미노산 (예를 들어 리신 또는 시스테인)에 접합될 수 있다.

[0059] 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드"는 또한, 렐락신 폴리펩티드 내의 자연-코딩 아미노산, 예를 들어 시스테인 또는 리신을 통해 본원에 기재된 PK 연장제에 접합되거나 또는 연결된 렐락신 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자연-코딩 아미노산은 렐락신 폴리펩티드 내의 치환 또는 삽입일 수 있다.

[0060] 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드"는 또한 글리코실화 변형된 렐락신, 예컨대 비제한적으로 임의의 아미노산 위치에서 글리코실화된 폴리펩티드, 폴리펩티드의 N-연결 또는 O-연결된 글리코실화 형태를 포함한다. 또한, 스플라이스 변이체가 또한 포함된다.

[0061] 본원에 기재된 비변형된 또는 변형된 렐락신 내의 아미노산 위치에 대한 모든 언급은 달리 명시되지 않는 한 서열식별번호: 4의 A 쇄 또는 서열식별번호: 5의 B 쇄의 상응하는 위치에 기초한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 서열식별번호: 4 또는 5 내의 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 또 다른 렐락신 서열이 렐락신 융합체, 변이체, 단편 등과 같은 임의의 다른 렐락신 분자에서 용이하게 확인될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어 서열 정렬 프로그램, 예컨대 블라스트는 서열식별번호: 4 또는 5 또는 다른 렐락신 서열에서의 위치에 상응하는 단백질 내의 특정한 위치를 정렬 및 확인하는데 사용될 수 있다. 서열식별번호: 4 또는 5, 또는 다른 렐락신 서열과 관련하여 본원에 기재된 아미노산의 치환, 결실 또는 부가는 또한 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 렐락신 융합체, 변이체, 단편 등에서의 상응하는 위치의 치환, 결실 또는 부가를 지칭하는 것으로 의도되며, 이는 본 개시내용에 명백하게 포괄된다.

[0062] 용어 "변형된 렐락신 폴리펩티드"는 또한 융합 파트너, 예컨대 Fc 도메인을 통해 형성되거나 또는 연결되는, 예를 들어 비제한적으로 동일하거나 또는 상이한 비-자연 코딩 아미노산 측쇄, 자연-코딩 아미노산 측쇄에 비-자연 코딩 아미노산 측쇄를 통해 직접적으로 연결되거나, 또는 링커를 통해 간접적으로 연결되는 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 및 이종다량체를 포괄한다. 예시적인 링커는 소형 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성

중합체 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리덱스트란, 또는 예를 들어 최대 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2개, 또는 최대 1개 아미노산 길이의 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0063] 본원에 사용된 용어 "변형된"은 주어진 폴리펩티드에 대하여 이루어지는 임의의 변화, 예컨대 폴리펩티드의 길이, 폴리펩티드의 아미노산 서열, 화학적 구조, 공동-번역 변형, 또는 번역-후 변형에 대한 변화를 지칭한다. 용어 "번역-후 변형"은 천연 또는 비-천연 아미노산이 폴리펩티드 쇄에 혼입된 후에 이러한 아미노산에 대하여 발생하는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 변형을 지칭한다. 상기 용어는 단지 예로서, 공동-번역 생체내 변형, 공동-번역 시험관내 변형 (예컨대, 무세포 번역 시스템에서), 번역-후 생체내 변형, 및 번역-후 시험관내 변형을 포괄한다.

[0064] "비-자연 코딩 아미노산"은 20종의 통상의 아미노산 또는 피롤리신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 지칭한다. 용어 "비-자연 코딩 아미노산"과 동의어로 사용될 수 있는 다른 용어는 "비-천연 아미노산," "비천연 아미노산," "비-자연 발생 아미노산," 및 그의 다양한 하이픈 연결된 버전 및 하이픈 연결되지 않은 버전이다. 용어 "비-자연 코딩 아미노산"은 또한 자연 코딩 아미노산 (20종의 통상의 아미노산 또는 피롤리신 및 셀레노시스테인을 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 변형 (예를 들어, 번역-후 변형)에 의해 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장 중인 폴리펩티드 쇄 내로 자연 혼입되는 것은 아닌 아미노산을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 비-자연 코딩 아미노산의 예는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포티로신을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0065] 변형된 렐락신 폴리펩티드와 관련하여, 본원에 사용된 용어 "파라-아세틸-페닐알라닌" 및 "파라-아세틸-L-페닐알라닌" (약어 pAcF 및 pAF 포함)은 또한 파라 위치의 아세틸 기가 존재하지 않고 그 곳에 또 다른 분자에의 연결이 존재하는 화학 반응의 생성물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 파라-아세틸-페닐알라닌 (예컨대 파라-아세틸-L-페닐알라닌)을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드에서, 파라-아세틸-페닐알라닌은 파라-위치에 옥심, 트리아졸, 아미드, 또는 다른 연결을 포함할 수 있고, 예를 들어 파라-아세틸-L-페닐알라닌의 카르보닐 기와 아미노옥시 기의 반응으로부터 생성된 옥심 연결을 갖고, 파라 위치에서 카르보닐 탄소가 결여될 수 있다. 이러한 파라-아세틸-페닐알라닌은 "변형된 파라-아세틸-페닐알라닌", 예를 들어, "변형된 파라-아세틸-L-페닐알라닌"으로 지칭될 수 있다.

[0066] 예시적인 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌 (pACF)이다. 이는 문헌 [Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746]의 이전에 기재된 절차를 사용하여 합성될 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0067] "아미노 말단 변형 기"는 폴리펩티드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 유사하게, "카르복시 말단 변형 기"는 폴리펩티드의 카르복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 말단 변형 기는 다양한 수용성 중합체, 메티오닌, 펩티드 또는 단백질, 예컨대 혈청 알부민, Fc 도메인, 이뮤노글로불린 불변 영역, 비구조화 폴리펩티드, 애드넥틴, 또는 그의 단편, 지방산 또는 그의 유도체, 또는 폴리펩티드의 혈청 (생체내) 반감기를 증가시키는 다른 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0068] 용어 "관능기", "활성 모이어티", "활성화 기", "이탈기", "반응성 부위", "화학적 반응성 기" 및 "화학적 반응성 모이어티"는 관련 기술분야에서 사용되고 있으며, 본원에서는 분자의 별개의 한정가능한 부분 또는 단위를 지칭한다. 상기 용어는 화학 기술분야에서 어느 정도 동의어로서 사용되며, 본원에서는 일부 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와의 반응성을 갖는 분자의 부분을 지시하기 위해 사용된다.

[0069] 본원에서 용어 "연결"은 화학 반응의 결과로서 일반적으로 형성되며 전형적으로 공유 연결인 기 또는 결합을 나타내기 위해 사용된다. 가수분해에 안정한 연결은, 연결이 연장된 기간 동안, 아마도 심지어는 무기한으로 생리학적 조건을 비제한적으로 포함하는 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않고 물에서 실질적으로 안정하다는 것을 의미한다. 가수분해에 불안정한 또는 가수분해에 의해 분해가능한 연결은, 연결이 물 또는 수용액, 예를 들어 혈액에서 분해가능하다는 것을 의미한다. 효소에 불안정한 또는 효소에 의해 분해가능한 연결은, 연결이 1종 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 관련 기술분야에서 이해되고 있는 바와 같이, PEG, 지방산, 및 다른 중합체는 중합체 백본에 또는 중합체 백본과 중합체 분자의 말단 관능기 중 하나 이상의 사이에 있는 링커 기에 분해가능한 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산과 생물학적 활성제 상의 알콜 기의 반응에 의해 형성될 수 있는 에스테르 연결은 일반적으로 생리학적 조건 하에 가수분해되어 작용제를 방출시킨다. 가수분해에 의해 분해가능한 다른 연결은 카르보네이트 연결; 아민과 알데히드의 반응으로부터 생성될 수 있는 이민 연결; 알콜을 포스페이트 기와 반응시킴으로써 형성될 수 있는 포스페

이트 에스테르 연결; 히드라지드와 알데히드의 반응 생성물일 수 있는 히드라존 연결; 알데히드와 알콜의 반응 생성물일 수 있는 아세탈 연결; 포르메이트와 알콜의 반응 생성물일 수 있는 오르토에스테르 연결; 아민 기, 예를 들어 비제한적으로 중합체의 말단에 존재하는 것과 퀩티드의 카르복실 기에 의해 형성될 수 있는 퀩티드 연결; 카르보닐 관능기와 히드록실아민-, 또는 세미카르바지드-함유 시약의 반응 생성물일 수 있는 옥심 또는 세미카르바존 연결; 및 포스포라미디트 기, 예를 들어 비제한적으로 중합체의 말단에 존재하는 것과 올리고뉴클레오티드의 5' 히드록실 기에 의해 형성될 수 있는 올리고뉴클레오티드 연결을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0070] 치환기가 좌측에서 우측으로 기재된, 그의 통상적인 화학식으로 명시된 경우, 이들은 우측에서 좌측으로 구조를 기재함으로써 생성될 화학적으로 동일한 치환기를 동등하게 포괄하며, 예를 들어 구조 CH2O는 구조 -OCH2-와 동등하다. 본원에 제시된 조성물은 1개 이상의 원자가 자연에서 통상적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자에 의해 대체된 동위원소-표지 화합물을 포함할 수 있다. 본원에 제시된 조성물은 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 및 그의 혼합물, 예를 들어, L-아미노산 및/또는 D-아미노산 (예컨대 파라-아세틸-D-페닐알라닌 및/또는 파라-아세틸-L-페닐알라닌)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 이성질체를 포함할 수 있다.

[0071] 용어 "치환기"는 "비-간섭 치환기"를 비제한적으로 포함한다. "비-간섭 치환기"는 안정한 화합물을 제공하는 기이다. 적합한 비-간섭 치환기 또는 라디칼은 할로, C1-C10 알킬, C2-C10 알케닐, C2-C10 알키닐, C1-C10 알콕시, C1-C12 아랄킬, C1-C12 알카릴, C3-C12 시클로알킬, C3-C12 시클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루오일, 크실레닐, 비페닐, C2-C12 알콕시알킬, C2-C12 알콕시아릴, C7-C12 아릴옥시알킬, C7-C12 옥시아릴, C1-C6 알킬술피닐, C1-C10 알킬술포닐, m이 1 내지 8인 --(CH2)m--O--(C1-C10 알킬), 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오로알킬, 헤테로시클릭 라디칼, 치환된 헤테로시클릭 라디칼, 니트로알킬, --NO2, --CN, --NRC(O)--(C1-C10 알킬), --C(O)--(C1-C10 알킬), C2-C10 알킬 티오알킬, --C(O)O--(C1-C10 알킬), --OH, --SO2, =S, --COOH, --NR2, 카르보닐, --C(O)--(C1-C10 알킬)-CF3, --C(O)-CF3, --C(O)NR2, --(C1-C10 아릴)-S--(C6-C10 아릴), --C(O)--(C1-C10 아릴), 각각의 m이 1 내지 8인 --(CH2)m--O--(--(CH2)m--O--(C1-C10 알킬), --C(O)NR2, --C(S)NR2, --SO2NR2, --NRC(O) NR2, --NRC(S) NR2, 이들의 염 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 R은 각각 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 치환된 아릴, 아랄킬 또는 알카릴이다.

[0072] 용어 "할로겐"은 플루오린, 염소, 아이오딘 및 브로민을 포함한다.

[0073] 용어 "알킬"은, 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서, 달리 언급되지 않는 한, 직쇄 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합을 의미하고, 이는 완전 포화, 단일- 또는 다중불포화일 수 있고, 2- 및 다가 라디칼을 포함할 수 있고, 지정된 수의 탄소 원자를 갖는다 (즉, C1-C10은 1 내지 10개의 탄소를 의미함). 포화 탄화수소 라디칼의 예는 기 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 예를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸의 동족체 및 이성질체 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 불포화 알킬 기는 1개 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 것이다. 불포화 알킬 기의 예는 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 동족체 및 이성질체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "알킬"은, 달리 나타내지 않는 한, 또한 하기에 보다 상세하게 정의된 알킬의 유도체, 예컨대 "헤테로알킬"을 임의로 포함하는 것으로 의도된다. 탄화수소 기로 제한된 알킬 기는 "호모알킬"로 명명된다.

[0074] 용어 "알킬렌"은, 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서, 비제한적으로, 구조 -CH2CH2- 및 -CH2CH2CH2CH2-에 의해 예시되는 바와 같은 알칸으로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하고, 추가로 "헤테로알킬렌"으로서 하기 기재된 기를 포함한다. 전형적으로, 알킬 (또는 알킬렌) 기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가질 것이고, 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 그러한 기가 본원에 기재된 방법 또는 조성물의 특정한 실시양태이다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 보다 짧은 쇄 알킬 또는 알킬렌 기이다.

[0075] 용어 "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오" (또는 티오알콕시)는 그의 통상적인 의미로 사용되고, 각각 산소 원자, 아미노 기, 또는 황 원자를 통해 분자의 나머지에 부착되어 있는 알킬 기를 지칭한다.

[0076] 용어 "헤테로알킬"은 그 자체로 또는 또 다른 용어와 조합되어, 달리 언급되지 않는 한, 언급된 수의 탄소 원자 및 O, N, Si 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 헤테로원자로 이루어지고, 여기서 질소 및 황 원자가 임의로 산화될 수 있고 질소 헤테로원자가 임의로 4급화될 수 있는 안정한 직쇄 또는 분지쇄, 또는 시클릭 탄화수소 라디칼, 또는 그의 조합을 의미한다. 헤테로원자(들) O, N 및 S 및 Si는 헤테로알킬 기의 임의의 내

부 위치에 위치할 수 있거나 또는 알킬 기가 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치에 위치할 수 있다. 예는 -CH2-CH2-O-CH3, -CH2-CH2-NH-CH3, -CH2-CH2-N(CH3)-CH3, -CH2-S-CH2-CH3, -CH2-CH2,-S(O)-CH3, -CH2-CH2-S(O)2-CH3, -CH=CH-O-CH3, -Si(CH3)3, -CH2-CH=N-OCH3, 및 -CH=CH-N(CH3)-CH3을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, -CH2-NH-OCH3 및 -CH2-O-Si(CH3)3과 같이 2개 이하의 헤테로원자가 연속적일 수 있다. 유사하게, 용어 "헤테로알킬렌"은 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서, 비제한적으로 -CH2-CH2-S-CH2 CH2- 및 -CH2-S-CH2-CH2-NH-CH2-에 의해 예시되는 바와 같은, 헤테로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다. 헤테로알킬렌 기의 경우, 동일하거나 상이한 헤테로원자가 또한 쇄 말단 중 어느 하나 또는 둘 다를 점유할 수 있다 (알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 아미노옥시알킬렌 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음). 또한 추가로, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우에, 연결기의 어떠한 배향도 연결기의 화학식이 기록된 방향에 의해 의미되지는 않는다. 예를 들어, 화학식 -C(O)2R'는 -C(O)2R' 및 -R'C(O)2 둘 다를 나타낸다.

[0077] 용어 "시클로알킬" 및 "헤테로시클로알킬"은 그 자체로 또는 다른 용어와 조합되어, 달리 언급되지 않는 한, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 시클릭 버전을 나타낸다. 따라서, 시클로알킬 또는 헤테로시클로알킬은 포화, 부분 불포화 및 완전 불포화 고리 연결을 포함한다. 추가적으로, 헤테로시클로알킬의 경우, 헤테로원자는 헤테로사이클이 분자의 나머지에 부착되는 위치를 점유할 수 있다. 시클로알킬의 예는 시클로펜틸, 시클로헥실, 1-시클로헥세닐, 3-시클로헥세닐, 시클로헵틸 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 헤테로시클로알킬의 예는 1-(1,2,5,6-테트라히드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라히드로푸란-2-일, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 추가적으로, 용어는 비시클릭 및 트리시클릭 고리 구조를 포괄한다. 유사하게, 용어 "헤테로시클로알킬렌"은 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서 헤테로시클로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하고, 용어 "시클로알킬렌"은 그 자체로 또는 또 다른 치환기의 일부로서 시클로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다.

[0078] 용어 "아릴"은 달리 언급되지 않는 한, 함께 융합되거나 공유 연결된 단일 고리 또는 다중 고리 (1 내지 3개의 고리를 포함하나 이에 제한되지는 않음)일 수 있는 다중불포화, 방향족, 탄화수소 치환기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴"은 N, O, 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 아릴기 (또는 고리)를 지칭하며, 여기서 질소 및 황 원자는 임의로 산화되고, 질소 원자(들)은 임의로 4급화된다. 헤테로아릴 기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴 기의 비제한적 예는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴, 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 각각의 상기 언급된 아릴 및 헤테로아릴 고리계에 대한 치환기는 하기 기재된 허용되는 치환기의 군으로부터 선택된다.

[0079] 간략하게, 용어 "아릴"은 다른 용어와 조합되어 사용된 경우에 (아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 상기 정의된 바와 같은 아릴 및 헤테로아릴 고리 둘 다를 포함한다. 따라서, 용어 "아릴알킬"은 탄소 원자 (메틸렌 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음)가, 예를 들어, 산소 원자에 의해 대체된 알킬 기 (페녹시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함하는 알킬 기에 아릴 기가 부착되어 있는 라디칼 (벤질, 페네틸, 피리딜메틸 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0080] 상기 용어 ("알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴"을 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 각각은 표시된 라디칼의 치환된 및 비치환된 형태 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 라디칼의 각각의 유형에 대한 예시적인 치환기가 하기 제공된다.

[0081] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼 (종종 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 시클로알케닐, 및 헤테로시클로알케닐로 지칭되는 기 포함)에 대한 치환기는 비제한적으로 하기로부터 선택된 다양한 기: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR' C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", NR C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN 및 -NO2 중 1개 이상일 수 있고, 이는 0 내지 (2m'+1) 범위의 수로 존재하고, 여기서 m'는 이러한 라디칼에서의 탄소 원자의 총 수이다. R', R", R"' 및 R""는 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 1-3개의 할로겐으로 치환된 아릴을 포함하나

이에 제한되지는 않는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬 기를 의미한다. 본 발명의 화합물이 하나 초과의 R 기를 포함하는 경우, 예를 들어, 각각의 R 기는, 하나 초과의 R', R", R'" 및 R"" 기가 존재하는 경우의 각각의 R', R", R'" 및 R"" 기에서와 같이 독립적으로 선택된다. R' 및 R"가 동일한 질소 원자에 부착될 때, 이들은 질소 원자와 조합되어 5-, 6-, 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어 -NR'R"는 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 것으로 의도된다. 상기 치환기에 대한 논의로부터, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용어 "알킬"이 수소 기 이외의 다른 기, 예컨대 할로알킬 (-CF3 및 -CH2CF3을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 아실 (-C(O)CH3, -C(O)CF3, -C(O)CH2OCH3 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 결합하는 탄소 원자를 포함하는 기를 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0082] 알킬 라디칼에 대해 기재된 치환기와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴 기에 대한 치환기도 다양하며, 비제한적으로: 할로겐, OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR' C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', NR-C(NR'R"R'")=NR"", NR C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN 및 -NO2, -R', -N3, -CH(Ph)2, 플루오로(C1-C4)알콕시 및 플루오로(C1-C4)알킬로부터 선택되고, 이는 0 내지 방향족 고리계 상의 개방 원자가의 총수의 범위의 수로 존재하고; 여기서 R', R", R"' 및 R""는 독립적으로 수소, 알킬, 헤테로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로부터 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 초과의 R 기를 포함하는 경우, 예를 들어, 각각의 R 기는, 하나 초과의 R', R", R'" 및 R"" 기가 존재하는 경우의 각각의 R', R", R'" 및 R"" 기에서와 같이 독립적으로 선택된다.

[0083] 용어 "지방산"은 6 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 포화 또는 불포화 아실 쇄 또는 그의 유도체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 본원에 기재된 PK 인핸서의 펩티드 성분에 연결될 수 있고, 카르복실산 또는 메틸기로 종결될 수 있다. 일부 실시양태에서, PK 인핸서의 펩티드 성분에 연결된 지방산은 카르복실산으로 종결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산은 아미드 결합을 통해 펩티드 성분에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산은 10 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산은 12 내지 17개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산은 14, 15 또는 16개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산은 15개의 탄소 원자를 가질 수 있다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "수용성 중합체"는 수성 용매에서 가용성인 임의의 중합체를 지칭한다. 수용성 중합체의 변형된 렐락신 폴리펩티드와의 연결은 비변형된 형태와 비교하여 혈청 (생체내) 반감기의 증가 또는 조정, 또는 치료적 반감기의 증가 또는 조정, 면역원성 또는 독성의 감소 또는 조정, 물리적 회합 특징의 조정, 예컨대 응집 및 다량체 형성의 감소, 수용체 결합의 조정, 1종 이상의 결합 파트너와의 결합 조정, 및 수용체 이량체화 또는 다량체화의 변경을 비제한적으로 포함하는 변화를 초래할 수 있다. 수용성 중합체는 그 자체의 생물학적 활성을 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있고, 변형된 렐락신을 다른 물질, 예를 들어 비제한적으로 하나 이상의 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 생물학적 활성 분자에 부착시키기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적합한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 이들의 모노 C1-C10 알콕시 또는 아릴옥시 유도체 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,252,714에 기재되어 있음), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 불연속형 PEG, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말레산 무수물, N-(2-히드록시프로필)-메타크릴아미드, 덱스트란, 덱스트란 술페이트를 포함하는 덱스트란 유도체, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 글리칸, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 예를 들어 비제한적으로 메틸셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스, 전분 및 전분 유도체, 2개 이상의 아미노산의 폴리펩티드, 폴리알킬렌 글리콜 및 그의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 그의 유도체, 폴리비닐 에틸 에테르, 및 알파-베타-폴리[(2-히드록시에틸)-DL-아스파르트아미드 등, 또는 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 수용성 중합체의 예는 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0085] 본원에 사용된 용어 "폴리알킬렌 글리콜" (PEG) 또는 "폴리(알켄 글리콜)"은 폴리에틸렌 글리콜 (폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜, 및 그의 유도체를 지칭한다. 용어 "폴리알킬렌 글리콜"은 선형 및 분지형 중합체를 둘 다 포괄하고, 이들의 평균 분자량은 0.1 kDa 내지 100 kDa이다. 다른 예시적인 실시양태는 예를 들어, 상업적 공급업체의 카탈로그, 예컨대 쉐어워터 코포레이션(Shearwater Corporation)의 카탈로그 ["Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)]에 열거되어 있다.

[0086] 본원에 사용된 용어 "조정된 혈청 반감기" 또는 "조정된 생체내 반감기"와 유사한 용어들은 비교자, 예컨대 그의 비변형된 형태 또는 야생형 렐락신과 비교하여 변형된 렐락신의 순환 반감기의 양의 또는 음의 변화를 지칭한다. 혈청 반감기는 변형된 렐락신의 투여 후 다양한 시점에서 혈액 샘플을 수집하고, 각각의 샘플에서의 상

기 분자의 농도를 결정함으로써 측정가능하다. 혈청 농도와 시간의 상관관계가 혈청 반감기의 계산을 가능하게 한다. 증가한 혈청 (생체내) 반감기는 바람직하게는 적어도 약 2배일 수 있지만, 보다 소폭의 증가가 유용할 수 있는데, 예를 들어 이러한 경우에는 만족스러운 투여 요법을 가능하게 하거나 또는 독성 효과를 피하게 한다. 일부 실시양태에서, 증가는 적어도 약 3-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 20-배, 또는 적어도 약 50-배일 수 있다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "조정된 치료적 반감기"는 비교자, 예컨대 비변형된 형태 또는 야생형 렐락신과 비교하여 본원에 기재된, 변형된 렐락신 폴리펩티드의 치료 유효량의 혈청 또는 생체내 반감기의 양의 또는 음의 변화를 의미한다. 치료적 반감기는 투여 후 다양한 시점에서의 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 증가한 치료적 반감기는 바람직하게는 특히 유익한 투여 요법, 특히 유익한 총 용량을 가능하게 하거나, 또는 바람직하지 않은 효과를 피하게 한다. 일부 실시양태에서, 증가한 치료적 반감기는 증가한 효능, 변형된 분자의 그의 표적과의 결합 증가 또는 감소, 효소, 예컨대 프로테아제에 의한 분자의 증가 또는 감소한 파괴, 또는 비변형 분자의 또 다른 파라미터 또는 작용 메카니즘의 증가 또는 감소, 또는 분자의 수용체-매개 클리어런스의 증가 또는 감소로부터 초래된다. 일부 실시양태에서, 치료 반감기의 증가는 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배, 적어도 약 20-배, 또는 적어도 약 50-배일 수 있다.

[0088] 핵산 또는 단백질에 적용되는 "단리된"이라는 용어는, 자연 상태에서는 회합되어 있는 세포내 성분의 적어도 일부가 핵산 또는 단백질에서 제거되거나, 또는 핵산 또는 단백질이 생체내 또는 시험관내 생산 시의 농도보다 높은 수준으로 농축되는 것을 나타낸다. 이것은 균질 상태일 수 있다. 단리된 물질은 건조 또는 반-건조 상태이거나, 또는 용액, 예를 들어 비제한적으로 수용액으로 존재할 수 있다. 이것은 추가의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 제약 조성물의 성분일 수 있다. 순도 및 균질도는 전형적으로 분석 화학 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 제제 중에 존재하는 우세한 화학종의 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 특히, 단리된 유전자는 유전자에 플랭킹되고 관심 유전자 이외의 다른 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임으로부터 분리된다. 용어 "정제된"이란 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 실질적으로 1개의 밴드를 발생시키는 것을 나타낸다. 특히, 이것은 핵산 또는 단백질이 적어도 85%의 순도, 적어도 90%의 순도, 적어도 95%의 순도, 적어도 99% 또는 그 초과의 순도를 갖는다는 것을 의미할 수 있다.

[0089] 용어 "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오티드, 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는, 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 구체적으로 달리 제한되지 않는 한, 상기 용어는 또한 PNA (펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체 (포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 유사체를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 암시적으로 그의 보존적으로 변형된 변이체 (축중성 코돈 치환을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 상보적 서열 뿐만 아니라, 명백하게 지시된 서열을 포괄한다.

[0090] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 나타내기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 즉, 폴리펩티드에 관한 설명이 펩티드에 관한 설명 및 단백질에 관한 설명에 대등하게 적용되며, 그 반대의 경우에 적용되기도 한다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체 뿐만 아니라, 1개 이상의 아미노산 잔기가 비-자연 코딩 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에 사용된 상기 용어는 전장 단백질을 포함하는, 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포괄하고, 여기서 아미노산 잔기는 공유 펩티드 결합에 의해 연결된다.

[0091] "보존적으로 변형된 변이체"는 보존적 치환을 함유하는 아미노산 서열을 지칭한다. 예시적인 보존적으로 변형된 변이체는 폴리펩티드 서열 또는 코딩된 폴리펩티드 서열에서 단일 아미노산 또는 낮은 백분율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는, 예를 들어 폴리펩티드 서열 또는 코딩된 폴리펩티드 서열에서 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 최대 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% 또는 3.5%의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 치환, 결실 또는 삽입을 포함하고, 이들은 임의로 아미노산(들)의 화학적으로 유사한 아미노산(들)에 의한 치환일 수 있거나 또는 그러한 치환을 포함할 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 개시된 변형된 렐락신 폴리펩티드의 다형성 변이체, 종간 상동체 및 대립유전자에 대하여 추가적인 것으로서, 이들을 배제하지 않는다.

[0092] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

하기 8개의 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

[0093] 1) 알라닌 (A 또는 Ala), 글리신 (G 또는 Gly);

[0094] 2) 아스파르트산 (D 또는 Asp), 글루탐산 (E 또는 Glu);

[0095] 3) 아스파라긴 (N 또는 Asn), 글루타민 (Q 또는 Gln);

[0096] 4) 아르기닌 (R 또는 Arg), 리신 (K 또는 Lys), 히스티딘 (H 또는 His);

[0097] 5) 이소류신 (I 또는 Ile), 류신 (L 또는 Leu), 메티오닌 (M 또는 Met), 발린 (V 또는 Val);

[0098] 6) 페닐알라닌 (F 또는 Phe), 티로신 (Y 또는 Tyr), 트립토판 (W 또는 Trp);

[0099] 7) 세린 (S 또는 Ser), 트레오닌 (T 또는 Thr); 및

[0100] 8) 시스테인 (C 또는 Cys), 메티오닌 (M 또는 Met)

[0101] (예를 들어, 문헌 [Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)] 참조)

[0102] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 퍼센트는 동일한 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 서열이 하기 서열 비교 알고리즘 (또는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이용가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 이용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사로 측정하였을 때, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 대하여 최대 상응도로 비교 및 정렬되어 일정 백분율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 가지면 (즉, 특정된 영역에 대하여 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%의 동일성을 보임), 서열이 "실질적으로 동일하다". 동일성은 적어도 약 20개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이의 영역 또는 비교 윈도우에 대하여, 또는 적어도 약 25개 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이의 영역에 대하여, 또는 특정되는 않은 경우에는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 전체 서열에 걸쳐서 존재할 수 있다. 본원에 사용된 "비교 윈도우"는 인접 위치의 임의의 절편, 예를 들어, 적어도 또는 약 10, 15, 20, 25, 또는 30개의 아미노산에 대한 참조를 포함하며, 여기서 서열은 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 동일한 수의 인접 위치의 참조 서열과 비교될 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는데 적합할 수 있는 알고리즘의 예는 문헌 [Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 및 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기재되어 있는 블라스트 및 블라스트 2.0 알고리즘 뿐만 아니라, 스미스-워터만 (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25;147(1):195-7), 또는 니들만-브니쉬 (Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53) 알고리즘이고, 이들은 예를 들어 각각의 문헌에 기재되어 있는 바와 같이 디폴트 파라미터를 이용하여 실행될 수 있다.

[0103] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 동물, 일부 실시양태에서는 포유동물, 또한 다른 실시양태에서는 인간을 지칭한다. 동물은 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물 (예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험 동물 (예를 들어, 래트, 마우스, 기니 피그 등)일 수 있다.

[0104] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 치료되는 질환, 상태 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 예방하거나, 치유하거나, 경감시키거나, 완화시키거나, 발병을 지연시키거나, 중증도를 감소시키거나, 또는 어느 정도까지 감소시킬 수 있는, 투여되는 화합물 (예를 들어, 본원에 기재된, 변형된 렐락신 폴리펩티드)의 양을 지칭한다. 본원에 기재된, 변형된 렐락신 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 예방적, 증진적 및/또는 치유적 치료를 위해 투여될 수 있다.

[0105] 용어 "증진시키다" 또는 "증진시키는"은 목적하는 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가 또는 연장시키는 것을 의미한다. 따라서, 치료제의 효과를 증진시키는 것과 관련하여, 용어 "증진시키는"은 다른 치료제의 계에 대한 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가 또는 연장시키는 능력을 지칭한다.

[0106] 예방적 적용에 있어서, 변형된 렐락신 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 특정 질환, 장애 또는 상태에 감수성이거나 또는 달리 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방 유효량"이라 정의된다.

[0107] 치료적 적용에 있어서, 변형된 비-천연 아미노산 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 질환, 상태 또는 장애를 이미 앓고 있는 환자에게, 상기 질환, 장애 또는 상태의 증상을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 저지 또는 진정시키는 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "치료 유효량"이라 정의되며, 질환, 장애 또는 상태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료하는 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다.

상용 실험 (예를 들어, 용량 증량 임상 시험)에 의해 이러한 치료 유효량을 결정하는 것은 관련 기술분야의 기술 범위 내에서 널리 고려되고 있다.

[0108] 용어 "치료하는"은 예방적 및/또는 치유적 치료를 지칭하는 것으로 사용된다.

[0109] 단백질 리폴딩과 관련하여 본원에 사용된 "환원제"는 환원된 상태에서 술프히드릴 기를 유지하고 분자내 또는 분자간 디술피드 결합을 환원시키는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적합한 환원제는 디티오트레이톨 (DTT), 2-메르캅토에탄올, 시스테인, 시스테아민 (2-아미노에탄티올), 및 환원 글루타티온을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 매우 다양한 환원제가 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합하다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백하다.

[0110] 단백질 리폴딩과 관련하여 본원에 사용된 "산화제"는 산화되는 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적합한 산화제는 산화된 글루타티온, 시스틴, 시스타민, 산화된 디티오트레이톨, 산화된 에리트레이톨 및 산소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 매우 다양한 산화제가 본 발명의 방법에 사용하기에 적합하다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백하다.

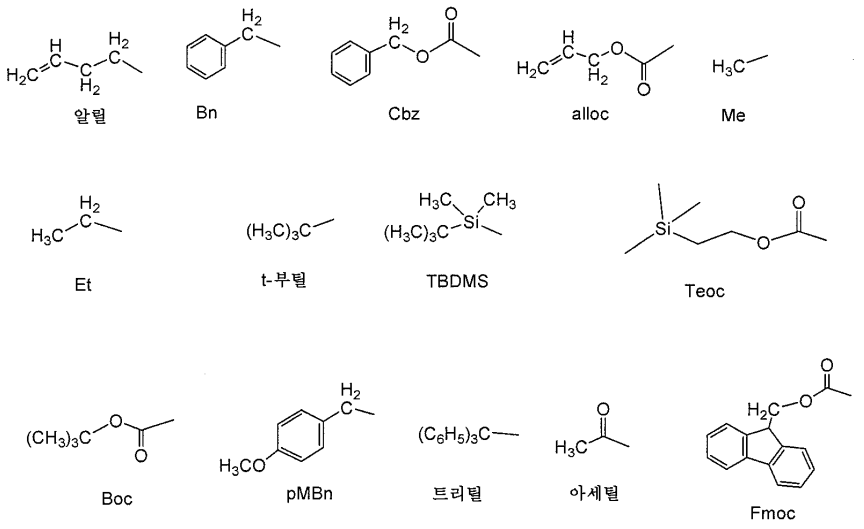
[0111] 본원에 사용된 "변성 작용제" 또는 "변성제"는 단백질의 가역적 언폴딩을 유발할 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 변성 작용제 또는 변성제의 강도는 특정한 변성 작용제 또는 변성제의 특성 및 농도 둘 다에 의해 결정될 것이다. 적합한 변성 작용제 또는 변성제는 카오트로프제, 세제, 유기 용매, 수혼화성 용매, 인지질 또는 2종 이상상 이러한 작용제의 조합일 수 있다. 적합한 카오트로프제는 우레아, 구아니딘 및 티오시안산나트륨을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 유용한 세제는 강한 세제, 예컨대 소듐 도데실 술페이트, 또는 폴리옥시에틸렌 에테르 (예를 들어 트윈 또는 트리톤 세제), 사르코실, 온화한 비-이온성 세제 (예를 들어, 디기토닌), 온화한 양이온성 세제 예컨대 N-2,3-(디올레일옥시)-프로필-N,N,N-트리메틸암모늄, 온화한 이온성 세제 (예를 들어 콜산나트륨 또는 데옥시콜산나트륨), 또는 술포베타인 (쯔비터젠트), 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-1-프로판 술페이트 (CHAPS), 및 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-2-히드록시-1-프로판 술포네이트 (CHAPSO)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 쯔비터이온성 세제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 유기, 수혼화성 용매, 예컨대 아세토니트릴, 저급 알칸올 (특히 C2 - C4 알칸올, 예컨대 에탄올 또는 이소프로판올), 또는 저급 알칸디올 (특히 C2 - C4 알칸디올, 예컨대 에틸렌-글리콜)이 변성제로서 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 인지질은 자연 발생 인지질 예컨대 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 및 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체 또는 변이체, 예컨대 디헥사노일포스파티딜콜린 또는 디펩타노일포스파티딜콜린일 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 "리폴딩"은 디술피드 결합 함유 폴리펩티드를 부적절하게 폴딩되거나 언폴딩된 상태로부터 디술피드 결합과 관련하여 천연 또는 적절하게 폴딩된 입체형태로 변환하는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 기재한다.

[0113] 본원에 사용된 "공동-폴딩"은 구체적으로, 서로 상호작용하여 언폴딩되거나 부적절하게 폴딩된 폴리펩티드를 천연의 적절하게 폴딩된 폴리펩티드로 변환시키는 적어도 2개의 폴리펩티드를 사용하는 리폴딩 과정, 반응 또는 방법을 지칭한다.

[0114] 용어 "보호된"은 특정 반응 조건 하에서 화학적 반응성 관능기의 반응을 방지하는 "보호기" 또는 모이어티의 존재를 지칭한다. 보호기는 보호될 화학 반응성 기의 유형에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 화학적 반응성 기가 아민 또는 히드라지드인 경우, 보호기는 tert-부틸옥시카르보닐 (t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응성 기가 티올인 경우, 보호기는 오르토피리딜디술피드일 수 있다. 화학적 반응성 기가 카르복실산, 예컨대 부탄산 또는 프로피온산, 또는 히드록실 기인 경우, 보호기는 벤질 또는 알킬 기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 광불안정성 기 예컨대 Nvoc 및 MeNvoc를 포함한, 관련 기술분야에 공지된 다른 보호기가 또한 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 다른 보호기가 또한 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다.

[0115] 단지 예로서, 차단/보호기는 하기로부터 선택될 수 있다:



[0116]

[0117] 다른 보호기는 문헌 [Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999]에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0118] 용어 "심혈관계의 장애" 또는 "심혈관 장애"는 예를 들어 하기 장애를 포함한다: 고혈압 (높은 혈압), 말초 및 심장 혈관 장애, 관상동맥 심장 질환, 안정형 및 불안정형 협심증, 심장 발작, 심근 기능부전, 비정상적 심장 리듬 (또는 부정맥), 지속적 허혈성 기능장애 ("동면 심근"), 일시적인 허혈후 기능장애 ("기절 심근"), 심부전, 말초 혈류 장애, 급성 관상동맥 증후군, 심부전, 심장 근육 질환 (심근병증), 심근경색 및 혈관 질환 (혈관 질환).

[0119] 용어 "심부전"은 심부전의 급성 및 만성 징후 둘 다, 뿐만 아니라 질환의 보다 특이적 또는 관련 유형, 예컨대 진행성 심부전, 급성기-후 심부전, 심신성 증후군, 신장 기능 장애 동반 심부전, 만성 심부전, 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 보상성 심부전, 대상부전성 심부전, 우심부전, 좌심부전, 전심부전, 허혈성 심근병증, 확장성 심근병증, 선천성 심장 결손과 연관된 심부전, 심장 판막 결함, 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 승모판 협착, 승모판 기능부전, 대동맥 협착, 대동맥 기능부전, 삼첨판 협착, 삼첨판 기능부전, 폐동맥 협착, 폐동맥판 기능부전, 복합 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 심근 염증 (심근염), 만성 심근염, 급성 심근염, 바이러스성 심근염, 당뇨병성 심부전, 알콜성 심근병증, 심장 축적 장애와 연관된 심부전, 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심부전 악화의 급성기, 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 만성 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 만성 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 심근경색 후 재형성, 협심증, 고혈압, 폐고혈압 및 폐동맥 고혈압을 포함한다.

[0120] 용어 "섬유화 장애"은 특히 하기 질환 및 장애를 포함하는, 섬유증을 특징으로 하는 질환 및 장애를 포괄한다: 간 또는 간의 섬유증, 간 경변증, NASH, 폐 섬유증 또는 폐의 섬유증, 심장 섬유증, 심내막심근 섬유증, 신병증, 사구체신염, 간질성 신섬유증, 당뇨병으로부터 발생한 섬유화 손상, 골수 섬유증 및 유사한 섬유화 장애, 경피증, 반상경피증, 켈로이드, 비대성 반흔형성 (또한 외과적 절차 후), 모반, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 및 결합 조직의 장애 (예를 들어 사르코이드증).

[0121] 용어 "렐락신-연관 장애" 및 "렐락신과 연관된 질환"은, 신체 내의 렐락신 수준의 조정, 예컨대 혈청 렐락신 단백질 수준의 증가에 의해 예방, 치료, 완화되거나 또는 달리 영향을 받을 수 있는 질환 및 장애를 포괄한다. 렐락신-연관 장애는 본원에 기재된 심혈관계의 장애 및 섬유화 장애를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 본원에 제시된 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 1개 이상의 원자가 자연에서 통상적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자에 의해 대체된 동위원소-표지 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 플루오린 및 염소의 동위원소, 예컨대 각각 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 35S, 18F, 36Cl을 포함한다. 본원에 기재된 특정 동위원소-표지 화합물, 예를 들어 방사성 동위원소, 예컨대 3H 및 14C가 혼입되는 것이 약물 및/또는 기질 조직 분포 검정에 유용할 수 있다. 추가로, 중수소, 즉 2H와 같은 동위원소로의 치환은 더 큰 대사 안정성으로

부터 생성된 특정의 치료 이점, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요건을 제공할 수 있다.

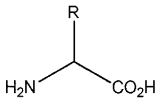
[0123] I. 개관

[0124] PK 인핸서에 연결된 변형된 렐락신 분자가 본 개시내용에 제공된다. 예시적인 실시양태는, 다른 변형된 또는 야생형 렐락신 폴리펩티드와 비교하여 증가된 생체내 반감기, 감소된 신장 공포 형성, 증가된 신장 혈류, 보다 높은 용해도, 감소된 응집, 보다 낮은 점도, 증가된 제조성으로부터 선택된 적어도 1종의 유리한 특성을 나타내는 것으로 입증된다.

[0125] 한 측면에서, 본 개시내용은 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제공하며, 여기서

[0126] (a) 변형된 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하며, 이는 A 쇄 잔기 1, A 쇄 잔기 2, A 쇄 잔기 5, A 쇄 잔기 13, A 쇄 잔기 18, B 쇄 잔기 5, B 쇄 잔기 7, 및 B 쇄 잔기 25로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고, 임의로 상기 렐락신 A 쇄 및/또는 상기 렐락신 B 쇄에서 최대 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 갖고;

[0127] (b) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 하기 구조를 가지며:

[0128] 

[0129] 여기서 R 기는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린에서 발견되는 측쇄 이외의 다른 임의의 치환기이고;

[0130] (c) 상기 비-자연 코딩 아미노산은 2 내지 30개 아미노산의 펩티드 성분 및 반감기 연장 모이어티를 포함하는 약동학적 인핸서에 연결된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고 임의로 최대 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 갖는 서열식별번호: 4를 포함할 수 있다. 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고 임의로 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 서열식별번호: 4를 포함할 수 있다. 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 임의로 최대 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있다. 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 임의로 1개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있다. 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 잔기 1에서 상기 비-자연 코딩 아미노산으로 치환된 서열식별번호: 4를 포함할 수 있고, 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함할 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 페닐알라닌 유도체를 포함할 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 파라-치환된, 오르토-치환된, 또는 메타-치환된 페닐알라닌으로부터 선택될 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 카르보닐 기, 아미노옥시 기, 히드라지드 기, 히드라진 기, 세미카르바지드 기, 아지드 기, 또는 알킨 기를 포함하는 파라-치환된, 오르토-치환된, 또는 메타-치환된 페닐알라닌으로부터 선택될 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함할 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 상기 약동학적 인핸서에 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 비-자연 코딩 아미노산은 옥심 연결 또는 트리아졸 연결, 예를 들어, 옥심 연결을 통해 상기 약동학적 인핸서에 연결될 수 있다.

[0133] 일부 실시양태에서, 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 35를 포함할 수 있고, 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있고, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 또는 B 쇄는 임의로 최대 2개의 추가의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 가질 수 있다. 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호: 35에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 35에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 95% 아미노산 서열

동일성을 가질 수 있다. 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 35를 포함할 수 있고, 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 35를 포함할 수 있고, 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 6을 포함할 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 상기 펩티드 성분은 1 내지 25개의 아미노산, 예를 들어, 2 내지 20개의 아미노산, 3 내지 10개의 아미노산, 또는 4 내지 8개의 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 펩티드 성분은 Glu, Glu^{γ}, GGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 139), DRDDRD (서열식별번호: 102), KKKKKK-Glu^{γ} (서열식별번호: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^{γ} (서열식별번호: 104), GGGEEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 105), EEEGGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 106), KKKGGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 107), GETGSSGEGT-Glu^{γ} (서열식별번호: 108), GGGKKK-Glu^{γ} (서열식별번호: 109), GSHHHHHGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu^{γ} (서열식별번호: 111), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^{γ} (서열식별번호: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^{γ} (서열식별번호: 113), KKKSGGSGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 118), KKSGGSGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 114), KKSGGSGG-Glu^{α} (서열식별번호: 115), KKSAGSAG-Glu^{γ} (서열식별번호: 116), KSGGSGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 117), KKSGGSGGEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 119), dKdKdKdKdKdK-Glu^{γ} (서열식별번호: 120), EESGGSGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 121), GSGSGSGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 123), EEEGGG-dGlu^{γ} (서열식별번호: 128), EGGGGSK-Glu^{γ} (서열식별번호: 130), EEEEEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 131), EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 133), EEEEPEEEEPEEEEPEEGGG (서열식별번호: 135), EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 136), KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu^{γ} (서열식별번호: 137), EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu^{γ} (서열식별번호: 138), KK-Glu^{γ} (서열식별번호: 140), Glu^{γ}, KGPKGP-Glu^{γ} (서열식별번호: 146), SGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 147), KGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 148), KGGGSE-Glu^{γ} (서열식별번호: 149), GSPGSP-Glu^{γ} (서열식별번호: 150), GGGGP-Glu^{γ} (서열식별번호: 151), EGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 152), EGGGP-Glu^{γ} (서열식별번호: 153), KGPGSE-Glu^{γ} (서열식별번호: 154), 스페르민-Glu^{γ}, 또는 KKGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 156)를 포함할 수 있다.

[0135] 상기 펩티드 성분은 GGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 139), DRDDRD (서열식별번호: 102), KKKKKK-Glu^{γ} (서열식별번호: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^{γ} (서열식별번호: 104), GGGEEE-Glu^{γ} (서열식별번호: 105), EEEGGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 106), KKKGGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 107), GGGKKK-Glu^{γ} (서열식별번호: 109), GSHHHHHGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^{γ} (서열식별번호: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^{γ} (서열식별번호: 113), 또는 KSGGSGG-Glu^{γ} (서열식별번호: 117)를 포함할 수 있다.

[0136] 상기 펩티드 성분은 Glu^{γ}를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 성분은 GGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 139)를 포함할 수 있다.

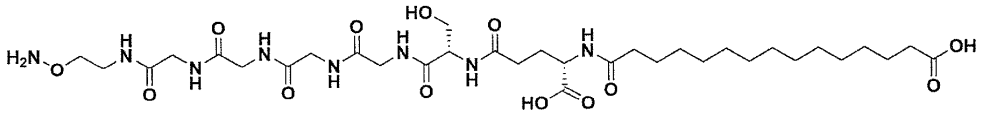
[0137] 예시적인 실시양태에서, 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 이는 A 쇄 잔기 1에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고, 여기서 상기 비-자연 코딩 아미노산은 상기 약동학적 인핸서에 연결되고, 상기 약동학적 인핸서는 펩티드 성분 GGGGS-Glu^{γ} (서열식별번호: 139)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 성분은 예를 들어 옥심 연결을 통해 상기 비-자연 코딩 아미노산에 공유 연결될 수 있다.

[0138] 예시적인 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 지방산 또는 그의 유도체를 포함할 수 있고, 여기서 지방산 또는 그의 유도체는 펩티드 성분에 공유 연결될 수 있다. 상기 반감기 연장 모이어티는 포화 지방산 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다. 상기 반감기 연장 모이어티는 카르복실산으로 종결된 지방산을 포함할 수 있다. 상기 반감기 연장 모이어티는 화학식 I: -Cn-COOH (화학식 I)의 지방산을 포함할 수 있고, 여기서 n은 10 내지 18, 예컨대 12 내지 17, 또는 13, 14, 15, 또는 16일 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학식 I의 -Cn-은 제1 카르보닐 탄소 및 $-(CH_2)_{n-1}-$을 포함할 수 있다. 예를 들어, -C13-은 $-(C=O)-(CH_2)_{12}-$일 수 있고; -C14-

는 -(C=O)-$(CH_2)_{13}$-일 수 있고; -C15-는 -(C=O)-$(CH_2)_{14}$-일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산의 제1 카르보닐 탄소는 임의로 아미드 결합을 통해 (감마) Glu 잔기에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산의 제1 카르보닐 탄소는 아미드 결합을 통해 감마 Glu 잔기에 결합될 수 있다.

[0139] 추가의 예시적인 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 -C14-COOH를 포함할 수 있다.

[0140] 추가의 예시적인 실시양태에서, 상기 약동학적 인핸서는 구조:



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

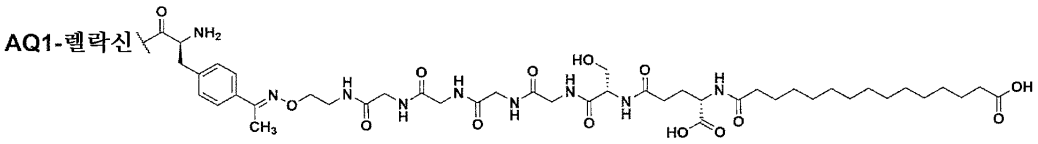
[0141] (화학식 II)

[0142] 를 포함할 수 있고, 여기서 화학식 II의 아미노옥시 기는 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드 내의 비-천연 아미노산에, 예를 들어 옥심 연결을 통해 연결된다.

[0143] 추가의 예시적인 실시양태에서, 상기 반감기 연장 모이어티는 아미드 결합을 통해 상기 펩티드 성분에 접합될 수 있다.

[0144] 추가의 예시적인 실시양태에서, 상기 렐락신 폴리펩티드는 서열식별번호: 4의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 이는 A 쇄 잔기 1에서 비-자연 코딩 아미노산으로 치환되고; 여기서 상기 비-자연 코딩 아미노산은 파라-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하고; 여기서 상기 비-자연 코딩 아미노산은 GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)를 포함하는 펩티드 성분; 및 -C14-COOH, 예컨대 -(C=O)-$(CH_2)_{13}$-COOH를 포함하는 반감기 연장 모이어티를 포함하는 상기 약동학적 인핸서에 연결된다.

[0145] 추가 실시양태에서, 개시내용은 구조:

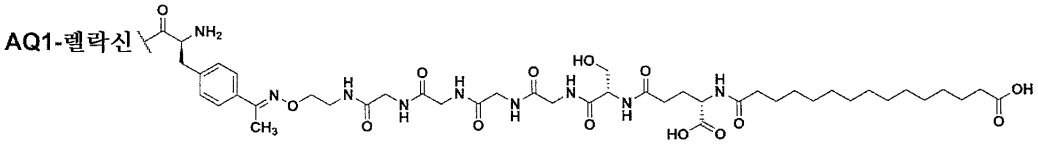


[0146] (화학식 III)

[0147] 를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제공하며,

[0148] 여기서 상기 AQ1-렐락신은 서열식별번호: 35에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 화학식 III에 도시된 파라-아세틸-L-페닐알라닌은 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치한다. 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 35에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 상기 렐락신 B 쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 상기 AQ1-렐락신은 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0149] 추가 실시양태에서, 개시내용은 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드 및 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하는 렐락신 접합체 "AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$(서열식별번호: 139) -C14-COOH"를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 파라-아세틸-L-페닐알라닌은, 화학식 III에 도시된 바와 같이 PK 인핸서 GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)-C14-COOH에 연결될 수 있다.



[0150] (화학식 III)

[0151] 추가 실시양태에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 도 8에 제시된 구조를 포함한다.

[0152] 추가 실시양태에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 도 9에 제시된 구조를 포함한다.

[0153] 예시적인 실시양태에서, 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 생물학적 활성일 수 있다. 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 렐락신과 연관된 1종 이상의 질환 또는 상태의 치료를 위해 치료상 유효할 수 있다. 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 비교 화합물, 예컨대 AQ1-20 kDa PEG (20 kDa의 평균 MW를 갖는 PEG에 접합된 AQ1 렐락신)와 비교하여 감소된 신장 공포 형성을 나타낼 수 있다. 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 비교 화합물, 예컨대 AQ1-20 kDa PEG와 비교하여 신기능 장애를 나타내지 않거나 감소된 신기능 장애를 나타낼 수 있다. 상기 신기능은 추정되는 사구체 여과율, 크레아틴 클리어런스, 인슐린 사구체 여과율 또는 동위원소 사구체 여과율 중 1종 이상을 결정함으로써 측정될 수 있다.

[0154] 예시적인 실시양태에서, 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 감소된 신장 혈류를 나타내지 않고/거나, 투여 후에, 신장 혈류를 증가시킬 수 있을 수 있다. 신장 혈류는 파라-아미노히푸레이트 클리어런스를 결정함으로써 측정될 수 있다.

[0155] 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드는 비교 화합물, 예컨대 야생형 렐락신과 비교하여, 예를 들어 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 20-배, 적어도 30-배, 또는 적어도 50-배만큼 증가된, 증가된 생체내 반감기를 나타낼 수 있다.

[0156] 또 다른 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0157] 또 다른 측면에서, 개시내용은 렐락신-연관 장애의 치료 또는 예방을 위한 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드의 유효량 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0158] 또 다른 측면에서, 개시내용은 렐락신과 연관된 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 렐락신과 연관된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0159] 또 다른 측면에서, 개시내용은 심혈관 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 심혈관 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 심혈관 질환은 관상 동맥 질환, 심장 발작, 부정맥, 심부전, 심근병증, 및 혈관 질환으로부터 선택될 수 있다.

[0160] 또 다른 측면에서, 개시내용은 심부전의 증상의 치료, 예방 또는 완화를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 심부전의 증상을 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공한다. 상기 심부전은 진행성 심부전, 심신성 증후군, 신장 기능 장애 동반 심부전, 만성 심부전, 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 급성 심부전, 급성기-후 심부전, 보상성 심부전, 대상부전성 심부전, 우심부전, 좌심부전, 전심부전, 허혈성 심근병증, 확장성 심근병증, 선천성 심장 결손과 연관된 심부전, 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 복합 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 당뇨병성 심부전, 알콜성 심근병증, 심장 축적 장애와 연관된 심부전, 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심근경색 후 재형성, 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 협심증, 고혈압, 폐고혈압, 및 폐동맥 고혈압으로부터 선택될 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 상기 심부전은 만성 심부전, 급성 심부전, 급성기-후 심부전, 만성 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 만성 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심근경색 후 재형성, 협심증, 고혈압, 폐고혈압 및 폐동맥 고혈압으로부터 선택될 수 있다.

[0162] 일부 실시양태에서, 상기 심부전은 급성기-후 심부전, 진행성 심부전, 심신성 증후군, 및 신장 기능 장애 동반 심부전으로부터 선택될 수 있다.

[0163] 상기 치료 방법은 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드와 조합하여, 공동으로 또는 순차적으로 ACE 억제제, β-차단제, 이뇨제, 미네랄로코르티코이드 수용체 길항제, 리아노딘 수용체 조정제, SERCA2a 활성화제, 레닌 억제제, 칼슘 채널 차단제, 아데노신 A1 수용체 효능제, 부분 아데노신 A1 수용체, 도파민 β-히드록실라제 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 세포 신호전달 경로 선택에 대해 편향된 효능작용을 갖는 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 II 수용체 길항제 및 네프릴리신 효소 억제제의 조합물, 네프릴리신 효소 억제제, 가용성 구

아닐레이트 시클라제 활성화제, 미오신 ATPase 활성화제, rho-키나제 1 억제제, rho-키나제 2 억제제, 아펠린 수용체 효능제, 니트록실 공여 화합물, 칼슘-의존성 키나제 II 억제제, 항섬유화제, 갈렉틴-3 억제제, 바소프레신 수용체 길항제, FPR2 수용체 조정제, 나트륨이뇨 펩티드 수용체 효능제, 일시적 수용체 전위 바닐로이드-4 채널 차단제, 항부정맥제, I_f "퍼니 전류" 채널 차단제, 니트레이트, 디기탈리스 화합물, 수축촉진제, 및 β-수용체 효능제, 세포 막 재밀봉제 예를 들어 폴록사머 188, 항고지혈증제, 혈장 HDL-상승제, 항고콜레스테롤혈증제, 콜레스테롤 생합성 억제제 (예컨대 HMG CoA 리덕타제 억제제), LXR 효능제, FXR 효능제, 프로부콜, 랄록시펜, 니코틴산, 니아신아미드, 콜레스테롤 흡수 억제제, 담즙산 격리제, 음이온 교환 수지, 4급 아민, 콜레스티라민, 콜레스티폴, 저밀도 지단백질 수용체 유도제, 클로피브레이트, 페노피브레이트, 베자피브레이트, 시프로피브레이트, 겜피브로질, 비타민 B6, 비타민 B12, 항산화제 비타민, 항당뇨병제, 혈소판 응집 억제제, 피브리노겐 수용체 길항제, 아스피린 및 피브린산 유도체, PCSK9 억제제, 아스피린, 및 P2Y12 억제제 예컨대 클로피도그렐로부터 선택된 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0164] 또 다른 측면에서, 개시내용은 섬유증과 연관된 질환의 증상의 치료, 예방 또는 완화를 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 섬유증과 연관된 질환의 증상을 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공한다. 섬유증과 연관된 상기 질환은 심장, 폐, 신장, 골수 또는 간의 섬유증, 피부과적 섬유증, 또는 섬유화 안장애를 포함할 수 있다. 섬유증과 연관된 상기 질환은 간 섬유증, 비알콜성 지방간염 (NASH), 간경변증, 간경변증-전증, 미만성 실질 폐 질환, 낭성 섬유증, 폐 섬유증, 진행성 거대 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 주사 섬유증, 신섬유증, 만성 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 초점성 분절성 사구체경화증, 막성 신병증, IgA 신병증, 골수섬유증, 심부전, 대사 심부전, 심장 섬유증, 백내장 섬유증, 백내장, 안구 반흔형성, 췌장 섬유증, 피부 섬유증, 장 섬유증, 장 협착, 심내막심근 섬유증, 심방 섬유증, 종격 섬유증, 크론병, 복막후 섬유증, 켈로이드, 신원성 전신 섬유증, 경피증, 전신 경화증, 관절섬유증, 페이로니 증후군, 듀피트렌 구축, 당뇨병성 신경병증, 유착성 피막염, 알콜성 간 질환, 지방간질환, 바이러스성 간염, 담관계 질환, 원발성 혈색소증, 약물-관련 간경변증, 잠재성 간경변증, 윌슨병, 알파 1-항트립신 결핍, 간질성 폐 질환 (ILD), 인간 섬유화 폐 질환, 황반 변성, 망막망막병증, 유리체 망막병증, 심근 섬유증, 그레이브스 안병증, 약물 유발 맥각중독, 심혈관 질환, 아테롬성동맥경화증/재협착, 비대성 반흔, 원발성 또는 특발성 골수섬유증, 염증성 장 질환, 및 콜라겐성 결장염으로부터 선택될 수 있다.

[0165] 섬유증과 연관된 질환을 치료하는 상기 방법은 상기 변형된 렐락신 폴리펩티드와 조합하여, 공동으로 또는 순차적으로, 상기 환자에게 적어도 1종의 항섬유증제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 항섬유증제는 닌테다닙, 피르페니돈, LPA1 길항제, LPA1 수용체 길항제, GLP1 유사체, 트랄로키누맙 (IL-13, 아스트라제네카), 비스모데깁 (헷지호그 길항제, 로슈), PRM-151 (펜트락신-2, TGF 베타-1, 프로메디올), SAR-156597 (이중특이적 Mab IL-4&IL-13, 사노피), 심투주맙 ((항-리실 옥시다제-유사 2 (항-LOXL2) 항체, 길리아드), CKD-942, PTL-202 (PDE inh./펜톡시필린/NAC 경구 제어. 방출, 퍼시픽 테르.), 오미팔리십 (경구 PI3K/mTOR 억제제, GSK), IW-001 (경구 sol. 소 제V형 콜라겐 mod., 이뮨웍스), STX-100 (인테그린 알파 V/ 베타-6 ant, 스트로메딕스/ 바이오젠), 액티뮨 (IFN 감마), PC-SOD (미디스마제; 흡입, LTT 바이오-파마 / CKD 팜), 레브리키주맙 (항-IL-13 SC 인간화 mAb, 로슈), AQX-1125 (SHIP1 활성화제, 아퀴녹스), CC-539 (JNK 억제제, 셀진), FG-3019 (피브로젠), SAR-100842 (사노피), 및 오베티콜산 (OCA 또는 INT-747, 인터셉트)으로부터 선택될 수 있다.

[0166] 또 다른 측면에서, 개시내용은 신부전의 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 신부전을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0167] 또 다른 측면에서, 개시내용은 신기능의 개선, 안정화 또는 회복을 필요로 하는 환자에게 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 신기능을 개선, 안정화 또는 회복시키는 방법을 제공한다.

[0168] 또 다른 측면에서, 개시내용은 (a) 렐락신 A 쇄 및 렐락신 B 쇄를 포함하는 폴리펩티드를 제공하는 단계이며, 여기서 상기 폴리펩티드는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 비-자연 코딩 아미노산을 상기 약동학적 인핸서에 연결시키는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 렐락신 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은, 예를 들어 상기 비-자연 코딩 아미노산을 약동학적 인핸서의 펩티드 성분에 연결시키는 옥심 연결에 의해 상기 약동학적 인핸서에 연결될 수 있다. 상기 옥심 연결은 카르보닐 기 및 아미노옥시 기의 반응에 의해 형성될 수 있다. 상기 카르보닐 기는 상기 비-자연 코딩 아

미노산의 치환기일 수 있고, 상기 아미노옥시 기는 상기 약동학적 인핸서의 구성성분일 수 있다. 상기 아미노옥시 기는 상기 비-자연 코딩 아미노산의 치환기일 수 있고, 상기 카르보닐 기는 상기 약동학적 인핸서의 구성성분, 예를 들어 상기 약동학적 인핸서의 펩티드 성분의 구성성분일 수 있다. 상기 비-자연 코딩 아미노산은 상기 폴리펩티드 내에 리보솜에 의해 혼입될 수 있다.

[0169] II. 개시된 변형된 렐락신 폴리펩티드와 함께 사용하기 위한 일반적 재조합 핵산 및 방법

[0170] 본 개시내용의 실시양태에서, 관심 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 단리되고, 클로닝되고, 종종 재조합 방법을 사용하여 변경될 수 있다. 이러한 실시양태는 예를 들어 비제한적으로 단백질 발현을 위해 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드로부터 유래된 변이체, 유도체, 또는 다른 서열의 생성 동안 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 이종 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에서의 DNA 코돈 용법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 기술을 사용하는 이. 콜라이 또는 포유동물 세포 (예를 들어, CHO) 발현에 대하여 최적화될 수 있다.

[0171] 렐락신 A 쇄 (서열식별번호: 10), 렐락신 B 쇄 (서열식별번호: 11), 렐락신 A 및 B 쇄 (서열식별번호: 12), 및 리더 서열 (서열식별번호: 13-14)을 코딩하는 예시적인 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다.

[0172] 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 4, 5, 6, 35, 36, 또는 37에 제시된 아미노산 서열을 갖는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모 폴리펩티드의 아미노산 서열에 기초하여 합성될 수 있고, 이어서 뉴클레오티드 서열은 적절한 아미노산 잔기(들)의 도입 (즉, 혼입 또는 치환) 또는 제거 (즉, 결실 또는 치환)가 일어나도록 변화될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 통상적인 방법에 따라 부위-지정 돌연변이유발에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하는 것에 의한 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 목적하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 기초하여, 및 바람직하게는 재조합 폴리펩티드가 생산될 숙주 세포에서 바람직한 코돈을 선택하여 설계된다.

[0173] 추가적으로, 비-자연 코딩 아미노산을 코딩하는 선택자 코돈, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 서열 내로 혼입될 수 있다.

[0174] 개시내용은 또한 비천연 아미노산을 직교 tRNA/RS 쌍을 통해 생체내 혼입하기 위한 진핵 숙주 세포, 비-진핵 숙주 세포, 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 개시내용의 폴리뉴클레오티드 또는 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 구축물, 예를 들어 비제한적으로 개시내용의 벡터로 유전자 조작되고 (형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 상기 벡터는 예를 들어 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있다. 예를 들어, 직교 tRNA, 직교 tRNA 신테타제, 및 유도체화될 단백질에 대한 코딩 영역은 목적하는 숙주 세포에서 기능적인 유전자 발현 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 파지, 박테리아, 바이러스, 네이키드 폴리뉴클레오티드, 또는 접합된 폴리뉴클레오티드의 형태일 수 있다. 벡터는 표준 방법에 의해 세포 및/또는 미생물에 도입될 수 있다.

[0175] III. 선택자 코돈

[0176] 본 개시내용의 선택자 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 프레임워크를 확장시킨다. 예를 들어, 선택자 코돈은 고유한 3개 염기 코돈, 넌센스 코돈, 예컨대 정지 코돈, 예를 들어 비제한적으로 앰버 코돈 (UAG), 오커 코돈, 또는 오팔 코돈 (UGA), 비천연 코돈, 4개 이상 염기 코돈, 희귀 코돈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 변형된 렐락신 폴리펩티드의 적어도 일부를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드 내에, 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 초과를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 목적하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 수 있는 선택자 코돈의 수에는 다양한 범위가 존재한다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 매우 명백하다.

[0177] 한 실시양태에서, 방법은 생체내에서 1개 이상의 비천연 (즉, 비-자연 코딩) 아미노산을 혼입하기 위해 정지 코돈인 선택자 코돈을 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, UAG를 비제한적으로 포함하는 정지 코돈을 인식하는 O-tRNA가 생산되고, O-RS에 의해 목적하는 비천연 아미노산으로 아미노아실화된다. 이러한 O-tRNA는 자연 발생 숙주의 아미노아실-tRNA 신테타제에 의해서는 인식되지 않는다. 통상적인 부위-지정 돌연변이유발이 관심 폴리펩티드의 관심 부위에 TAG를 비제한적으로 포함하는 정지 코돈을 도입하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sayers, J.R., et al. (1988),Nucleic Acids Res, 16:791-802]을 참조한다. O-RS, O-tRNA 및 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 생체내 조합되면, UAG 코돈에 대한 반응으로 비천연 아미노산이 혼입되어 명시된 위치에

서 비천연 아미노산을 함유하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0178] 비천연 아미노산의 생체내 혼입은 진핵 숙주 세포의 유의한 교란 없이 수행될 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효율은 앰버 억제자 tRNA를 포함하나 이에 제한되지는 않는 O-tRNA 및 진핵 방출 인자 (eRF를 포함하나 이에 제한되지는 않음) (정지 코돈에 결합하여 리보솜으로부터 성장하는 펩티드의 방출을 개시함) 사이의 경쟁에 좌우되기 때문에, 억제 효율이, O-tRNA 및/또는 억제자 tRNA의 발현 수준 증가를 포함하나 이에 제한되지는 않는 것에 의해 조정될 수 있다.

[0179] 비천연 아미노산은 또한 희귀 코돈으로 코딩될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 단백질 합성 반응에서의 아르기닌 농도가 감소할 때, 희귀 아르기닌 코돈 AGG는 알라닌으로 아실화된 합성 tRNA에 의한 Ala의 삽입을 위해 효율적인 것으로 입증되었다. 예를 들어, 문헌 [Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993)]을 참조한다. 이러한 경우에, 합성 tRNA는 에스케리키아 콜라이에서 소수 종으로서 존재하는, 자연 발생 tRNAArg와 경쟁한다.

[0180] 선택자 코돈은 또한 4개 이상의 염기 코돈, 예컨대 4, 5, 6개 또는 그 초과의 염기 코돈을 포함하나 이에 제한되지는 않는 연장된 코돈을 포함한다. 4 염기 코돈의 예는 AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 5 염기 코돈의 예는 AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0181] 한 실시양태에서, 희귀 코돈 또는 넌센스 코돈에 기초한 연장된 코돈이 본 개시내용에서 사용될 수 있고, 이는 다른 원치않는 부위에서의 미스센스 번역초과 및 프레임시프트 억제를 감소시킬 수 있다.

[0182] 주어진 시스템에 대하여, 선택자 코돈은 또한 천연 3 염기 코돈 중 하나를 포함할 수 있고, 여기서 내인성 시스템은 천연 염기 코돈을 사용하지 않는다 (또는 거의 사용하지 않음). 예를 들어, 이는 천연 3 염기 코돈을 인식하는 tRNA가 결여된 시스템, 및/또는 3 염기 코돈이 희귀 코돈인 시스템을 포함한다.

[0183] 관심 단백질 또는 폴리펩티드, 예컨대 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고 본원에 기재된 방법을 사용하여, 예를 들어 비천연 아미노산의 혼입을 위한 1개 이상의 선택자 코돈을 포함하도록 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 관심 단백질에 대한 핵산이 1개 이상의 선택자 코돈을 포함하도록 돌연변이되어, 1개 이상의 비천연 아미노산의 혼입을 제공한다. 본 개시내용은, 예를 들어 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 임의의 단백질의 돌연변이체, 변형체를 비제한적으로 포함하는 임의의 이러한 변이체를 포함한다.

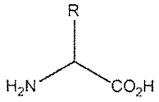
[0184] 관심 단백질, 예컨대 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 폴리펩티드의 임의의 목적하는 위치에 시스테인을 도입하도록 용이하게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 중합체, 단백질, 또는 매우 다양한 다른 분자를 관심 단백질에 도입하기 위해 널리 사용된다.

[0185] IV. 비-자연 코딩 아미노산

[0186] 매우 다양한 비-자연 코딩 아미노산이 본 개시내용에서 사용하기에 적합하다. 임의의 개수의 비-자연 코딩 아미노산이 변형된 렐락신 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입된 비-자연 코딩 아미노산은 실질적으로 유전적으로-코딩된 20종의 통상의 아미노산 (즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린)에 대하여 화학적으로 불활성이다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 20종의 통상의 아미노산에서는 발견되지 않는 관능기와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응하여 안정한 접합체를 형성하는 측쇄 관능기 (아지도, 케톤, 알데히드 및 아미노옥시 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함한다. 예를 들어, 아지도 관능기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 중합체 또는 PK 연장제와 반응하거나, 또는 대안적으로 알킨 모이어티를 함유하는 제2의 폴리펩티드와 반응하여, 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 생성물을 형성하는 아지드 관능기와 알킨 관능기의 선택적 반응으로부터 초래되는 안정한 접합체를 형성할 수 있다.

[0187] 알파-아미노산의 통상의 구조식은 하기와 같이 예시된다 (화학식 IV):

IV

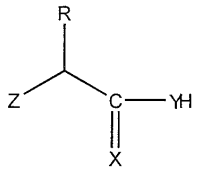
[0188] 

[0189] 비-자연 코딩 아미노산은 전형적으로 상기에 예시된 화학식을 가지나, 여기서 R 기가 20종의 천연 아미노산에 사용되는 것 이외의 다른 임의의 치환기인 임의의 구조이고, 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드에 사용하기에 적합할 수 있다. 본 개시내용의 비-자연 코딩 아미노산은 전형적으로 측쇄의 구조만이 천연 아미노산과 상이하므로, 비-자연 코딩 아미노산은 자연 발생 폴리펩티드에서 형성되는 것과 동일한 방식으로, 예를 들어 비제한적으로 천연 또는 비-자연 코딩된 다른 아미노산과 아미드 결합을 형성한다. 그러나, 비-자연 코딩 아미노산은 이들을 천연 아미노산과 구분하는 측쇄 기를 갖는다. 예를 들어, R은 임의로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 히드록실-, 히드라진, 시아노-, 할로-, 히드라지드, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 술포닐-, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로시클릭, 에논, 이민, 알데히드, 에스테르, 티오산, 히드록실아민, 아미노 기 등 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

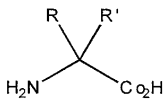
[0190] 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있고 PK 연장제 및 중합체와의 반응에 유용한 예시적인 비-자연 코딩 아미노산의 예는 카르보닐, 아미노옥시, 히드라진, 히드라지드, 세미카르바지드, 아지드 및 알킨 반응성 기를 갖는 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린을 포함한다.

[0191] 본원에 제공된 많은 비-자연 코딩 아미노산이 예를 들어, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) (미국 미주리주 세인트루이스), 노바바이오켐(Novabiochem) (독일 다름슈타트 소재의 이엠디 바이오사이언시스(EMD Biosciences)의 지사), 또는 펩테크(Peptech) (미국 매사추세츠주 버링턴)로부터 상업적으로 입수가능하다. 상업적으로 입수가능하지 않는 것들은 본원에 제공된 바와 같이 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 임의로 합성된다. 유기 합성 기술에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Organic Chemistry by Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)]을 참조한다. 또한, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,045,337 및 7,083,970을 참조한다. 신규 측쇄를 함유하는 비천연 아미노산에 더하여, 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산은 또한, 화학식 V 및 VI의 구조에 의해 예시되는 바와 같은 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 변형된 백본 구조를 임의로 포함하며:

V



VI



[0192]

[0193] 여기서 Z는 전형적으로 OH, NH_2, SH, NH-R', 또는 S-R'를 포함하고; 동일하거나 또는 상이할 수 있는 X 및 Y는 전형적으로 S 또는 O를 포함하고, 임의로 동일하거나 또는 상이한 R 및 R'는 전형적으로, 화학식 I을 갖는 비천연 아미노산에 대하여 상기에 기재된 R 기의 구성성분과 동일한 목록과 수소로부터 선택된다. 예를 들어, 본 개시내용의 비천연 아미노산은 화학식 V 및 VI에 의해 예시되는 바와 같이 아미노 또는 카르복실 기에서 치환을 임의로 포함한다. 이러한 유형의 비천연 아미노산은 통상의 20종의 천연 아미노산에 상응하는 측쇄 또는 비천연 측쇄를 갖는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는, α-히드록시산, α-티오산, α-아미노티오카르복실레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, α-탄소에서의 치환은 임의로 L, D, 또는 α-α-이치환 아미노산, 예컨대 D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-티로신, 아미노부티르산 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 구조적 대안은 시클릭 아미노산, 예컨대 프롤린 유사체 뿐만 아니라, 3, 4, 6, 7, 8 및 9원의 고리 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산, 예컨대 치환된 β-알라닌 및 γ-아미노 부티르산을 포함한다.

[0194] 많은 비천연 아미노산은 천연 아미노산, 예컨대 티로신, 글루타민, 페닐알라닌 등에 기초하며, 본 개시내용에서 사용하기에 적합하다. 티로신 유사체는 파라-치환된 티로신, 오르토-치환된 티로신, 및 메타-치환된 티로신을 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 여기서 치환된 티로신은, 예를 들어 비제한적으로 케토 기 (아세틸 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 벤조일 기, 아미노 기, 히드라진, 히드록시아민, 티올 기, 카르복시 기, 이소프로필 기, 메틸 기, C_6 - C_{20} 직쇄 또는 분지형 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸 기, 폴리에테르 기, 니트로 기, 알키닐 기 등을 포함한다. 또한, 다중 치환된 아릴 고리도 고려된다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 글루타민 유사체는 α-히드록시 유도체, γ-치환된 유도체, 시클릭 유도체, 및 아미드 치환된 글루타민 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 페닐알라닌 유사체의 예는 파라-치환된 페닐알라닌, 오르토-치환된 페닐알라닌, 및 메타-치환된 페닐알라닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 여기서 치환기는 히드록시 기, 메톡시 기, 메틸 기, 알릴 기, 알데히드, 아지도, 아이오도, 브로모, 케토 기 (아세틸 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 벤조일, 알키닐 기 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용에서 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산의 구체적 예는 p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ-세린, L-도파, 플루오린화된 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-아이오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, 및 p-프로파르길옥시-페닐알라닌 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0195] 한 실시양태에서, 비천연 아미노산 (예컨대 p-아세틸-L-페닐알라닌)을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 조성물이 제공된다. p-아세틸-L-페닐알라닌을 포함하고, 비제한적으로 단백질 및/또는 세포를 포함하는 다양한 조성물이 또한 제공된다. 한 측면에서, p-아세틸-L-페닐알라닌으로서 비천연 아미노산을 포함하는 조성물은 직교 tRNA를 추가로 포함한다. 비천연 아미노산은 직교 tRNA에 결합될 수 있고 (공유 결합을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 아미노-아실 결합을 통해 직교 tRNA에 공유 결합되거나, 직교 tRNA의 말단 리보스 당의 3'OH 또는 2'OH에 공유 결합되는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0196] 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 8,735,539, 표제 "비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 렐락신 폴리펩티드"에 기재된 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있다.

[0197] V. 비-천연 아미노산의 구조 및 합성

[0198] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 옥심 결합 또는 연결에 의해, 예를 들어 지방산을 포함하는 PK 연장제에 연결된 변형된 렐락신 폴리펩티드을 제공한다. 많은 유형의 비-자연 코딩 아미노산이 옥심 결합의 형성에 적합하다. 이는 카르보닐, 디카르보닐, 카르보닐-유사, 차폐된 카르보닐, 보호된 카르보닐, 또는 히드록실아민 기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 아미노산, 그의 구조 및 합성은, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 8,012,931 및 8,735,539에 기재되어 있다.

[0199] 히드록실아민-함유 아미노산을 포함한 비-자연 코딩 아미노산의 예시적인 구조 및 합성 방법이, 예를 들어 미국 특허 번호 7,332,571, 미국 특허 공개 번호 2006/0194256, 2006/0217532, 및 2006/0217289 및 WO 2006/069246에 개시된 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0200] 비-자연 코딩 아미노산의 화학적 합성

[0201] 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 많은 비천연 아미노산이 예를 들어 시그마 (미국) 또는 알드리치 (미국 위스콘신주 밀워키)로부터 상업적으로 입수가능하다. 상업적으로 입수가능하지 않는 것들은 본원에 제공된 바와 같이 또는 다양한 공개물에 제공된 바와 같이 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 임의로 합성된다.

[0202] A. 카르보닐 반응성 기

[0203] 카르보닐 반응성 기를 갖는 아미노산은, 특히 친핵성 첨가 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자 (PEG 또는 다른 수용성 분자 예컨대 펩티드 성분을 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 연결시키는 다양한 반응을 가능하게 한다.

[0204] p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카르보닐-함유 아미노산도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 유사하게 제조될 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 반응성 카르보닐 관능기를

생성하도록 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응에 유용한 알데히드 관능기는 인접한 아미노 및 히드록실 기를 갖는 관능기로부터 생성될 수 있다.

[0206] 본 개시내용에서, 인접한 히드록실 및 아미노 기를 갖는 비-자연 코딩 아미노산은 "차폐된" 알데히드 관능기로서 폴리펩티드에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 5-히드록시리신은 엡실론 아민에 인접한 히드록실 기를 갖는다. 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 전형적으로 폴리펩티드 내의 다른 부위에서의 산화를 피하기 위해 온화한 조건 하에서의 몰 과량의 소듐 메타퍼아이오데이트의 첨가를 포함한다. 산화 반응의 pH는 전형적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 약 1.5배 몰 과량의 소듐 메타퍼아이오데이트를 폴리펩티드의 완충 용액에 첨가한 후에, 암실에서 약 10분 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,423,685를 참조하고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0207] 카르보닐 관능기는 수용액 중 온화한 조건 하에 히드라진-, 히드라지드-, 히드록실아민-, 또는 세미카르바지드-함유 시약과 선택적으로 반응하여, 각각 상응하는 히드라존, 옥심, 또는 세미카르바존 연결을 형성할 수 있고, 이들은 생리학적 조건 하에 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 또한, 카르보닐 기의 고유한 반응성은 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에서의 선택적 변형을 가능하게 한다. 예를 들어, 문헌 [Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조한다.

[0208] B. 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드 반응성 기

[0209] 친핵성 기, 예컨대 히드라진, 히드라지드 또는 세미카르바지드를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산은 접합체를 형성하는 다양한 친전자성 기와의 반응을 가능하게 한다.

[0210] 히드라지드-, 히드라진-, 및 세미카르바지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 예를 들어, L-글루타메이트-γ-히드라지드는 시그마 케미칼(Sigma Chemical) (미주리주 세인트루이스)로부터 입수가능하다. 상업적으로 입수가능하지 않은 다른 아미노산은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,281,211을 참조하고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0211] 히드라지드, 히드라진 또는 세미카르바지드 관능기를 갖는 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 관능기를 함유하는 다양한 분자와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 히드라지드, 히드라진 및 세미카르바지드 관능기의 고유한 반응성은 20종의 통상의 아미노산에 존재하는 친핵성 기 (세린 또는 트레오닌의 히드록실 기 또는 리신 및 N-말단의 아미노 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음)와 비교하여, 알데히드, 케톤 및 다른 친전자성 기에 대하여 유의하게 보다 반응성이도록 한다.

[0212] C. 아미노옥시-함유 아미노산

[0213] 아미노옥시 (히드록실아민으로도 불림) 기를 함유하는 비-자연 코딩 아미노산은 접합체를 형성하는 다양한 친전자성 기 (PEG 또는 펩티드 성분을 포함하나 이에 제한되지는 않음)와의 반응을 가능하게 한다. 히드라진, 히드라지드 및 세미카르바지드와 마찬가지로, 아미노옥시 기의 증진된 친핵성이 알데히드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 관능기를 함유하는 다양한 분자와 효율적으로 그리고 선택적으로 반응하도록 한다. 예를 들어, 문헌 [Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001)]을 참조한다. 히드라진 기와의 반응 결과는 상응하는 히드라존인 반면에, 아미노옥시 기와 카르보닐-함유 기, 예컨대 케톤의 반응으로부터는 일반적으로 옥심이 생성된다.

[0214] 아미노옥시-함유 아미노산은 용이하게 입수가능한 아미노산 전구체 (호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003)]을 참조한다. 특정 아미노옥시-함유 아미노산, 예컨대 L-2-아미노-4-(아미노옥시)부티르산은 천연 공급원으로부터 단리되었다 (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). 다른 아미노옥시-함유 아미노산이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다.

[0215] D. 아지드 및 알킨 반응성 기

[0216] 아지드 및 알킨 관능기의 고유한 반응성은, 이들이 폴리펩티드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 유용하도록 한다. 유기 아지드, 특히 지방족 아지드, 및 알킨은 일반적으로 통상의 반응성 화학 조건에 대하여 안정

하다. 특히, 아지드 및 알킨 관능기는 둘다 자연 발생 폴리펩티드에서 발견되는 20종의 통상의 아미노산의 측쇄 (즉, R 기)에 대하여 불활성이다. 그러나, 근접해지면 아지드 및 알킨 기의 "스프링-로딩" 특성이 나타나고, 이들이 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 반응을 통해 선택적으로 그리고 효율적으로 반응하여 상응하는 트리아졸을 생성한다. 예를 들어, 문헌 [Chin J., et al., Science 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]을 참조한다.

[0217] 휘스겐 고리화첨가 반응이 친핵성 치환이 아닌 선택적 고리화첨가 반응을 포함하기 때문에 (예를 들어, 문헌 [Padwa, A., in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176] 참조), 아지드 및 알킨-함유 측쇄를 갖는 비-자연 코딩 아미노산의 혼입은 생성된 폴리펩티드가 비-자연 코딩 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형되도록 한다. 아지드 또는 알킨-함유 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함하는 고리화첨가 반응은 계내에서 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키는 촉매량의 환원제의 존재 하에, Cu(II) (촉매량의 $CuSO_4$의 형태를 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 첨가에 의해, 수성 조건 하의 실온에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)]을 참조한다. 예시적인 환원제는 아스코르베이트, 금속성 구리, 퀴닌, 히드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe^{2+}, Co^{2+}, 및 인가되는 전기 전위를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0218] 아지드와 알킨 사이의 휘스겐 [3+2] 고리화첨가 반응이 바람직한 일부 경우에, 변형된 렐락신 폴리펩티드는 알킨 모이어티를 포함하는 비-자연 코딩 아미노산을 포함할 수 있고 아미노산에 부착될 PK 인핸서는 아지드 모이어티를 포함할 수 있다. 대안적으로, 반대 반응 (즉, 아미노산에 아지드 모이어티를 갖고 수용성 중합체에 알킨 모이어티가 존재함)이 또한 수행될 수 있다.

[0219] 아지드 관능기는 또한 아릴 에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 또한 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화되어 아미드 연결을 생성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 계내에서 아지드를 환원시키고 생성되는 아민은 후속적으로 근접한 에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다. 예를 들어, 문헌 [E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)]을 참조한다. 아지드-함유 아미노산은 알킬 아지드 (2-아미노-6-아지도-1-헥산산을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 아릴 아지드 (p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

[0220] 아지드 관능기는 또한 티오에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고 또한 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 관능화되어 아미드 연결을 생성할 수 있다. 아릴 포스핀 기는 계내에서 아지드를 환원시키고 생성되는 아민은 후속적으로 티오에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아미드를 생성한다.

[0221] 알킨-함유 아미노산은 상업적으로 입수가능하다. 대안적으로, 알킨-함유 아미노산은 표준 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, p-프로파르길옥시페닐알라닌은 예를 들어 문헌 [Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003)]에 기재되어 있는 바와 같이 합성될 수 있고, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 문헌 [Kayser, B., et al., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997)]에 기재되어 있는 바와 같이 합성될 수 있다. 다른 알킨-함유 아미노산도 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다.

[0222] 아지드-함유 아미노산은 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 상업적으로 입수가능하지 않은 아지드-함유 아미노산의 경우, 아지드 기는 적합한 이탈기 (할라이드, 메실레이트, 토실레이트를 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 대체를 통하는 것 또는 적합하게 보호된 락톤의 개환을 통하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 비교적 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조한다.

[0223] [3+2] 고리화첨가를 통해 개시내용의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 아지드 또는 알키닐 유도체를 갖는 실질적으로 임의의 분자를 포함한다. 이러한 분자는 염료, 형광단, 가교제, 사카라이드 유도체, 중합체 (폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 광가교제, 세포독성 화합물, 친화성 표지, 비오틴의 유도체, 수지, 비드, 펩티드, 제2 단백질 또는 폴리펩티드 (또는 그 초과), 폴리뉴클레오티드(들) (DNA, RNA 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 금속 킬레이트화제, 보조인자, 지방산, 탄수화물 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 분자는 알키닐 기를 갖는 비천연 아미노산, 예를 들어 비제한적으로 p-프로파르길옥시페닐알라닌, 또는 아지도 기를 갖는 비천연 아미노산, 예를 들어 비제한적으로 p-아지도-페닐알라닌에 첨가

될 수 있다.

[0224] E. 아미노티올 반응성 기

[0225] 베타-치환된 아미노티올 관능기의 고유한 반응성은, 이들이 티아졸리딘의 형성을 통해 알데히드 기를 함유하는 폴리펩티드 및 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 유용하도록 한다. 예를 들어, 문헌 [J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 베타-치환된 아미노티올 아미노산은 변형된 렐락신 폴리펩티드에 혼입되고, 후속적으로 알데히드 관능기를 포함하는 PK 인핸서와 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, PK 인핸서, 약물 접합체 또는 다른 페이로드가 베타-치환된 아미노티올 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드와 티아졸리딘의 형성을 통해 커플링될 수 있다.

[0226] F. 추가의 반응성 기

[0227] 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드에 혼입될 수 있는 추가의 반응성 기 및 비-자연 코딩 아미노산이, 그 전문이 모두 본원에 참조로 포함되는 하기 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 공개 번호 2006/0194256, 미국 특허 공개 번호 2006/0217532, 미국 특허 공개 번호 2006/0217289, 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO/2007/070659.

[0228] VI. 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생체내 생성

[0229] 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 자연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 부가하거나 또는 이것으로 치환하기 위해 변형된 tRNA 및 tRNA 신테타제를 사용하여 생체내에서 생산될 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 번호 8,735,539에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0230] 자연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 사용하는 tRNA 및 tRNA 신테타제의 생성 방법은 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,045,337 및 7,083,970에 기재되어 있다. 이들 방법은 번역 시스템에 대하여 내인성인 신테타제 및 tRNA와 독립적으로 기능하는 번역 기구를 생성하는 것을 포함한다 (따라서 때때로 "직교"로 지칭됨). 전형적으로, 번역 시스템은 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)를 포함한다. 전형적으로, O-RS는 번역 시스템에서 적어도 1개의 비-자연 발생 아미노산으로 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화하고 O-tRNA는 시스템 내의 다른 tRNA에 의해서는 인식되지 않는 적어도 1개의 선택자 코돈을 인식한다. 그에 따라 번역 시스템은 코딩된 선택자 코돈에 대한 반응으로 시스템에서 생산되는 단백질에 비-자연-코딩된 아미노산을 삽입함으로써, 코딩된 폴리펩티드의 위치에 아미노산을 "치환"시킨다.

[0231] O-tRNA/아미노아실-tRNA 신테타제의 사용은 비-자연 코딩 아미노산을 코딩하는 특정 코돈을 선택하는 것을 포함한다. 임의의 코돈이 사용될 수 있지만, O-tRNA/아미노아실-tRNA 신테타제가 발현되는 세포에서 거의 사용되지 않거나 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 일반적으로 바람직하다. 예를 들어, 예시적인 코돈은 넌센스 코돈, 예컨대 정지 코돈 (앰버, 오버 및 오팔), 4개 이상의 염기 코돈 및 거의 사용되지 않거나 또는 사용되지 않는 다른 천연 3-염기 코돈을 포함한다.

[0232] 특정 선택자 코돈(들)은 관련 기술분야에 공지된 돌연변이유발 방법 (부위-특이적 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 제한 선택 돌연변이유발 등을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 사용하여, 변형된 렐락신 폴리뉴클레오티드 코딩 서열의 적절한 위치에 도입될 수 있다.

[0233] VII. 비-진핵생물 및 진핵생물에서의 발현

[0234] 발현 시스템, 배양 및 단리

[0235] 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드는, 예를 들어 효모, 곤충 세포 (예를 들어, 바큘로바이러스-감염된 곤충 세포), 포유동물 세포, 및 박테리아를 포함하는 임의의 수의 적합한 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 예시적인 발현 시스템에 관한 설명이 하기에 제공된다.

[0236] 효모: 본원에 사용된 용어 "효모"는, 피. 파스토리스(P. pastoris), 피. 길리에르몬디이(P. guilliermondii), 에스. 세레비지아에(S. cerevisiae), 에스. 칼스베르겐시스(S. carlsbergensis), 에스. 디아스타티쿠스(S. diastaticus), 에스. 도우글라시이(S. douglasii), 에스. 클루이베리(S. kluyveri), 에스. 노르벤시스(S. norbensis), 에스. 오비포르미스(S. oviformis), 케이. 락티스(K. lactis), 케이. 프라길리스(K. fragilis), 씨. 알비칸스(C. albicans), 씨. 말토사(C. maltosa), 및 에이치. 폴리모르파(H. polymorpha)를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 다양한 효모 중 임의의 것을 포함한다. 본원에 참조로 포함되는 WO 2005/091944는 효모에서의 렐락신의 발현을 기재한다.

[0237] 이. 콜라이, 슈도모나스 종, 및 다른 원핵생물:

[0238] 용어 "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA를 위한 수용체로서 사용될 수 있거나 또는 사용된 박테리아를 지칭한다. 상기 용어는 형질감염된 기원이 되는 박테리아 숙주 세포의 자손을 포함한다. 단일 모 세포의 자손은 우발적인 또는 의도된 돌연변이로 인하여, 기원이 되는 모 세포와 형태 또는 게놈 또는 총 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않아도 되는 것으로 이해되어야 한다. 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재와 같은 관련된 특성에 의해 특징화되는 모 세포와 충분히 유사한 모 세포의 자손이 상기 정의가 의도하는 자손에 포함된다.

[0239] 발현을 위한 박테리아 숙주를 선택함에 있어서, 적합한 숙주는, 특히 우수한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질분해 활성 및 전체적 강건성을 갖는 것으로 확인된 것들을 포함할 수 있다. 산업적/제약적 발효는 일반적으로 K 균주 (예를 들어, W3110)로부터 유래된 박테리아 또는 B 균주 (예를 들어, BL21)로부터 유래된 박테리아를 사용한다. 적합한 이. 콜라이 숙주의 다른 예는 BL21 균주, DH10B 균주, 또는 그의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 방법의 또 다른 실시양태에서, 이. 콜라이 숙주는 OMP- 및 LON-을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 프로테아제 마이너스 균주이다. 숙주 세포 균주는, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 및 슈도모나스 푸티다를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 슈도모나스 종일 수 있다. MB101 균주로 명명되는, 슈도모나스 플루오레센스 생물변이형 1이 재조합 생산에 유용한 것으로 공지되어 있으며 치료 단백질의 생산 공정에 이용가능하다.

[0240] 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면 (즉, 발현 구축물이 숙주 세포에 도입되고 적절한 발현 구축물을 갖는 숙주 세포가 단리됨), 재조합 숙주 세포 균주는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생산에 적절한 조건 하에 배양된다.

[0241] 재조합 숙주 세포는 배치 또는 연속 포맷으로 세포가 회수되거나 (변형된 렐락신 폴리펩티드가 세포 내에 축적되는 경우) 또는 배양 상청액이 회수되면서, 배치 또는 연속 포맷으로 배양될 수 있다.

[0242] 박테리아 숙주 세포에서 생산되는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 난용성 또는 불용성 (봉입체의 형태)일 수 있다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 재조합적으로 생산된 단백질의 용해도를 증가시키기 위한 목적으로 선택된 변형된 렐락신 폴리펩티드에서 아미노산 치환이 용이하게 이루어질 수 있다. 변형된 렐락신 폴리펩티드는 예를 들어, 우레아 또는 구아니딘 히드로클로라이드로 가용화될 수 있다.

[0243] 가용성의 변형된 렐락신 단백질 경우에, 렐락신은 주변세포질 공간 또는 배양 배지로 분비될 수 있다. 예를 들어, 변형된 렐락신은 서열식별번호: 39-44에 열건된 것을 포함한, 8개의 상이한 리더 서열을 포함하는 구축물을 코딩하는 플라스미드를 사용하여 W3110-B2 세포를 형질전환시키는 것에 의해 W3110-B2 세포의 주변세포질 공간으로 분비되고, 이어서 세포를 OD가 약 0.8에 도달할 때까지 37℃에서 성장시키며, 이때 발현은 0.01% 아라비노스에 의해 유도된다. 5시간 후에 주변세포질 방출 샘플이 배양물로부터 제조될 수 있다. 또한, 가용성의 변형된 렐락신은 숙주 세포의 세포질에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 전에 가용성의 변형된 렐락신을 농축시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0244] 변형된 렐락신 폴리펩티드가 융합 단백질로서 생산되는 경우에, 융합 서열은 제거될 수 있다. 융합 서열의 제거는 효소적 또는 화학적 절단에 의해 달성될 수 있다. 융합 서열의 효소적 제거는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 융합 서열의 제거를 위한 효소의 선택은 융합의 정체에 의해 결정될 수 있으며 반응 조건은 효소의 선택에 의해 특정될 수 있고, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 화학적 절단은 브로민화시아노겐, TEV 프로테아제, 및 다른 시약을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 시약을 사용하여 달성될 수 있다. 절단된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 절단된 융합 서열로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0245] 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변성 및 환원시킨 다음, 폴리펩티드를 바람직한 입체형태로 리폴딩시키는 것이 때때로 바람직하다. 예를 들어, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE, 및/또는 샤페로닌이 관심 번역 생성물에 첨가될 수 있다. 단백질은 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 포함하나 이에 제한되지는 않는 것을 함유하는 산화 환원 완충제 중에서 리폴딩될 수 있다. 리폴딩 시약이 유동하거나 또는 다르게 이동하여 1개 이상의 폴리펩티드 또는 다른 발현 생성물과 접촉할 수 있거나, 또는 그 반대도 가능하다.

[0246] 변형된 렐락신 폴리펩티드의 원핵 생산의 경우에, 그에 따라 생산된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 미스폴딩될 수 있으므로, 생물학적 활성이 결여되거나 또는 감소된 생물학적 활성을 갖는다. 단백질의 생물활성은 "리폴딩"에 의해 복구될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 비변형된 또는 변형된 렐락신 폴리펩티드는, 예를 들어 1종 이상의 카오트로픽제 (예를 들어, 우레아 및/또는 구아니딘) 및 디술피드 결합을 환원시킬 수 있는 환원제 (예를

들어, 디티오트레이톨, DTT 또는 2-메르캅토에탄올, 2-ME)를 사용하는 폴리펩티드 쇄의 가용화 (변형된 렐락신 폴리펩티드가 또한 불용성인 경우), 언폴딩 및 환원에 의해 리폴딩된다. 중간 농도의 카오트로프제에서, 산화제 (예를 들어, 산소, 시스틴 또는 시스타민)가 후속적으로 첨가되고, 이는 디술피드 결합의 재형성을 가능하게 한다. 변형된 렐락신 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지되어 있는 표준 방법, 예컨대 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 4,511,502, 4,511,503 및 4,512,922에 기재된 방법을 사용하여 리폴딩될 수 있다. 변형된 렐락신 폴리펩티드는 또한 다른 단백질과 함께 공동폴딩되어 이종이량체 또는 이종다량체를 형성할 수 있다.

[0247] 리폴딩 후에, 변형된 렐락신은 추가로 정제될 수 있다. 변형된 렐락신의 정제는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등 또는 그의 임의의 조합을 포함한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 추가의 정제는 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 또한 포함할 수 있다.

[0248] 정제 후에, 변형된 렐락신은 상이한 완충제와 교환될 수 있고/거나 투석여과 및 투석을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 농축될 수 있다. 단일 정제 단백질로서 제공되는 변형된 렐락신은 응집 및 침전에 적용될 수 있다.

[0249] 정제된 변형된 렐락신은 적어도 90% 순수 (역상 고성능 액체 크로마토그래피, RP-HPLC, 또는 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, SDS-PAGE에 의해 측정된 바와 같음), 또는 적어도 95% 순수, 또는 적어도 98% 순수, 또는 적어도 99% 또는 그 초과로 순수할 수 있다. 변형된 렐락신 순도의 정확한 수치 값과 상관없이, 변형된 렐락신은 제약 제품으로서 또는 추가 프로세싱, 예컨대 PK 인핸서와의 접합을 위해 사용되기에 충분히 순수하다.

[0250] 특정 변형된 렐락신 분자는 다른 활성 성분 또는 단백질 (부형제, 담체, 및 안정화제, 혈청 알부민 등 이외의 다른 것)의 부재 하에 치료제로서 사용될 수 있거나, 또는 또 다른 단백질 또는 중합체와 복합체화될 수 있다.

[0251] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 각각의 정제 단계 후 변형된 렐락신의 수율은 각각의 정제 단계를 위한 출발 물질 중 비변형된 또는 변형된 렐락신의 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 적어도 약 99.9%, 또는 적어도 약 99.99%일 수 있다.

[0252] VIII. 대안적 시스템에서의 발현

[0253] 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 무세포성 (예를 들어, 시험관내) 번역 시스템을 사용하여 발현될 수 있다. 번역 시스템은 세포성 또는 무세포성일 수 있고, 원핵 또는 진핵일 수 있다. 세포성 번역 시스템은 전체 세포 제제, 예컨대 투과성 세포 또는 세포 배양물을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 목적하는 핵산 서열이 mRNA로 전사되고 mRNA는 번역될 수 있다. 무세포성 번역 시스템은 상업적으로 입수가능하고, 많은 상이한 유형 및 시스템이 널리 공지되어 있다. 무세포성 시스템의 예는 원핵 용해물, 예컨대 에스케리키아 콜라이 용해물, 및 진핵 용해물, 예컨대 밀 배아 추출물, 곤충 세포 용해물, 토끼 망상적혈구 용해물, 토끼 난모세포 용해물 및 인간 세포 용해물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 막 추출물, 예컨대 마이크로솜 막을 함유하는 개 췌장 추출물이 또한 이용가능하며, 이는 분비 단백질의 번역에 유용하다.

[0254] IX. 변형된 렐락신 폴리펩티드를 함유하는 융합 단백질

[0255] 개시내용은 또한 변형된 렐락신 폴리펩티드 서열 및 융합 파트너를 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드 또는 그의 단편을 제공한다. 융합 파트너는 반감기 연장, 단백질 정제 및/또는 제조를 용이하게 하는 것, 증진된 생물물리학적 특성, 예컨대 용해도 또는 안정성의 증가, 및 면역원성 또는 독성의 감소, 또는 임의의 다른 목적을 포함하나 이에 제한되지는 않는 기능적 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 연장된 생체내 반감기를 나타내므로, 치료 요법에서 덜 빈번한 투여 (예컨대, 1주에 2회, 1주에 1회, 또는 격주로 1회 투여 등)를 가능하게 할 수 있다. 예시적인 융합 단백질은 융합 파트너, 예컨대 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), PK 연장 (PKE) 애드넥틴, XTEN, Fc 도메인, 이뮤노글로불린 불변 영역, 또는 상기 중 임의의 것의 단편, 또는 상기 중 임의의 것의 조합에 융합된 변형된 렐락신을 포함한다. 융합 단백질은 연결 펩티드를 코딩하는 서열에 의해 임의로 분리된, 변형된 렐락신 폴리펩티드 서열 및 융합 파트너 서열을 코딩하는 핵산을 동일한 리딩 프레임에서 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 융합 단백질은 임의의 순서로, 예를 들어 1개 이상의 융합 파트너가 변형된 렐락신 폴리펩티드 서열의 N-말단 및/또는 C-말단에 연결되는 순서, 또는 1개 이상의 융합 파트너가 N-

말단과 C-말단 둘 다에 연결되는 순서로 변형된 렐락신 폴리펩티드 및 융합 파트너를 포함할 수 있다.

[0256] X. 변형된 및 비변형된 렐락신 폴리펩티드의 글리코실화

[0257] 본 개시내용은 사카라이드 잔기를 갖는 1개 이상의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드를 포함한다. 사카라이드 잔기는 천연 (N-아세틸글루코사민을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 비-천연 (3-플루오로갈락토스를 포함하나 이에 제한되지는 않음)일 수 있다. 사카라이드는 N- 또는 O-연결 글리코시드 연결 (N-아세틸갈락토스-L-세린을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 비-천연 연결 (옥심 또는 상응하는 C- 또는 S-연결 글리코시드를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 의해 비-자연 코딩 아미노산에 연결될 수 있다.

[0258] 사카라이드 (글리코실을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 모이어티는 생체내 또는 시험관내에서 변형된 렐락신 폴리펩티드에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 카르보닐-함유 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드는 아미노옥시 기로 유도체화된 사카라이드로 변형되어, 옥심 연결을 통해 연결된 상응하는 글리코실화된 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 비-자연 코딩 아미노산에 부착되면, 사카라이드는 글리코실트랜스퍼라제 및 다른 효소에 의한 처리에 의해 추가로 가공되어, 변형된 렐락신 폴리펩티드에 결합된 올리고사카라이드를 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)]을 참조한다.

[0259] XI. 투여 및 제약 조성물

[0260] 본원에 기재된, 변형된 렐락신 폴리펩티드의 치료 유효량 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다. 이러한 담체 또는 부형제는 염수, 완충 염수, 덱스트로스, 수크로스, 히스티딘, 물, 글리세롤, PS80 (폴리소르베이트 80), 에탄올, 및/또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 제제는 투여 방식에 적합하도록 제조된다.

[0261] 예를 들어, 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 0.1 내지 100 mg/수용자 환자 체중 kg의 농도로 환자에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 0.5-5 mg/수용자 환자 체중 kg의 농도로 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 1일 1회 내지 2주, 3주, 또는 4주에 1회의 빈도로, 예컨대 약 1주에 1회, 1주에 2회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 또는 6일마다 1회의 빈도로 수용자 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 렐락신 폴리펩티드는 환자에게 1주에 1회 투여될 수 있다.

[0262] 주어진 환자에게 투여되는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 농도는 상기에 제시된 예시적인 투여 농도보다 높거나 또는 낮을 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0263] 본 개시내용에 제공된 정보에 기초하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험을 통해 유효 투여량 및 투여 빈도를 결정할 수 있을 것이고, 이는 예를 들어 본원의 개시내용 및 문헌 [Goodman et al., (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; 또는 Howland et al., (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins]의 교시내용에 의해 안내된다.

[0264] 변형된 렐락신의 평균 양은 달라질 수 있고, 특히 자격을 갖춘 의사의 권고와 처방에 기초하여야 한다. 변형된 렐락신의 정확한 양은 치료될 상태의 정확한 유형, 치료될 환자의 상태 뿐만 아니라, 조성물 중의 다른 성분과 같은 인자를 조건으로 하는 선호도의 문제이다. 본 개시내용은 또한 또 다른 활성제의 치료 유효량의 투여를 제공한다. 제공되는 양은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0265] "제약 조성물"은 포유동물에 투여하기에 적합한 화학적 또는 생물학적 조성물을 지칭한다. 이러한 조성물은 협측, 표피, 경막외, 흡입, 동맥내, 심장내, 뇌실내, 피내, 근육내, 비강내, 안내, 복강내, 척수내, 척수강내, 정맥내, 경구, 비경구, 관장제 또는 좌제를 통해 직장으로, 피하, 진피하, 설하, 경피 및 경점막을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 경로 중 하나 이상을 통한 투여를 위해 특이적으로 제제화될 수 있다. 또한, 투여는 주사, 분말, 액체, 겔, 점적제, 또는 다른 투여 수단에 의해 이루어질 수 있다.

[0266] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체" 또는 "부형제"는 생리학상 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제를 포함한다. 한 실시양태에서, 담체는 비경구 투여에 적합하다. 또 다른 실시양태에서, 담체는 피하 투여에 적합하다. 대안적으로, 담체는 정맥내, 복강내, 근육내 또는 설하 투여에 적합할 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다.

[0267] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 동결건조 형태로 존재할 수 있다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙 구조로서 제제화될 수 있다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 안정화제를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 또한 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0268] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 조성물에 등장화제, 예를 들어 당 예컨대 수크로스, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함한다. 모노스테아레이트 염 및 젤라틴과 같은 작용제를 포함시킴으로써, 주사가능한 조성물의 흡수가 연장될 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 시한-방출 제제, 예를 들어 느린 방출 중합체를 포함하는 조성물로 제제화될 수 있다. 활성 화합물은 임플란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제제와 같이, 급속 방출에 대하여 화합물을 보호할 수 있는 담체를 이용하여 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락트산, 폴리글리콜산 공중합체 (PLG)가 사용될 수 있다.

[0269] 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드 및 조성물은 비경구로, 예를 들어 피하로 또는 정맥내로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 주사 또는 주사 또는 주입의 임의의 다른 형태를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 단백질 또는 펩티드에 적합한 임의의 통상적인 경로에 의해 투여될 수 있다. 폴리펩티드 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국부, 설하 또는 직장 수단을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다. 변형된 렐락신을 포함하는 조성물은 또한 리포솜을 통해 투여될 수 있다. 변형된 렐락신 폴리펩티드는 단독으로 또는 다른 적합한 성분, 예컨대 제약 담체와 조합되어 사용될 수 있다. 변형된 렐락신 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0270] 예컨대 예를 들어 관절내 (관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 및 피하 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정박테리아제, 및 제제를 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성, 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 변형된 렐락신의 제제는 단위-용량 또는 다중-용량이 밀봉된 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 존재할 수 있다.

[0271] 본 개시내용의 문맥에서 환자에게 투여되는 용량은 환자에서 시간에 따라 유익한 치료 반응, 또는 용도에 따라 다른 적절한 활성을 갖기에 충분한다. 용량은 제제의 효능, 및 사용되는 변형된 렐락신 폴리펩티드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기, 및 환자의 상태 뿐만 아니라, 치료될 환자의 체중 또는 체표면적에 의해 결정된다.

[0272] 예를 들어 70 킬로그램인 환자에게 투여되는 용량은 전형적으로 현재 사용되는 치료 단백질의 투여량과 등가의 범위에 있고, 이는 관련 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 따라 조정된다.

[0273] 투여의 경우, 본 개시내용의 제제는 관련 제제의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 예를 들어 비제한적으로 환자의 체중 및 전반적인 건강에 대해 적용된 바와 같은 다양한 농도에서의 변형된 렐락신 폴리펩티드의 임의의 부작용의 관찰에 의해 결정된 속도로 투여된다. 투여는 단일 또는 분할 용량을 통해 달성될 수 있다.

[0274] 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 포유동물 대상체에 직접 투여될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 제약상 허용되는 담체와 함께 단위 투여량의 주사가능한 형태 (용액, 현탁액, 또는 에멀젼을 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 혼합물로 제조될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 또한 연속 주입 (미니펌프, 예컨대 삼투 펌프를 사용하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 단일 볼루스 또는 느린 방출 데포 제제에 의해 투여될 수 있다.

[0275] 투여에 적합한 제제는 수성 및 비-수성 용액, 항산화제, 완충제, 정박테리아제, 및 제제를 등장성이 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 등장성 멸균 용액, 및 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0276] 제약상 허용되는 담체는 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 비카르보네이트, 및 다른 유기 산을 함유하는 완충제; 아스코르브산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항산화제; 약 10개 미만의 잔기의 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 저분자량 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린을 포함하나 이에 제한되지는 않는 단백질; 폴리비닐피롤리돈을 포함하나 이에 제한되지는 않는 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 히스티딘 또는 히스티딘 유도체, 메티오닌, 글

루타메이트, 또는 리신을 포함하나 이에 제한되지는 않는 아미노산; 트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 다른 탄수화물; EDTA 및 에덴테이트 디소듐을 포함하나 이에 제한되지는 않는 킬레이트화제; 아연, 코발트, 또는 구리를 포함하나 이에 제한되지는 않는 2가 금속 이온; 만니톨 또는 소르비톨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 알콜; 소듐 및 염화나트륨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 염-형성 반대 이온; 및/또는 트윈(Tween)™ (트윈 80 (폴리소르베이트 80 또는 PS80) 및 트윈 20 (폴리소르베이트 20)을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 플루로닉 산 F68 (폴록사머 188)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 플루로닉스(Pluronics)™ 및 다른 플루로닉 산, 또는 PEG를 포함하나 이에 제한되지는 않는 비이온성 계면활성제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 적합한 계면활성제는 예를 들어, 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드), 즉 (PEO-PPO-PEO), 또는 폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드), 즉 (PPO-PEO-PPO), 또는 그의 조합을 기초로 하는 폴리에테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. PEO-PPO-PEO 및 PPO-PEO-PPO는 상표명 플루로닉스™, R-플루로닉스™, 테트로닉스(Tetronics)™ 및 R-테트로닉스™로 상업적으로 입수가능하고 (바스프 와이언도트 코포레이션(BASF Wyandotte Corp.), 미시간주 와이언도트), 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 4,820,352에 추가로 기재되어 있다. 다른 에틸렌/폴리프로필렌 블록 중합체도 적합한 계면활성제일 수 있다. 계면활성제 또는 계면활성제의 조합이 변형된 렐락신을 교반으로부터 초래된 스트레스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 스트레스에 대해 안정화시키는데 사용될 수 있다. 상기 중 일부는 "벌킹제"로 지칭될 수 있다. 일부는 또한 "장성 개질제"로 지칭될 수 있다. 항미생물 보존제가 또한 생성물 안정성 및 항미생물 유효성을 위해 적용될 수 있고; 적합한 보존제는 벤질 알콜, 벤즈알코늄 클로라이드, 메타크레졸, 메틸/프로필 파라벤, 크레졸, 및 페놀, 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 비카르보네이트 및/또는 다른 유기 산을 함유하는 완충제; 탄수화물 (예를 들어 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 다른 탄수화물), 예컨대 트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 및 계면활성제 예컨대 트윈™ 80 (폴리소르베이트 80 또는 PS80) 또는 트윈 20 (폴리소르베이트 20)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 히스티딘, 탄수화물 예컨대 수크로스를 함유하는 완충제; 및 계면활성제 예컨대 PS80을 포함할 수 있다.

[0277] PK 인핸서에 연결된 것을 포함한, 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 또한 지속-방출 시스템에 의해 또는 그의 일부로서 투여될 수 있다. 지속-방출 조성물은 필름 또는 마이크로캡슐을 포함하나 이에 제한되지는 않는 성형품의 형태로 반투과성 중합체 매트릭스를 예를 들어 비제한적으로 포함한다. 지속-방출 매트릭스는 생체적합성 물질, 예컨대 폴리(2-히드록시에틸 메타크릴레이트), 에틸렌 비닐 아세테이트 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산, 폴리락티드 (폴리락트산), 폴리글리콜리드 (글리콜산의 중합체), 폴리락티드 코-글리콜리드 (락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물, L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 술페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 폴리사카라이드, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 이소류신, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 지속-방출 조성물은 또한 리포솜에 포획된 화합물을 포함한다.

[0278] 본 개시내용의 문맥에서 환자에게 투여되는 용량은 대상체에서 시간에 따라 유익한 반응을 유발하기에 충분해야 한다. 일반적으로, 용량당 비경구로 (예를 들어, 정맥내로 또는 피하로) 투여되는 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드의 총 제약 유효량은 환자 체중의 약 0.01 μg/kg 내지 약 500 mg/kg, 약 0.01 μg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.05 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 100 μg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.2 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 또는 약 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 수 있거나, 또는 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 50 mg/kg, 또는 약 100 mg/kg이지만, 이는 치료적으로 재량에 맡겨진다. 일부 실시양태에서, 용량당 비경구로 (예를 들어, 정맥내로 또는 피하로) 투여되는 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 0.2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 0.5 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 범위일 수 있거나, 또는 약 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg, 또는 80 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 용량당 비경구로 (예를 들어, 정맥내로 또는 피하로) 투여되는 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 1 mg/kg일 수 있다. 일부 실시양태에서, 용량당 비경구로 (예를 들어, 정맥내로 또는 피하로) 투여되는 본 개시내용의 변형된 렐락신 폴리펩티드는 약 0.1 mg 내지 약 10,000 mg, 약 1 mg 내지 약 5,000 mg, 약 10 mg 내지 약 2,500 mg, 약 100 mg 내지 약 1,000 mg, 약 200 mg 내지 약 800 mg, 약 400 mg 내지 약 600 mg, 약 1 mg 내지 약 10 mg, 약 10 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 100 mg 내지 약 300 mg, 약 300 mg 내지

약 500 mg, 약 500 mg 내지 약 700 mg, 약 700 mg 내지 약 900 mg, 약 900 mg 내지 약 1,200 mg, 약 1,000 mg 내지 약 2,000 mg, 약 2,000 mg 내지 약 3,000 mg, 약 3,000 mg 내지 약 4,000 mg, 약 4,000 mg 내지 약 5,000 mg, 약 5,000 mg 내지 약 6,000 mg, 약 6,000 mg 내지 약 7,000 mg, 약 7,000 mg 내지 약 8,000 mg, 약 8,000 mg 내지 약 9,000 mg, 또는 약 9,000 mg 내지 약 10,000 mg 범위의 균일 용량일 수 있다.

[0279] XII. 변형된 렐락신 폴리펩티드의 치료 용도

[0280] 본 개시내용은 심혈관 질환 또는 섬유화 질환을 포함한 질환, 예컨대 심부전, 췌장염, 염증, 암, 경피증, 폐 섬유증, 신섬유증, 간 섬유증 또는 심장 섬유증의 치료에서의 변형된 렐락신 폴리펩티드의 용도를 제공된다.

[0281] 상기 심혈관 질환은 관상 동맥 질환, 심장 발작, 부정맥 또는 비정상적 심장 리듬, 심부전, 심장 판막 질환, 선천성 심장 질환, 심근병증 (심장 근육 질환), 심막 질환, 대동맥 질환, 마르팡 증후군 또는 혈관 질환 (핏줄 질환)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0282] 일부 실시양태에서, 상기 심부전은 진행성 심부전, 심신성 증후군, 신장 기능 장애 동반 심부전, 만성 심부전, 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 급성 심부전, 급성기-후 심부전 예컨대 급성기-후 대상부전성 심부전, 보상성 심부전, 대상부전성 심부전, 우심부전, 좌심부전, 전심부전, 허혈성 심근병증, 확장성 심근병증, 선천성 심장 결손과 연관된 심부전, 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 승모판 협착, 승모판 기능부전, 대동맥 협착, 대동맥 기능부전, 삼첨판 협착, 삼첨판 기능부전, 폐동맥 협착, 폐동맥판 기능부전, 협심증, 고혈압, 폐고혈압 또는 폐동맥 고혈압, 복합 심장 판막 결손과 연관된 심부전, 심근 염증 (심근염), 만성 심근염, 급성 심근염, 바이러스성 심근염, 당뇨병성 심부전, 알콜성 심근병증, 심장 축적 장애와 연관된 심부전, 확장기 심부전, 수축기 심부전, 확장기 기능장애, 심근경색 후 재형성, 만성 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 또는 만성 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF) 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0283] 일부 실시양태에서, 상기 심부전은 만성 심부전, 급성 심부전, 급성기-후 심부전, 만성 감소된 박출 계수 심부전 (HFrEF), 만성 보존된 박출 계수 심부전 (HFpEF), 중간-범위 박출 계수를 갖는 만성 심부전 (HFmEF), 확장기 심부전, 수축기 심부전, 심근경색 후 재형성, 협심증, 고혈압, 폐고혈압 및 폐동맥 고혈압으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 심부전은 급성기-후 심부전, 진행성 심부전, 심신성 증후군, 및 신장 기능 장애 동반 심부전으로부터 선택된다.

[0284] 섬유증은 기관 또는 조직에 과도한 섬유성 결합 조직이 형성되는 것이다. 섬유성 조직의 과도한 침적은 병리학적 상태와 연관되고, 이는 기관 또는 조직 기능의 장애로 이어질 수 있다. 영향을 받는 기관은 폐 (폐의 또는 폐 섬유증), 간 (간의 또는 간 섬유증), 신장 (신장의 또는 신섬유증), 및 심장 (심장 섬유증)을 포함할 수 있다. 섬유증은 또한 관절, 피부, 장, 골수 등을 포함하는, 다른 조직 및 기관에도 영향을 미칠 수 있다. 예시적인 섬유화 상태 또는 질환은 간에 영향을 미치는 비알콜성 지방간염 (NASH); 신장에 영향을 미치는 당뇨병성 신장 질환 및 당뇨병성 신병증; 및 심장에 영향을 미치는 대사 심부전을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, NASH는 알콜을 거의 또는 전혀 마시지 않는 인간의 간에서의 지방, 염증 및 손상을 특징으로 하며 이는 간 경변증으로 이어질 수 있다. NASH는 종종 상승된 혈액 지질 수준 및 당뇨병 또는 당뇨병전기를 갖는 과체중 또는 비만인 중년의 인간에서 진단되는 경향이 있다.

[0285] 잠재적 치료 용도를 위한 변형된 렐락신 폴리펩티드의 생물학적 활성은 표준 또는 공지된 시험관내 또는 생체내 검정을 사용하여 결정할 수 있다. 렐락신 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법에 의해 생물학적 활성에 대해 분석할 수 있다. 이러한 검정은 수용체 결합 검정을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0286] 심부전 및 섬유화 질환과 같은 질환과 관련하여, 변형된 렐락신의 활성은 하나 이상의 생체내 검정을 사용하여 결정될 수 있다. 상기 검정은 전형적으로 상기 질환의 동물 모델에서 렐락신을 투여하고, 효과적인 치료의 질환 진행, 중증도 또는 다른 징후에 대한 효과를 결정하는 것을 수반한다. 이러한 검정은 모델 시스템에서 효과적인 투여량 및 치료 요법을 결정하기 위해 사용될 수 있고, 그에 기초하여 예를 들어 인간 환자에 대한 임상 용도를 위한 투여 요법을 예측할 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 HF 검정은 다음을 포함한다: 1) 심근 경색 및 HF로의 진행을 겪고 있는 환자의 심장 변화를 모방하는 마우스 좌측 하행 (LAD) 관상동맥 결찰 모델 (Samuel et al., Lab. Investigation 91:675-690, 2011); 2) 최소 농도 AngII가 심장 섬유증을 유도하는데 사용되는 제한된 AngII-주입 모델 (Xu et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 51:62-70, 2008); 3) 고혈압, 신장애 및 혈액량 과부하를 특징으로 하는 Dahl-염 감수성 래트 모델 (Sakata et al., Circulation 109:2143-2149, 2004); 4) WT-RLX 효능을 입증하기 위해 이전에 사용된 심장 및 신장 섬유증의 노화-자발 고혈압 래트 (SHR) 모델 (Lekgabe et al., Hypertension 46:412-418, 2005); 및 5) 압력 과부하의 래트 흉부 대동맥 수축 모델 (Kuster

et al., Circulation 111:420-427, 2005). 이들 모델에 더하여, 변형된 렐락신의 활성은 또한 개 모델, 예컨대 정상 및 빈맥조율-유발된 HF 개에서 결정될 수 있다. 추가적으로, 이들 검정은 변형된 렐락신이 예방 방식으로 뿐만 아니라 치료 방식으로 제공될 때 효능이 있는지를 결정하기 위해 수행될 수 있다. 또한, 변형된 렐락신은 신장 (Yoshida et al., Nephrol. Dialysis Transplant 27: 2190-2197, 2012), 폐 (Huang et al., Am. J. Pathol. 179:2751-2765, 2011), 및 간 섬유증 (Williams et al., Gut 49:577-583, 2001)을 포함한 섬유증 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 변형된 렐락신의 효능은 야생형 렐락신 (예를 들어, 야생형 인간 렐락신)의 효능과 비교될 수 있다.

[0287] 본 발명의 렐락신, 렐락신 폴리펩티드, 및/또는 렐락신 유사체의 투여되는 양은 다양할 수 있고, 특히 자격있는 의사의 권고 및 처방에 기초해야 한다. 본 발명의 렐락신, 렐락신 폴리펩티드, 및/또는 렐락신 유사체의 정확한 양은 치료될 상태의 정확한 유형 및/또는 중증도, 치료될 환자의 상태, 뿐만 아니라 조성물 중의 다른 성분과 같은 인자를 조건으로 하는 선호도의 문제이다. 본 발명은 추가로 또 다른 활성제의 치료 유효량의 투여를 포함할 수 있다. 제공되는 양은 렐락신, 이용가능한 렐락신 요법, 및/또는 다른 렐락신 유사체에 의한 요법에 기초하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0288] 본 개시내용의 화합물은 경색이 영향을 미치는 심근의 면적을 감소시키기 위해, 및 속발성 경색의 예방을 위해 사용될 수 있다. 추가로, 혈전색전성 장애, 허혈 후의 재관류 손상, 미세혈관 및 대혈관 병변 (혈관염), 동맥 및 정맥 혈전증, 부종, 허혈, 예컨대 심근경색, 졸중 및 일과성 허혈 발작의 예방 및/또는 치료, 관상 동맥 우회로 수술 (관상 동맥 우회로 이식, CABG), 1차 경피 경관 관상 동맥성형술 (PTCA), 혈전용해 후의 PTCA, 구조용 PTCA, 심장 이식 및 개심 수술과 관련된 심장 보호, 및 이식, 우회로 수술, 카테터 검사 및 다른 외과적 절차와 관련된 기관 보호를 위한 본 개시내용의 화합물의 용도가 제공된다. 추가로, 호흡기 장애, 예컨대 예를 들어, 만성 폐쇄성 폐 질환 (만성 기관지염, COPD), 천식, 폐기종, 기관지확장증, 낭성 섬유증 (점액점착증) 및 폐고혈압, 특히 폐동맥 고혈압의 예방 및/또는 치료를 위한 본 개시내용의 화합물의 용도가 제공된다.

[0289] 본 개시내용의 예시적인 실시양태는 크레아티닌 클리어런스 및/또는 수분 배설의 비정상적 감소, 우레아, 질소, 칼륨 및/또는 크레아티닌의 비정상적 상승된 혈액 농도, 신장 효소, 예컨대 글루타밀신테타제의 활성에서의 변경, 소변 오스몰농도 및 소변 부피, 증가된 미세알부민뇨, 거대알부민뇨, 사구체 및 세동맥 병변, 세뇨관 확장, 고인산혈증 및/또는 투석의 필요를 특징으로 하고 진단상 연관된, 투석을 필요로 하거나 필요로 하지 않는 신부전의 급성 및 만성 병기, 뿐만 아니라 기저 또는 관련 신장 질환 예컨대 신저관류, 투석 유발된 저혈압, 사구체병증, 사구체 및 세관성 단백뇨, 신장 부종, 혈뇨, 원발성, 속발성, 뿐만 아니라 급성 및 만성 사구체신염, 막성 및 막증식성 사구체신염, 알포트-증후군, 사구체경화증, 간질성 세뇨관 질환, 신병증성 질환, 예컨대 원발성 및 선천성 신장 질환, 신염증, 신장 이식 거부와 같은 면역학적 신질환, 면역 복합체 유발된 신질환, 뿐만 아니라 중독 유발 신병증성 질환, 당뇨병성 및 비-당뇨병성 신질환, 신우신염, 낭성 신장, 신경화증, 고혈압성 신경화증, 신증후군을 포함한, 급성 및 만성 신장 질환 및 급성 및 만성 신기능부전, 뿐만 아니라 급성 및 만성 신부전을 포함하나 이에 제한되지는 않는 신장 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서 개시내용의 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0290] 또한, 개시내용의 변형된 렐락신은 신장의 불완전한 절제 후의 신암종, 이뇨제 남용 후의 탈수, 악성 고혈압에 의한 비제어 혈압 증가, 요로 폐쇄 및 감염, 아밀로이드증, 뿐만 아니라 사구체 손상과 연관된 전신 질환, 예컨대 홍반성 루푸스, 및 류마티스성 면역학적 전신 질환, 뿐만 아니라 신동맥 협착, 신동맥 혈전증, 신정맥 혈전증, 진통제 유발된 신병증 및 신세관성 산증의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서 사용될 수 있다.

[0291] 또한, 본 개시내용은 조영제 유발 및 약물 유발 급성 및 만성 간질성 신장 질환, 대사 증후군 및 이상지혈증의 예방 및/또는 치료를 위한 의약으로서의 개시내용의 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0292] 또한, 본 개시내용은 급성 및/또는 만성 신장 질환, 예컨대 폐 부종, 심부전, 요독증, 빈혈, 전해질 장애 (예를 들어 고칼륨혈증, 저나트륨혈증), 뿐만 아니라 뼈 및 탄수화물 대사와 연관된 영향 또는 증상 후의 예방, 완화 및/또는 치료를 위한 의약으로서 개시내용의 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0293] 또한, 본 개시내용은 신기능의 개선, 안정화 또는 회복을 필요로 하는 환자, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 신장 질환을 갖는 환자에서 신기능을 개선, 안정화 또는 회복시키기 위한 의약으로서의 개시내용의 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0294] 추가로 예시적인 실시양태는 폐 질환, 특히 천식 장애, 폐동맥 고혈압 (PAH) 및 좌-심장 질환을 포함한 폐고혈압 (PH)의 다른 형태, HIV, 겸상 적혈구성 빈혈, 혈전색전증 (CTEPH), 사르코이드증, COPD 또는 폐 섬유증-연관

폐고혈압, 만성- 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 급성 폐 손상 (ALI), 알파-1-항트립신 결핍 (AATD), 폐 섬유증, 폐기종 (예를 들어 담배 연기에 의해 유발된 폐기종) 및 낭성 섬유증 (CF)의 치료 및/또는 예방을 위한 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0295] 추가로 예시적인 실시양태는 내부 기관 예컨대 예를 들어, 폐, 심장, 신장, 골수 및 특히 간의 섬유화 장애를 포함한 섬유화 장애 및 또한 피부과적 섬유증 및 섬유화 안장애의 치료 및/또는 예방을 위한 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0296] 본 개시내용은 또한 장애, 특히 상기 언급된 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 의약을 제조하기 위한 변형된 렐락신의 용도를 제공한다.

[0297] 본 개시내용은 또한 개시내용의 적어도 1종의 변형된 렐락신의 유효량을 사용하여, 장애, 특히 상기 언급된 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 방법을 제공한다.

[0298] 본 개시내용은 또한 관상동맥 심장 질환, 급성 관상동맥 증후군, 심부전 (예를 들어 급성 심부전, 만성 심부전 또는 진행성 심부전), 및 심근경색의 치료 및/또는 예방을 위한 방법에 사용하기 위한 변형된 렐락신을 제공한다.

[0299] 본 개시내용의 방법 및 조성물에서 사용하기에 적합한 제약 조성물은 활성 성분이 의도된 목적, 예를 들어 심부전을 치료하는 것을 달성하기 위해 유효량으로 함유된 조성물을 포함한다. 유효 용량의 결정은 본 개시내용을 고려하여 관련 기술분야의 통상의 기술자의 능력 내에서 잘 이루어진다.

[0300] 임의의 화합물에 대해, 치료 유효 용량은 초기에 시험관내 검정, 예를 들어 RXFP1 수용체 활성화에서, 생체외 단리된 관류된 래트 심장에서, 또는 동물 모델, 통상적으로 마우스, 래트, 토끼, 개 또는 돼지에서 추정될 수 있다. 또한, 동물 모델은 바람직한 농도 범위 및 투여 경로를 달성하기 위해 사용된다. 이어서, 이러한 정보를 사용하여 인간에서의 투여에 유용한 용량 및 경로를 결정할 수 있다.

[0301] 치료 유효 용량은 증상 또는 상태를 개선시키는 변형된 렐락신의 양을 지칭한다. 이러한 화합물의 치료 효능 및 독성, 예를 들어 ED50 (집단의 50%에서 치료상 유효한 용량) 및 LD50 (집단의 50%에 치사성인 용량)을 표준 제약 절차에 의해 시험관내에서 또는 실험 동물에서 결정할 수 있다. 치료 및 독성 효과 사이의 용량 비가 치료 지수이고, 이는 비, ED50/LD50으로 표현될 수 있다. 예시적인 제약 조성물은 큰 치료 지수를 나타낸다. 시험관내 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터가 인간 용도에 대한 투여량 범위를 제제화하는데 사용된다. 이러한 화합물의 투여량은 예를 들어 독성을 거의 나타내지 않거나 전혀 나타내지 않는 ED50을 포함하는 순환성 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 이러한 범위 내에서, 사용되는 투여 형태, 환자의 감수성 및 투여 경로에 따라 달라진다.

[0302] 통상의 투여량은 투여 경로에 따라 0.1 내지 100,000 밀리그램의 총 용량에서 달라질 수 있다. 특정한 투여량 및 전달 방법에 관한 지침은 문헌에 제공되어 있다. 미국 특허 번호 4,657,760; 5,206,344; 또는 5,225,212를 참조한다.

[0303] XIII. 조합물

[0304] 개시내용의 변형된 렐락신은 단독으로 또는 다른 활성 화합물과 조합되어 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 용어 조합물은 변형된 렐락신 및 다른 작용제가 동일한 조성물에 함유되거나 또는 개별적으로 투여되는지 그렇지 않은지에 관계 없이 동시 또는 순차적 투여의 임의의 수단을 포괄하며, 투여는 동일하거나 상이한 투여 방식을 통해 이루어질 수 있다. 본 개시내용은 상기 언급된 장애의 치료 및/또는 예방을 위해, 부형제 (들) 또는 제약상 허용되는 담체와 혼합된 제약 조성물 중 적어도 1종의 변형된 렐락신 및 1종 이상의 추가의 활성 성분을 포함하는 의약을 제공한다.

[0305] 조합물에 적합한 활성 성분은 예로서 지질 대사를 조정하는 활성 성분, 항당뇨병제, 혈압강하제, 관류-증진 및/또는 항혈전제, 항산화제, 케모카인 수용체 길항제, p38-키나제 억제제, NPY 효능제, 오렉신 효능제, 식욕억제제, PAF-AH 억제제, 항염증제 (COX 억제제, LTB_4-수용체 길항제), 진통제 예를 들어 아스피린, P2Y12 억제제 예컨대 클로피도그렐, PCSK9 억제제 예컨대 에볼로쿠맙 (레파타(REPATHA)) 또는 알리로쿠맙 (프라루엔트(PRALUENT)), 항우울제 및 다른 향정신제를 포함할 수 있다.

[0306] 본 개시내용은 추가로 적어도 1종의 변형된 렐락신 및 적어도 1종의 지질 대사-변경 활성 성분, 항당뇨병제, 혈압 감소 활성 성분 및/또는 항혈전 효과를 갖는 작용제의 조합물을 제공한다.

[0307] 변형된 렐락신은 1종 이상의 지질 대사-조정 활성 성분, 예를 들어 HMG-CoA 리덕타제 억제제, HMG-CoA 리덕타제 발현의 억제제, 스쿠알렌 합성 억제제, ACAT 억제제, LDL 수용체 유도제, 콜레스테롤 흡수 억제제, 중합체 담즙산 흡착제, 담즙산 재흡수 억제제, MTP 억제제, 리파제 억제제, LpL 활성화제, 피브레이트, 니아신, 니아신 수용체 효능제, CETP 억제제, PPAR-a, PPAR-^{Y} 및/또는 PPAR-δ 효능제, RXR 조정제, FXR 조정제, LXR 조정제, 갑상선 호르몬 및/또는 갑상선 모방체, ATP 시트레이트 리아제 억제제, Lp(a) 길항제, 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 렙틴 수용체 효능제, 봄베신 수용체 효능제, PCSK9 억제제, 히스타민 수용체 효능제 및 항산화제/라디칼 스캐빈저와 조합될 수 있다.

[0308] 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신은 스타틴의 부류, 예를 들어, 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 아토르바스타틴, 로수바스타틴 또는 피타바스타틴으로부터 HMG-CoA 리덕타제 억제제와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 스쿠알렌 합성 억제제, 예를 들어, BMS-188494 또는 TAK-475와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 ACAT 억제제, 예를 들어, 아바시미브, 멜리나미드, 팍티미브, 에플루시미브 또는 SMP-797과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 다른 변형된 렐락신은 콜레스테롤 흡수 억제제, 예를 들어, 에제티미브, 티퀘시드 또는 파마퀘시드와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 MTP 억제제, 예를 들어, 임플리타피드, BMS-201038, R-103757 또는 JTT-130과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 리파제 억제제, 예를 들어, 오를리스타트와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 갑상선 호르몬 및/또는 갑상선 모방체, 예를 들어, D-티록신 또는 3,5,3'-트리아이오도티로닌 (T3)과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 니아신 수용체의 효능제, 예를 들어, 니아신, 아시피목스, 아시프란 또는 라데콜과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 CETP 억제제, 예를 들어, 달세트라피브, BAY 60-5521, 아나세트라피브 또는 CETP 백신 (CETi-1)과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 예를 들어 티아졸리딘디온 부류로부터의 PPAR-^{Y} 효능제, 예를 들어, 피오글리타존 또는 로시글리타존과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 PPAR-δ 효능제, 예를 들어, GW-501516 또는 BAY 68-5042와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 중합체 담즙산 흡착제, 예를 들어, 콜레스티라민, 콜레스티폴, 콜레솔밤, 콜레스타겔 또는 콜레스티미드와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 담즙산 재흡수 억제제, 예를 들어, ASBT (= IBAT) 억제제, 예컨대, 예를 들어, AZD-7806, S-8921, AK-105, BARI-1741, SC-435 또는 SC-635와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 항산화제/라디칼 스캐빈저, 예를 들어, 프로부콜, AGI-1067, BO-653 또는 AEOL-10150과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 칸나비노이드 수용체 1 길항제, 예를 들어, 리모나반트 또는 SR-147778과 조합되어 투여된다.

[0309] 변형된 렐락신은 1종 이상의 항당뇨병제, 예를 들어, 인슐린 및 인슐린 유도체, 술포닐우레아, 비구아니드, 메글리티니드 유도체, 글루코시다제 억제제, PPAR-감마 효능제, 디펩티딜-펩티다제 IV의 억제제 (DPP-IV 억제제), 옥사디아졸리디논, 티아졸리딘디온, GLP 1 수용체 효능제, 글루카곤 길항제, 인슐린 감작제, CCK 1 수용체 효능제, 렙틴 수용체 효능제, 글루코스신생성 및/또는 글리코겐분해의 자극에 수반되는 간 효소의 억제제, 글루코스 흡수의 조정제 및 또한 칼륨 채널 개방제와 조합될 수 있다.

[0310] 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신은 인슐린 또는 인슐린 유도체와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 술포닐우레아, 예를 들어, 톨부타미드, 글리벤클라미드, 글리메피리드, 글리피지드 또는 글리클라지드와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 비구아니드, 예를 들어, 메트포르민과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 메글리티니드 유도체, 예를 들어, 레파글리니드 또는 나테글리니드와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 글루코시다제 억제제, 예를 들어, 미글리톨 또는 아카르보스와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 DPP-IV 억제제, 예를 들어, 시타글립틴 및 빌다글립틴과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 예를 들어 티아졸린디온 부류로부터의 PPAR-감마 효능제, 예를 들어, 피오글리타존 또는 로시글리타존과 조합되어 투여된다.

[0311] 변형된 렐락신은 1종 이상의 저혈압 활성 성분, 예를 들어, 칼슘 길항제, 안지오텐신 II 길항제, ACE 억제제, 레닌 억제제, 베타-수용체 차단제, 알파-수용체 차단제, 이뇨제, 알도스테론 길항제, 미네랄로코르티코이드 수용체 길항제, ECE 억제제, ACE/NEP 억제제 및 바소펩티다제 억제제와 조합될 수 있다.

[0312] 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신은 칼슘 길항제, 예를 들어, 니페디핀, 암로디핀, 베라파밀 또는 딜티아젬과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 안지오텐신 II 길항제, 예를 들어, 로사르탄, 발사르탄, 칸데사르탄, 엠부사르탄, 올메사르탄 또는 텔미사르탄과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서,

변형된 렐락신은 ACE 억제제, 예를 들어, 에날라프릴, 캅토프릴, 리시노프릴, 라미프릴, 델라프릴, 포시노프릴, 퀴노프릴, 페린도프릴 또는 트란도프릴과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 베타-수용체 차단제, 예를 들어, 프로프라놀롤, 아테놀롤, 티몰롤, 핀돌롤, 알프레놀롤, 옥스프레놀롤, 펜부톨롤, 부프라놀롤, 메티프라놀롤, 나돌롤, 메핀돌롤, 카라잘롤, 소탈롤, 메토프롤롤, 베탁솔롤, 셀리프롤롤, 비소프롤롤, 카르테올롤, 에스몰롤, 라베탈롤, 카르베딜롤, 아다프롤롤, 란디올롤, 네비볼롤, 에파놀롤 또는 부신돌롤과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 알파-수용체 차단제, 예를 들어, 프라조신과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 이뇨제, 예를 들어, 푸로세미드, 부메타니드, 토르세미드, 벤드로플루메티아지드, 클로로티아지드, 히드로클로로티아지드, 히드로플루메티아지드, 메티클로티아지드, 폴리티아지드, 트리클로로메티아지드, 클로로탈리돈, 인다파미드, 메톨라존, 퀴네타존, 아세타졸아미드, 디클로로페나미드, 메타졸아미드, 글리세롤, 이소소르비드, 만니톨, 아밀로리드 또는 트리암테렌과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 알도스테론 또는 미네랄로코르티코이드 수용체 길항제, 예를 들어, 스피로노락톤 또는 에플레레논과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 바소프레신 수용체 길항제, 예를 들어, 코니밥탄, 톨밥탄, 럭시밥탄 또는 SR-121463과 조합되어 투여된다.

[0313] 변형된 렐락신은 하기 중 1종 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 항혈전제, 예를 들어, 혈소판 응집 억제제 또는 항응고제; 이뇨제; 바소프레신 수용체 길항제; 유기 니트레이트 및 NO 공여자; 양성 수축촉진 활성을 갖는 화합물; 시클릭 구아노신 모노포스페이트 (cGMP) 및/또는 시클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP)의 분해를 억제하는 화합물, 예컨대, 예를 들어, 포스포디에스테라제 (PDE) 1, 2, 3, 4 및/또는 5의 억제제, 특히 PDE 5 억제제, 예컨대 실데나필, 바르데나필 및 타달라필, 및 또한 PDE 3 억제제, 예컨대 밀리논; 나트륨이뇨 펩티드, 예를 들어, "심방 나트륨이뇨 펩티드" (ANP, 아나리티드), "B-유형 나트륨이뇨 펩티드" 또는 "뇌 나트륨이뇨 펩티드" (BNP, 네시리티드), "C-유형 나트륨이뇨 펩티드" (CNP) 및 또한 우로딜라틴; 프로스타시클린 수용체 (IP 수용체)의 효능제, 예를 들어, 일로프로스트, 베라프로스트, 시카프로스트; If (퍼니 채널) 채널의 억제제, 예를 들어, 이바브라딘; 칼슘 감작제, 예컨대, 예로서, 레보시멘단; 칼륨 보충제; NO-비의존성이나, 헴-의존성 구아닐레이트 시클라제 자극제, 예를 들어, WO 00/06568, WO 00/06569, WO 02/42301 및 WO 03/095451에 개시된 화합물; NO- 및 헴-비의존성 구아닐레이트 시클라제 활성화제, 예를 들어, WO 01/19355, WO 01/19776, WO 01/19778, WO 01/19780, WO 02/070462 및 WO 02/070510에 기재된 화합물; 인간 호중구 엘라스타제 (HNE)의 억제제, 예를 들어, 시베레스타트 및 DX-890 (렐트란(Reltran)); 신호 전달 캐스케이드를 억제하는 화합물, 예를 들어, 티로신-키나제 억제제, 예를 들어, 소라페닙, 이마티닙, 게피티닙 및 에를로티닙; 및/또는 심장의 에너지 대사를 조정하는 화합물, 예를 들어, 에토목시르, 디클로로아세테이트, 라놀라진 및 트리메타지딘.

[0314] 일부 실시양태에서, 변형된 렐락신은 유기 니트레이트 또는 NO 공여자, 예를 들어, 소듐 니트로프루시드, 니트로글리세롤, 이소소르비드 모노니트레이트, 이소소르비드 디니트레이트, 몰시도민 또는 SIN-1와 조합되어, 또는 흡입 NO와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 양성-수축촉진 화합물, 예를 들어, 강심성 글리코시드 (디곡신), 베타-아드레날린성 및 도파민성 효능제, 예컨대 이소프로테레놀, 아드레날린, 노르아드레날린, 도파민 또는 도부타민과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 항교감신경 긴장제, 예컨대 레세르핀, 클로니딘 또는 알파-메틸도파와 조합되어, 또는 칼륨 채널 효능제, 예컨대 미녹시딜, 디아족시드, 디히드랄라진 또는 히드랄라진과 조합되어, 또는 질소 산화물을 방출하는 물질, 예컨대 글리세롤 니트레이트 또는 소듐 니트로프루시드와 함께 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 혈소판 응집 억제제, 예를 들어, 아스피린, 클로피도그렐, 티클로피딘 또는 디피리다몰과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 트롬빈 억제제, 예를 들어, 크시멜라가트란, 멜라가트란, 다비가트란, 비발리루딘 또는 크렉산과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 GPIIb/IIIa 길항제, 예를 들어, 티로피반 또는 압식시맙과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 인자 Xa 억제제, 예를 들어, 리바록사반 (BAY 59-7939), DU-176b, 아픽사반, 오타믹사반, 피덱사반, 라작사반, 폰다파리눅스, 이드라파리눅스, PMD-3112, YM-150, KFA-1982, EMD-503982, MCM-17, MLN-1021, DX 9065a, DPC 906, JTV 803, SSR-126512 또는 SSR-128428과 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 헤파린 또는 저분자량 (LMW) 헤파린 유도체와 조합되어 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 렐락신은 비타민 K 길항제, 예컨대, 예로서, 쿠마딘 (와파린)과 조합되어 투여된다.

[0315] 본 개시내용은 또한 적어도 1종의 변형된 렐락신을, 통상적으로 1종 이상의 불활성 비독성 제약상 적합한 보조제와 함께 포함하는 의약, 및 또한 상기 언급된 목적을 위한 그의 용도를 제공한다. 임의로 상기 의약은 상기 변형된 렐락신 및 또 다른 활성 성분, 예컨대 상기에서 확인되는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 의약은 상기 변형된 렐락신 및 또 다른 활성 성분을 심부전 및/또는 섬유증과 연관된 질환의 치료 또는 예방에 효과

적인 양으로 포함할 수 있다.

[0316] 실시예

[0317] 실시예 1: 프리프로렐락신 내로의 비-자연 코딩 아미노산의 리보솜에 의한 혼입

[0318] 본 실시예는 이. 콜라이에서의 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 렐락신 폴리펩티드의 클로닝 및 발현을 예시한다.

[0319] 렐락신을 클로닝하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 렐락신에 대한 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열 및 렐락신을 숙주 세포 내로 클로닝하는 것은 미국 특허 번호 4,758,516; 미국 특허 번호 5,166,191; 미국 특허 번호 5,179,195, 5,945,402; 및 5,759,807에 보다 상세화되어 있고; 이는 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0320] 렐락신을 코딩하는 cDNA는 서열식별번호: 12와 같이 제시되고, 성숙 폴리펩티드 아미노산 서열은 서열식별번호: 1과 같이 제시된다. 예시적인 렐락신 서열이 표 1에 제공된다.

[0321] 표 1: 렐락신 서열

SEQ ID NO:	서열 명칭	서열
1	렐락신 아미노산 서열 (A 및 B 쇄)	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	렐락신 아미노산 서열 B1 Ala (A 및 B 쇄)	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	예시적인 프로-렐락신 아미노산 서열	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQ VELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCT KRSLARFC
4	렐락신 A 쇄, 아미노산 서열	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	렐락신 B 쇄, 아미노산 서열	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	렐락신 B 쇄, 아미노산 서열, B1 Ala 포함	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	예시적인 C 펩티드 (연결 펩티드) 아미노산 서열	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	예시적인 렐락신 리더 아미노산 서열	MKKNIAFLLKR
9	예시적인 인슐린 리더 아미노산 서열	MIEGGR
10	예시적인 렐락신 A 쇄, 핵산 서열	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaagatctcttgctagatt ttgc
11	예시적인 렐락신 B 쇄, 핵산 서열	gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagattgccat ttgcggcatgagcacctggagc
12	예시적인 렐락신, A 및 B 쇄, 핵산 서열	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaagatctcttgctagatt ttgc gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagattgccat ttgcggcatgagcacctggagc
13	예시적인 렐락신 리더	atgaaaaagaatatcgcatttcttcttaaacgg

[0322]

	핵산 서열	
14	예시적인 인슐린 리더 핵산 서열	atgattgaaggtggtcgt
15	렐락신 발현 구축물 아미노산 서열의 예	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
35	위치 1에서 파라-아세틸-L-페닐알라닌에 의해 치환된 렐락신 A 쇄	(pAcF)LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
36	위치 1에서 아스파라긴에 의해 치환된 렐락신 A 쇄	NLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
37	위치 25에서 파라-아세틸 페닐알라닌에 의해 치환된 렐락신 B 쇄	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG(pAcF)STWS
38	예시적인 프리프로-렐락신 발현 서열 (X는, 예를 들어, pAcF일 수 있음)	MIEEGR ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQGR XLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
39	예시적인 인슐린 리더 아미노산 서열	MIEEGR

[0323]

[0324] 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 렐락신 또는 렐락신 유사체를 발현시키기 위해 직교 tRNA (O-tRNA) 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제 (O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템이 사용된다. O-RS는 O-tRNA를 비-자연 코딩 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화한다. 결국에는 번역 시스템이 코딩된 선택자 코돈에 대한 반응으로 비-자연 코딩 아미노산을 렐락신 또는 렐락신 유사체에 삽입한다. 적합한 O-RS 및 O-tRNA 서열은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO 2006/068802 표제 "아미노아실-tRNA 신테타제의 조성물 및 그의 용도" (E9; 서열식별번호: 16) 및 WO 2007/021297 표제 "tRNA의 조성물 및 그의 용도" (F13; 서열식별번호: 17)에 기재되어 있다. 사용될 수 있는 예시적인 서열이 표 2에 예시된다.

[0325] 표 2: 발현 시스템에서 사용된 서열

SEQ ID NO:18	*엠. 잔나쉬이* $mtRNA_{CUA}^{Tyr}$	tRNA
SEQ ID NO:19	*HLAD03; 최적화된 앰버 억제자 tRNA*	tRNA
SEQ ID NO:20	*HL325A; 최적화된 AGGA 프레임시프트 억제자 tRNA*	tRNA
SEQ ID NO:21	*p-아지도-L-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(6)*	RS
SEQ ID NO:22	*p-벤조일-L-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-BpaRS(1)*	RS
SEQ ID NO:23	*프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS*	RS
SEQ ID NO:24	*프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS*	RS
SEQ ID NO:25	*프로파르길-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 프로파르길-PheRS*	RS
SEQ ID NO:26	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(1)*	RS
SEQ ID NO:27	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(3)*	RS
SEQ ID NO:28	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(4)*	RS
SEQ ID NO:29	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 p-Az-PheRS(2)*	RS
SEQ ID NO:30	*p-아세틸-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW1)*	RS
SEQ ID NO:31	*p-아세틸-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW5)*	RS
SEQ ID NO:32	*p-아세틸-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (LW6)*	RS
SEQ ID NO:33	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (AzPheRS-5)*	RS
SEQ ID NO:34	*p-아지도-페닐알라닌의 혼입을 위한 아미노아실 tRNA 신테타제 (AzPheRS-6)*	RS

[0326]

[0327] 그 전문이 본원에 포함되는 미국 특허 번호 8,735,539에 기재된 바와 같이, 변형된 렐락신 또는 렐락신 유사체 유전자 및 직교 아미노아실 tRNA 신테타제/tRNA 쌍 (목적하는 비-자연 코딩 아미노산에 대하여 특이적임)을 함유하는 플라스미드에 의한 이. 콜라이의 형질전환은 비-자연 코딩 아미노산의 렐락신 폴리펩티드로의 부위-특이적 혼입을 가능하게 한다.

[0328] 표준 프로토콜을 사용하여 cDNA 합성 반응으로부터 PCR에 의해 야생형 성숙 렐락신을 증폭시키고, 플라스미드 벡터, 예컨대 pET30 (NcoI-BamHI) 내로 클로닝한다. 렐락신 서열을, 이. 콜라이 지단백질 프로모터 서열로부터 유래된 합성 프로모터의 구성적 제어 하의 메타노코쿠스 잔나쉬이로부터의 앰버 억제자 티로실 tRNATyr/CUA (Mj tRNATyr/CUA) (Miller, J.H., Gene, 1986), 뿐만 아니라 이. 콜라이 GlnRS 프로모터의 제어 하의 직교 티로실-tRNA-신테타제 (MjTyrRS) (예를 들어 E9)를 함유하는 억제 벡터 내로 서브클로닝한다. 렐락신의 발현은 T7 프로모터의 제어 하에 있고, 이는 L-아라비노스에 의해 간접적으로 유도된다. 앰버 돌연변이는 표준 급속 변화 돌연변이 프로토콜 (스트라타진(Stratagene); 캘리포니아주 라호야)을 사용하여 도입된다. 구축물은 검증된 서열이다.

[0329] 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF)에 의한 억제

[0330] 앰버 돌연변이를 포함하는 변형된 렐락신 유전자 (A 쇄 잔기 1에서 pAcF를 갖는 서열식별번호: 38을 코딩함, 도 4 참조) 및 상기 기재된 바와 같은 직교 아미노아실 tRNA 신테타제/tRNA 쌍을 함유하는 플라스미드를 사용하여 에스케리키아 콜라이 균주 W3110B55 [F- IN (rrnD-rrnE) lambdaaraB::g1 tetA fhuA::dhfr proS W375R::cat]을 형질전환시켜 T7 폴리머라제의 발현이 아라비노스-유도성 프로모터의 제어 하에 있는 이. 콜라이 균주를 생산하였다. 밤샘 박테리아 배양물을 2X YT 배양 배지를 함유하는 진탕 플라스크 내에서 1:100으로 희석하고, 37℃에서 OD_{600} ~ 0.8로 성장시켰다. 아라비노스 (0.2% 최종), 및 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAcF)의 4 mM의 최종 농도로의 첨가에 의해 단백질 발현을 유도하였다. 배양물을 37℃에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠릿화하고, B-PER 용해 완충제 (피어스(Pierce)) 100ul/OD/ml + 10ug/ml DNase 중에 재현탁시키고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포 물질을 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 제거하였다. 펠렛을 동등한 양의 SDS-PAGE 단백질 로딩 완충제에 재현탁시켰다. 모든 샘플을 MES 및 DTT가 존재하는 4-12% PAGE 겔 상에 로딩하였다. 렐락신의 발현을 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 분석, 또는 전기분무-이온화 이온 트랩 질량 분광측정법 등에 의해 확인하였다.

[0331] 변형된 렐락신 유전자 서열은 N-말단 His 태그, 예를 들어, HHHHHHSGG (서열식별번호: 55)를 포함할 수 있다. His-태그부착된 돌연변이체 렐락신 단백질을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 프로본드(ProBond) 니켈-킬레이트화 수지 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)를 제조업체에 의해 제공된 표준 His-태그부착된 단백질 정제 절차를 통해 사용할 수 있다. 단백질의 기능적 측정은 관련 기술분야에 공지된 방법, 본 출원 내에 제공된 방법 및 참고문헌에 포함된 방법을 통해 행해질 수 있고, 대안적으로 살아있는 세포에 대한 ELISA가 본 발명의 렐락신 폴리펩티드를 평가하기 위해 개발될 수 있다.

[0332] 실시예 2: 비-자연 코딩 아미노산을 함유하는 성숙 렐락신의 생산 및 정제

[0333] 프리프로렐락신 (A 쇄 잔기 1에서 pAcF를 갖는 서열식별번호: 38, 도 4 참조)는 이. 콜라이 세포에서의 발효에 의해 봉입체로서 생산되었다. 비-자연 코딩 아미노산 파라-아세틸-페닐알라닌을 실시예 1에 제공된 일반적 방법을 사용하여 리보솜에 의해 혼입시켰다.

[0334] 변형된 렐락신 폴리펩티드를 발현하는 플라스미드를 함유하는 이. 콜라이 세포를 발효 배지를 함유하는 발효기에서 성장시켰다. 카나마이신을 발효기에 첨가하여 플라스미드 안정성을 촉진시켰다. L-알라닌-L-파라-아세틸페닐알라닌 히드로클로라이드 (L-Ala-pAcF)를 발효기에 첨가하여 프리프로렐락신 아미노산 서열에의 p-아세틸페닐알라닌 (pAcF)의 혼입을 가능하게 하였다. 최종적으로, L-아라비노스를 첨가하여 프리프로렐락신 표현을 유도하였다. 세포 내에서 생산된 프리프로렐락신은 불용성 봉입체 (IB)의 형성을 유도하였다. 발효 브로쓰를 유도-후 지속기간 후에 수거하였다. 발효 적정은 발효 L당 프리프로렐락신이 대략 4.5 g였다.

[0335] 고전단 하에 세포를 용해시킴으로써 무손상 세포로부터 봉입체 (IB)를 분리하였다. 무손상 IB를 원심분리에 의해 회수하였다. 회수 후, IB 펠릿을 물에 재현탁시키고, 재-원심분리하여 불순물을 제거하였다. 세척된 IB를 5 mM 디티오트레이톨 (DTT)을 함유하는 5M 구아니딘/트리스 완충제 중에서 pH 8.5에서 가용화시켰다. 프리프로렐락신의 리폴딩은 가용화된 IB 용액을 5 mM DTT 및 8.5 mM 시스타민을 함유하는 냉각된 pH 8.5 트리스 완충제 내로 대략 4.5배 천천히 희석함으로써 달성되었다. 리폴딩 용액을 최소 12시간 동안 인큐베이션한 후, 프로세싱을 계속하였다. 인큐베이션 기간이 완료된 후, 아세트산 및 염산의 첨가에 의해 pH를 3.5-4.0으로 강하시켜 불순물의 침전을 촉진시켰다. 침전된 물질을 원심분리에 이어서 심층 여과에 의해 제거하였다.

[0336] 심층 여과된 리폴딩 용액을 pH 4 아세테이트 완충제로 대략 6.5배 희석하여, 토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience) SP550C 양이온 교환 칼럼 상에 로딩하기 위해 제제의 전도도를 감소시켰다. 로딩 후, SP550C 칼럼을 세척한 다음, 프리프로렐락신을 1M NaCl을 함유하는 50 mM 아세테이트 pH 5.5 완충제의 10% - 90% 구배를 사용하여 용리시켰다. SP550C 용리액을 프리프로렐락신 농도가 1.5 mg/mL가 될 때까지 정제수로 희석하였다. 2 M 트리스, pH 8.0을 첨가하여 pH를 8.0으로 조정한 후, 효소적 전환을 위한 제제에 2 mM CaCl2를 첨가하였다.

[0337] 야생형 트립신을 숙신산 무수물로 변형시켜 (즉, 숙시닐화하여), 트립신 처리 단계 완료 시 프리프로렐락신/트립신 반응 혼합물로부터의 제거를 용이하게 하였다. 10 mM HCl, 20 mM CaCl2 중의 농축된 야생형 트립신을 정제수를 사용하여 5 mg/mL로 희석한 다음, 1M pH 7.6 보레이트 완충제를 0.2M의 최종 농도로 첨가하였다. 고체 숙신산 무수물을 희석된, pH 조정된 트립신 용액에 트립신보다 100 몰 과량으로 3회 등몰 첨가 (3 x 33.3 몰 과량 첨가)로 각각의 첨가 사이에 10분 동안 혼합하면서 첨가하였다.

[0338] 숙시닐화된 트립신을 22℃에서 4시간 동안 인큐베이션된 프리프로렐락신 용액에 첨가하여 프리프로렐락신 분자

의 연결 펩티드 및 리더 서열의 완전한 효소적 제거를 보장하였다. 생성된 렐락신-R 분자는 B-쇄 상에 C-말단 아르기닌을 함유한다. 다음으로, 트립신 처리된 물질을 숙시닐화된 트립신에 결합하는 사르토바인드(Sartobind) STIC® PA 음이온 교환 필터를 통해 처리하는 한편, 렐락신-R을 관통에서 수집하였다. 카르복시펩티다제-B (CPB)를 STIC® PA 여과물에 첨가하고, 2시간 동안 교반하면서 인큐베이션하여 B-쇄 C-말단 아르기닌 잔기의 완전한 효소적 제거를 보장하였다. 반응 혼합물의 pH를 2.8-3.2로 강하시킴으로써 CPB 반응을 켄칭시켰다.

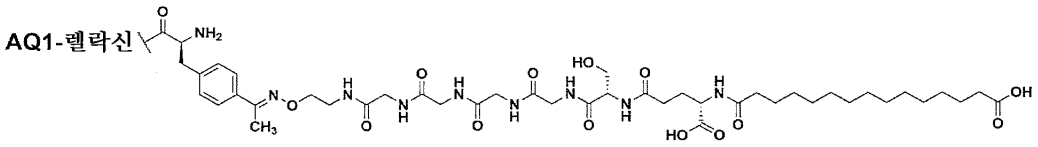
[0339] 성숙 렐락신을 토소 바이오사이언스 SP-5PW 양이온 교환 수지를 사용하여 정제하였다. 성숙 렐락신을 칼럼 상에 로딩한 다음, 3회 칼럼 세척하였다; 1) 50 mM 아세테이트 pH 5.5, 2) 50 mM 아세테이트 pH 5.5, 0.1 M NaCl 및 3) 50 mM 아세테이트 pH 4.0. 결합된 렐락신을 20 칼럼 부피에 걸쳐 0%에서 100% 2M KCl의 선형 구배를 사용하여 pH 4에서 용리하였다. 용리된 렐락신 용액을 추가의 처리 전에 1M HCl을 사용하여 pH를 3.0으로 조정하였다. 대안적으로, 트립신을 침전에 의해 반응 혼합물로부터 제거하였다. 반응 혼합물의 pH를 1시간 동안 실온에서 8.0으로 증가시킨 후, 렐락신을 침전시켰다. 이어서, 침전된 렐락신을 원심분리에 의해 회수하였다. 펠릿을 pH 8 트리스 완충제 중에 재현탁시킨 후 원심분리함으로써 펠릿을 3회 세척하였다. 최종 세척 후, 펠릿을 20 mM 아세트산 중에 재용해시켰다. 정제된 렐락신은 임의의 트립신 활성을 나타내지 않았다. 최종 생성물은 성숙 렐락신이었다.

[0340] 본질적으로 동일한 합성 방법을 사용하여 프리프로렐락신 서열의 적절한 변형을 갖는 RLX-AQ1 ("AQ1") (도 2) 및 RLX-BM25/AN1 ("BM25/AN1") (도 3)을 생산하였다.

[0341] 실시예 3: 지방산에 연결된 펩티드를 포함하는 PK 인핸서에 대한 렐락신의 접합

[0342] 정제된 렐락신을 한외여과에 의해 대략 10 mg/mL로 농축시켰다. 펩티드 및 C15 지방산을 포함하는 아미노옥시 활성화된 PK 인핸서 (예를 들어, GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH)를 반응 혼합물에 렐락신보다 1.5 몰 과량으로 첨가하였다. 이어서, 히드라지드 첨가제 (즉 4 아미노-벤조히드라지드)를 렐락신보다 45 몰 과량으로 첨가하였다. 용액을 필요에 따라 1 M HCl로 조정하여 pH를 3.5 내지 4.0으로 유지하고, 온도를 30℃로 제어하였다. 접합 반응은, 실시예 4에 기재된 절차에 따라 제조된 바와 같은, C15 지방산에 연결된 펩티드 링커 (예를 들어, GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH) 및 렐락신 중의 파라-아세틸-페닐알라닌 잔기 사이에 안정한 옥심 결합을 형성하였다. 반응은 16시간 내에 완료되었다.

[0343] 접합 반응 혼합물을 10 mM pH 4.0 아세테이트 완충제를 사용하여 ≤ 4 mS/cm로 희석한 후, 지이 헬스케어(GE Healthcare) SP HP 양이온 교환 칼럼 상에 로딩하였다. 로딩이 완료된 후, 칼럼을 20 mM 히스티딘 pH 6.0으로 세척하여 불순물을 제거하였다. 이어서, 렐락신-C15 접합체 (예를 들어, AQ1-렐락신-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH를 포함함)를 50 mM 중탄산암모늄, pH 8.5로 용리시켰다. 성숙 렐락신의 구조를 도 5 및 하기 화학식 III에 개략적으로 예시한다:



(화학식 III)

[0344]

[0345] 정제된 렐락신-C15 접합체를 농축시킨 다음, 적절한 최종 제제 완충제 내로 투석여과하였다. 접합체의 예시적인 조성은 20 mM 히스티딘, 0.25 M 수크로스, 0.05% (w/v) 폴리소르베이트-80, pH 5.5 중 8 mg/mL 렐락신-C15 접합체이다. 조성물은 ≤ -60℃에서 동결 저장된다.

[0346] 다른 렐락신-지방산 접합체를 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0347] 실시예 4: PK 인핸서의 고체 상 합성

[0348] 본원에 개시된 PK 인핸서를 하기 예시된 절차를 사용하여 제조할 수 있다.

[0349] 특히 하기 예시된 반응식 및 실시예를 포함하여 본원에 사용된 약어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 사용된 약어의 일부는 다음과 같다: min은 분; h는 시간; rt은 실온; sat.는 포화; TFA는 트리플루오로아세트산; DMF는 N,N-디메틸포름아미드; DCM은 디클로로메탄; Fmoc는 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐; HATU

1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트; DIEA 또는 DIPEA는 디이소프로필에틸아민; NMP는 N-메틸피롤리돈; EDC는 I-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드; DMSO는 디메틸술폭시드; MeOH는 메탄올; EtOAc는 에틸 아세테이트; Et3N은 트리에틸아민; MeCN 또는 ACN는 아세토니트릴.

[0350] 분석 데이터: 질량 분광측정법: "ESI-MS(+)"는 양이온 방식으로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-MS(-)"는 음이온 방식으로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(+)"는 양이온 방식으로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(-)"는 음이온 방식으로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미한다. 검출된 질량은 "m/z" 단위 지정에 따라 보고된다. 1000 초과의 정확한 질량을 갖는 화합물은 종종 이중-하전된, 삼중-하전된 이온 및/또는 사중-하전된 이온으로서 검출되었다. CAD: 하전된 에어로졸 검출기. ELSD: 증발성 광 산란 검출기.

[0351] 분석 LCMS 조건 A: 칼럼: 워터스 액퀴티 UHPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 0.05% TFA 포함; 온도: 50℃; 구배: 3분에 걸쳐 0-100% B, 이어서 100% B에서 1.0-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 질량.

[0352] 분석 LCMS 조건 B: 칼럼: 워터스 액퀴티 UHPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50℃; 구배: 3분에 걸쳐 0-100% B, 이어서 100% B에서 1.0-분 유지; 유량: 1.0 mL/분; 검출: 질량.

[0353] 분석 UHPLC-CAD 조건 A: 칼럼: 워터스 BEH 페닐, 150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분 내지 15분 동안 10% B에서 35% B, 16분 내지 25분 동안 35% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 1.0분 유지; 후 실행 시간: 4분 (초기 이동상 조건하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: DMSO 중 2mg/mL 샘플 3 μL; 검출: CAD, 100 PA 범위 및 35 psi 기체.

[0354] 분석 UHPLC-CAD 조건 B: 칼럼: 워터스 BEH 페닐, 150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분 내지 25분 동안 10% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 1.0분 유지; 후 실행 시간: 4분 (초기 이동상 조건 하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: DMSO 중 2mg/mL 샘플 3 μL; 검출: CAD, 100 PA 범위 및 34 psi 기체.

[0355] 일반적 절차:

[0356] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스(Protein Technologies)) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 달리 언급되지 않는 한 하단 프릿이 피팅된 40 mL 폴리프로필렌 반응 용기에서 수행하였다. 용기를 용기의 하단 및 상단 둘 다를 통해 프렐류드 펩티드 합성기에 연결하였다. DMF를 용기의 상단 및 하단을 통해 첨가할 수 있고, 이는 용기의 측면 위 및 아래를 동등하게 세척한다. 시약을 용기의 하단을 통해서만 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지와 접촉시켰다. 모든 용액을 용기의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N_2 기체의 단기 펄스를 기재하고; 펄스는 대략 5초 지속되고, 30초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 2주를 넘어서는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조 2주 내에 사용하였다. DMF = 디메틸포름아미드; HATU = 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트; DIPEA = 디이소프로필에틸아민; 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 = 2-클로로트리페닐메틸 클로라이드 수지 (켐-임프렉스(Chem-Imprex), 100 - 200 메쉬, 황색 비드, 1.1 meg/g). 사용된 통상의 아미노산이 하기 열거되며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 표시된다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Thr(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Val-OH. 가장 마지막 커플링 단계를 위해 하기 지방산 유도체, $HO_2C(CH_2)_nCH_3$, n = 10 - 18, 및 $HO_2C(CH_2)_n(CO_2{}^tBu)$, n = 10 - 18를 사용하였다.

[0357] 일반적 절차는 0.4 mmol 규모로 수행되는 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 (9H-플루오렌-9-일)메틸 (2-(아미노옥시)에틸)카르바메이트의 양에 의해 결정되었다. 이러한 규모는 상기 기재된 수지의 대략 364 mg에 상응한다. 그러나, 46%의 로딩 효율의 가정에 기초하여 800 mg의 수지를 사용하였다. 과량의 2-클로로트

리페닐메틸 클로라이드를 로딩 반응의 종료 시에 메탄올에 의해 켄칭하였다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.400 mmol 규모로부터 하향 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 펩티드 합성 서열은 하기 "링커 로딩 절차" 및 "수지-팽윤 절차"로서 기재된 링커 로딩 절차 및 수지-팽윤 절차로 시작되었다. 이어서, 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "1급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급-커플링 절차"를 사용하였다. 전반적 탈보호 및 수지로부터의 절단은 하기 기재된 "전반적 탈보호 절차"를 사용하였다. 마지막으로, LC-MS 정제를 위한 조 생성물을 함유하는 투명한 용액의 제조는 하기 기재된 "샘플 제조 절차"를 사용하였다.

[0358] 링커-로딩 절차: 규모 0.4 mmol을 사용하여 각각의 반응 용기 (RV)에서 수지에 대해 0.4 mmol의 (9H-플루오렌-9-일)메틸 (2-(아미노옥시)에틸)카르바메이트의 로딩을 갖는 6개의 RV를 제조하였다. DIEA (2.95 mL, 16.9 mmol)를 CH_2Cl_2 (72 mL) 중의 (9H-플루오렌-9-일)메틸 (2-(아미노옥시)에틸) 카르바메이트 히드로클로라이드 (화합물 4, 0.803 g, 2.4 mmol)의 혼합물에 0℃에서 첨가하였다. 이것이 균질해진 직후에, 이러한 투명한 용액 12 mL를 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 800 mg을 함유하는 30 mL 바이알에 첨가하였다. 모든 6개의 바이알을 진탕기 상에 750 rpm에서 75분 동안 두었다. 이어서, MeOH 0.2 mL를 1개의 바이알에 한 번에 첨가하고, 각각 750 rpm에서 2분 동안 진탕시켰다. 수지를 40 mL RV로 옮기고, CH_2Cl_2 (8 mL x 3), DMF (8 mL x 3), CH_2Cl_2 (10 mL x 3)로 세척하였다. 이 방법 (MeOH 켄칭 및 CH_2Cl_2/DMF/CH_2Cl_2 세척)을 다른 5개의 바이알에 적용하여, 6개의 RV에 수지 결합된 링커 화합물 5를 수득하였다.

[0359] 수지-팽윤 절차: 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 RV를 프렐류드 펩티드 합성기에 연결하고, 다음과 같이 3회 세척 (팽윤)하였다: RV에 DMF (10 mL)를 첨가하고, 그 후 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 후, 프릿을 통해 용매를 배수시켰다.

[0360] 1급 아민-커플링 절차:

[0361] 이전 단계로부터의 수지가 들은 RV에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 10.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. RV에 다시 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 10.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 1회 하단-세척하였다: DMF (10.0 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (10.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. RV에 아미노산 또는 지방산 (DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량), HATU (DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량), 및 DIPEA (DMF 중 0.8 M, 2.0 mL, 4 당량)를 그러한 순서로 첨가하였다. 혼합물을 15분 또는 30분 동안 주기적으로 교반하고, 이어서 반응 혼합물 용액을 프릿을 통해 배수시켰다 (15분 반응 시간은 오직 프렐류드 합성기 상에서 제1 아미드 결합을 형성하기 위해 가장 처음의 커플링 반응의 경우에만 사용함; 모든 다른 서열의 경우, 30분 반응 시간을 적용함). 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (8.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. RV에 DMF (3.3 mL), DIPEA (DMF 중 0.8 M, 1.5 mL, 3 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30초 동안 교반한 후, 아세트산 무수물 (DMF 중 1.0 M, 5.0 mL, 12.5 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 1회 하단-세척하였다: DMF (10.0 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (10.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0362] 2급 아민-커플링 절차:

[0363] 이전 단계로부터의 수지가 들은 RV에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 10.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. RV에 다시 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 10.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 1회 하단-세척하였다: DMF (10.0 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (10.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 반응 용기에 아미노산 또는 지방산 (DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량), HATU

(DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량), 및 DIPEA (DMF 중 0.8 M, 2.0 mL, 4 당량)를 이러한 순서로 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (8.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 반응 용기에 다시 아미노산 또는 지방산 (DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량), HATU (DMF 중 0.2 M, 4.0 mL, 2 당량) 및 DIPEA (DMF 중 0.8 M, 2.0 mL, 4 당량)를 이러한 순서로 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (8.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. RV에 DMF (3.3 mL), DIPEA (DMF 중 0.8 M, 1.5 mL, 3 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30초 동안 교반한 후, 아세트산 무수물 (DMF 중 1.0 M, 5.0 mL, 12.5 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 1회 하단-세척하였다: DMF (10.0 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 상단-세척하였다: 각각의 세척의 경우, DMF (10.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 2분 동안 주기적으로 교반한 후, 용액을 프릿을 통해 배수시켰다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

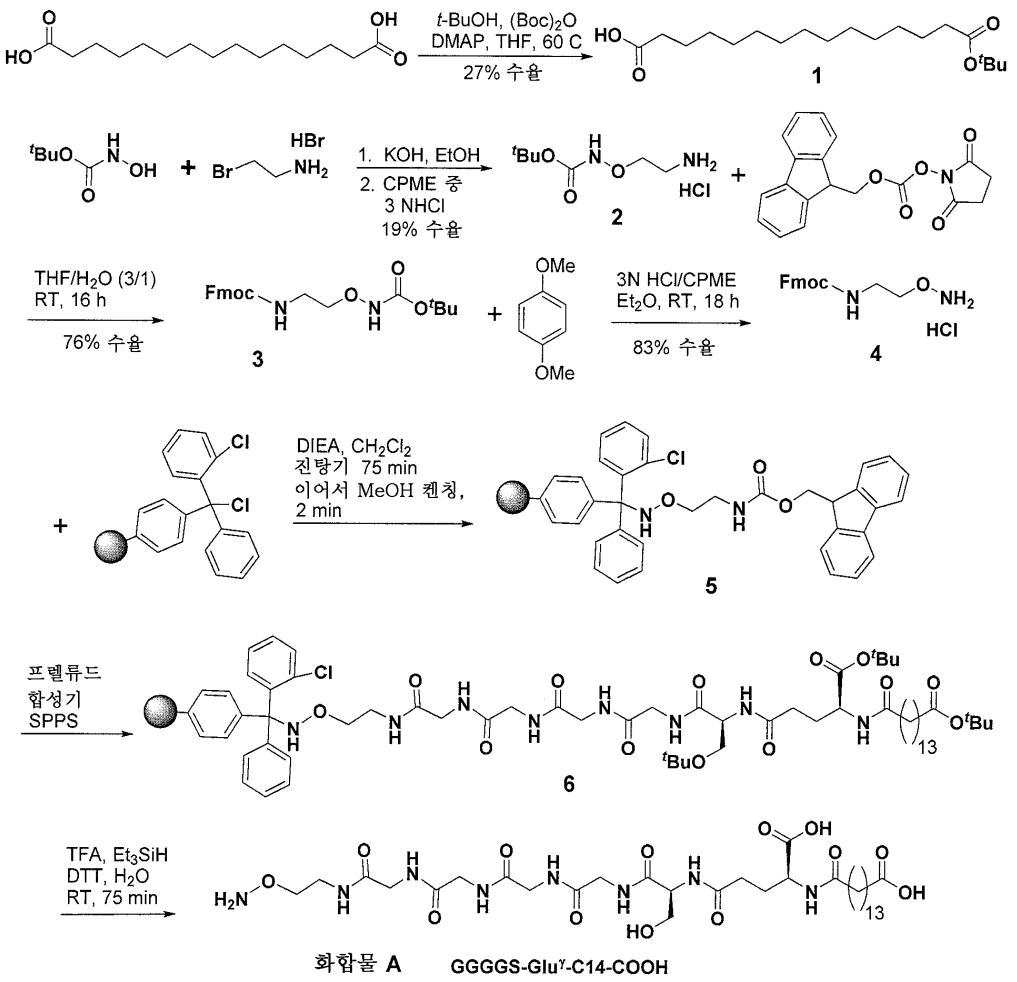
[0364] 전반적 탈보호 절차:

[0365] 프렐류드 상의 절차를 종료한 후, 각각의 RV를 CH_2Cl_2 (8 mL x 6)로 세척하고, 공기 건조되게 하였다. 수지가 자유 유동하면, 이를 30 mL 바이알로 옮기고, 8 mL의 절단 용액 (하기 참조)을 첨가하였다. 바이알을 진탕기에서 750 rpm에서 75분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 여과하였다. 생성된 투명한 황갈색 용액을 각각 16 mL의 디에틸 에테르를 함유하는 4개의 25 mL 시험 튜브로 나누었고, 백색 현탁액이 형성되었다. 각각을 원심분리하고, 디에틸 에테르로 2회 세척하였고, 각각의 시험 튜브에서 백색 고체가 형성되었다. 절단 용액 (50 mL)을 다음과 같이 제조하였다: 250 ml 삼각 플라스크에 500 mg 디티오트레이톨, 46 mL TFA, 2.5 mL 물 및 1.0 mL 트리이소프로필실란을 교반하면서 첨가하였고, 투명한 용액이 형성되었다.

[0366] 샘플 제조 절차:

[0367] 이전 단계로부터 수득된 조 생성물을 함유하는 각각의 시험 튜브에 순서대로 0.4 mL DMSO 및 0.4 mL MeOH를 첨가하였다. 1분 동안 교반한 후, 많은 경우에 투명한 용액이 형성되었다. 그러나, 시험 튜브에 고체가 여전히 존재하는 경우, 추가의 DMSO (0.2 mL)를 첨가하고, 혼합물을 2분 동안 교반하였다. 이 시점에서, 고체가 남아 있는 경우, 투명한 용액을 제거하고, 추가의 DMSO (최대 1.0 mL)를 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 주입당 2.0 mL로 정제용 LC-MS에 적용하였다.

화합물 A의 합성

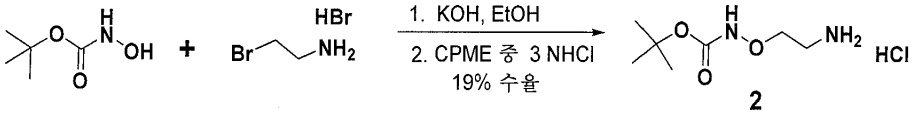


[0368]

[0369] DMAP (2.80 g, 23.0 mmol)를 2-Me-THF (250 mL) 중 펜타데칸디오산 (25.0 g, 92.0 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 교반한 후, tert-부탄올 (13.2 mL, 138 mmol)을 첨가하고, 교반을 실온에서 10분 동안 계속하였다. 생성된 현탁액을 60℃에서 10분 동안 가열한 후, 이는 투명한 무색 용액이 되었다. THF (100 mL) 중 BOC-무수물 (26.0 g, 119 mmol)의 용액을 압력-평형화된 첨가 깔때기로 2시간에 걸쳐 상기 반응 혼합물에 60℃에서 첨가하였다. 첨가 종료 즈음에, 반응 혼합물은 담분홍색의 투명한 용액이 되었다. 60℃에서 18시간 동안 계속 교반하였다. 0℃로 냉각시킨 후, 100 mL의 1.5 N HCl을 5분에 걸쳐 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온으로 가온하고, 15분 동안 교반하였다. 분리 후, 유기 층을 염수 (250 mL x 2)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 생성된 물질을 아세토니트릴 (250 mL) 중에 현탁시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하고, 여과하여 미반응 이산 출발 물질을 제거하였다. 이어서, 여과물을 대략 125 mL로 농축시켰다. 생성된 현탁액을 0℃에서 2시간 동안 교반하였고, 시간의 경과에 따라 더 흐려졌다. 생성된 고체를 여과하고, 차가운 (0℃) 아세토니트릴 (2 x 15 mL)로 세척하고, 건조시켜 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (화합물 1, 8.20 g, 25.0 mmol, 27.2% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.

[0370] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 2.35 (t, J = 7.58 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 7.46 Hz, 2H), 1.68 - 1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34 - 1.24 (m, 18H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 179.91, 173.44, 79.93, 35.64, 34.08, 29.57, 29.48, 29.46, 29.41, 29.39, 29.29, 29.23, 29.09, 29.06, 28.12, 25.12, 24.70.

[0371] 하기 화합물, $HO_2C(CH_2)_nCO_2{}^tBu$, n = 10 -18을 상기 절차에 따라 제조하였다. 목적 생성물 - 미반응 이산 $HO_2C(CH_2)_nCO_2H$로부터의 모노 에스테르 $HO_2C(CH_2)nCO_2{}^tBu$ 및 과다반응 디에스테르 $^tBuO_2C(CH_2)_nCO_2{}^tBu$의 분리를, 각 경우에, 그의 아세토니트릴 중에서의 상이한 용해도를 사용하여 달성하였다.

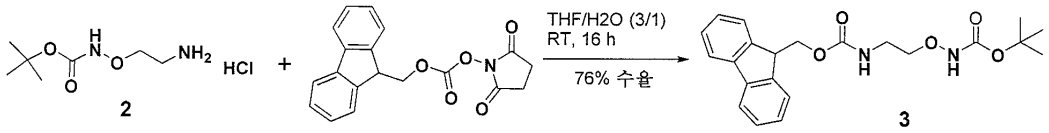


2

[0372]

[0373] 수산화칼륨 (74.1 g, 1122 mmol)을 기계적 교반기를 사용하여 0℃에서 무수 에탄올 (500 mL) 중 tert-부틸 N-히드록시카르바메이트 (50.0 g, 376 mmol)의 투명한 용액에 10분에 걸쳐 여러 부분으로 첨가하였다. 0℃에서 10분 동안, 이어서 실온에서 20분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 0℃로 냉각시키고, 2-브로모에틸아민 히드로브로마이드 (100 g, 488 mmol)를 15분에 걸쳐 조금씩 첨가하였다. 0℃에서 30분 동안, 이어서 실온에서 5시간 동안 교반한 후, 생성된 백색 현탁액을 여과하고, 필터 케이크를 EtOH (40 mL x 2)로 세척하였다. 합한 여과물을 100 mL의 부피로 농축시키고, t-BuOMe (500 mL) 및 H_2O (250 mL)로 추출하였다. 분리 후, 수성 층을 t-BuOMe (200 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (2 x 200 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜, 매우 점성인 액체 (20.0 g)를 수득하였다. 생성된 액체를 t-BuOMe (300 mL) 중에 용해시켰다. HCl (시클로펜틸메틸 에테르 중 3 M) (40 mL, 120 mmol)을 상기 투명한 용액에 실온에서 적가하였다. 백색 현탁액이 형성되었다. 실온에서 4시간 동안 교반한 후, 생성된 백색 고체를 여과하고, t-BuOMe로 세척하고, 45분 동안 진공 하에 건조시켜 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (화합물 2, 15.5 g, 72.9 mmol, 19.4% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0374] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 10.21 (br s, 1H), 8.27 (br s, 2.6H), 3.92 (t, J = 5.26 Hz, 2H), 2.98 (t, J = 5.26 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 157.10, 80.79, 72.00, 37.46, 28.46.

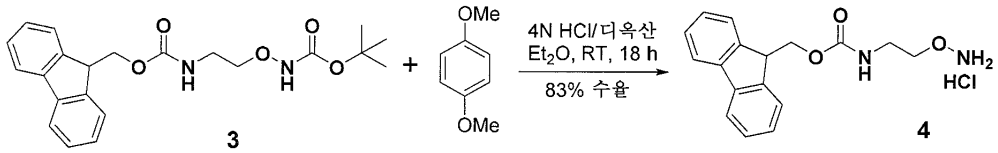


2 3

[0375]

[0376] 중탄산나트륨 (8.00 g, 95 mmol)을 THF (450 mL) 및 물 (150 mL) 중 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (화합물 2, 13.5 g, 63.5 mmol), Fmoc-OSu (25.7 g, 76.0 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하였다. 수성 층을 고체 NaCl로 포화시킨 후 잔류물을 EtOAc (400 mL, 200 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 EtOAc/헥산으로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하였다. 더 순수한 분획을 합하고, 농축시키고, 잔류물을 상기 조건을 사용하여 재-정제하였다. 다시, 더 순수한 분획을 합하고 농축시켰다. 잔류물을 동일한 조건을 사용하여 3회 정제하였다. 순수한 분획을 합하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜, 화합물 3, 19.2 g, 48.2 mmol, 76% 수율을 수득하였다.

[0377] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 7.78 (d, J = 7.32 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 7.32 Hz, 2H), 7.63, (s, 1H), 7.42 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.232 Hz, 2H), 6.00 (br s, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.26 (t, J = 7.10 Hz, 1H), 3.91 (t, J = 4.20 Hz, 2H), 3.49 - 3.46 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 157.54, 156.90, 144.06, 141.32, 127.68, 127.08, 125.23, 119.96, 82.11, 75.66, 66.91, 47.30, 39.23, 28.24.



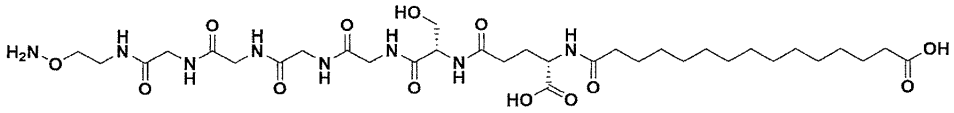
3 4

[0378]

[0379] HCl (100 mL, 400 mmol, 디옥산 중 4 M)을 디에틸 에테르 (100 mL) 중 화합물 3 (8.6 g, 21.6 mmol), 1,4-디메톡시벤젠 (7.46 g, 54.0 mmol)의 교반 용액에 실온에서 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 혼합물이 농후한 현탁액이 되었고, 이를 어렵게 교반할 수 있었다. 추가의 에테르 (400 mL)를 첨가하고, 생성된 현탁액을 실

온에서 30분 동안 교반하였다. 이어서, 이것을 질소 하에 여과하고, 고체를 에테르 (3 x 100 mL)로 세척하여 화합물 4 (6.36 g, 19.0 mmol, 87% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0380] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 11.10 (br, s, 2.60 H), 7.89 (d, J = 7.58 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 7.34 Hz, 2H), 7.54 (br t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 4.31 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 4.23 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 5.38 Hz, 2H), 3.28 (q, J = 5.22 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 156.74, 144.32, 141.22, 128.11, 127.57, 125.64, 120.60, 73.50, 66.08, 47.17, 38.91.



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

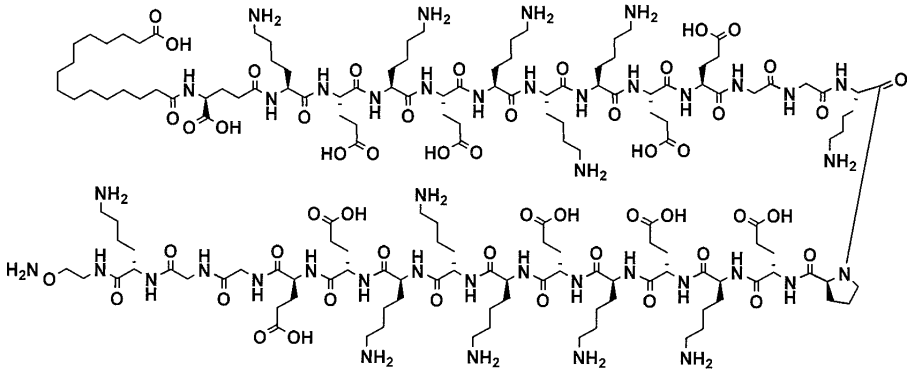
화학식 A

[0381]

[0382] 조 물질을 정제용 LC/MS에 의해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 CSH C18, 19 x 200 mm, 5-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 01.% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 23분에 걸쳐 0-34.9% B, 이어서 100% B에서 2-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수층을 질소의 흐름 하에 -78℃로 냉각시키고, 동결건조시켜 표제 화합물 A를 백색 고체 (88 mg, 25.9% 수율, LC-CAD 순도 98.6%)로서 수득하였다.

[0383] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.24 분; ESI-MS $(M+H)^{+}$ = 775.30.

[0384] 분석 조건 B: 체류 시간 = 1.05 분; ESI-MS $(M+H)^{+}$ = 775.25.



KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH

정확한 질량 : 3496.97

[0385]

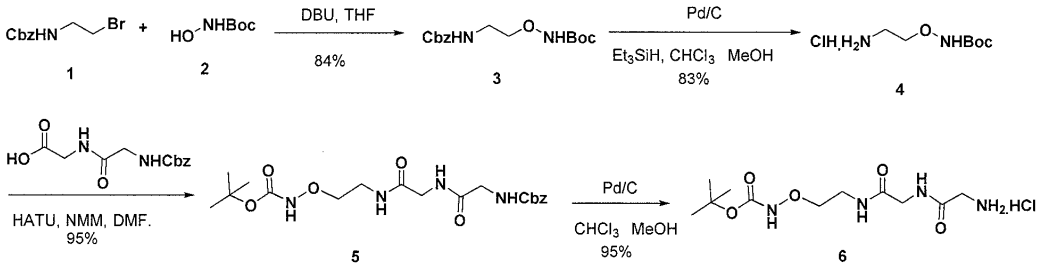
[0386] 조 물질을 정제용 LC/MS에 의해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 20분에 걸쳐 20-70% B, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수층을 질소의 흐름 하에 -78℃로 냉각시키고, 동결건조시켜 표제 화합물을 백색 고체 (47 mg, 3.4% 수율, LC-CAD 순도 72%)로서 수득하였다.

[0387] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.14 분; ESI-MS $(M+3H)^{+3}$ = 1166.90, $(M+3H)^{+4}$ = 875.45.

[0388] 분석 조건 B: 체류 시간 = 0.991 분; ESI-MS $(M+3H)^{+3}$ = 1166.90, $(M+3H)^{+4}$ = 875.50.

[0389] 실시예 5: PK 인핸서의 용액 상 합성

[0390] 본원에 개시된 PK 인핸서를 하기 예시된 절차를 사용하여 제조할 수 있다.



[0391]

[0392] 벤질 (2-(((tert-부톡시카르보닐)아미노)옥시)에틸)카르바메이트, 3. DBU (26.3 ml, 174 mmol)를 THF (75ml) 중 벤질 (2-브로모에틸)카르바메이트 (30 g, 116 mmol) 및 tert-부틸 히드록시카르바메이트 (24.76 g, 186 mmol)의 교반하는 혼합물에 조금씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다 (침전물이 관찰됨). LCMS은 단지 미량의 출발 물질이 남아있음을 나타내었다. 반응 혼합물을 농축시키고, 물로 켄칭하고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 에틸 아세테이트 상을 합하고, 물, 염수로 세척한 다음, Na_2SO_4로 건조시켰다. 농축시킨 후, 45g 조 생성물을 수득하였고, 크로마토그래피 분리 (헥산 중 0-20% 아세톤)에 적용하였다. 분리한 후, 벤질 (2-(((tert-부톡시카르보닐)아미노)옥시)에틸)카르바메이트 (32.9 g, 106 mmol, 91% 수율)를 매우 점성인 담황색 오일로서 수득하였다.

[0393] ^{1}H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.43 - 7.30 (m, 5H), 5.75 (br. s., 1H), 5.32 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.94 - 3.85 (m, 2H), 3.54 - 3.42 (m, 2H), 1.50 (s, 9H).

[0394] tert-부틸 (2-아미노에톡시)카르바메이트 히드로클로라이드, 4. 벤질 (2-(((tert-부톡시카르보닐)아미노)옥시)에틸)카르바메이트 (16.4g, 52.8 mmol)를 MeOH (161 ml) 중에 용해시키고, 클로로포름 (5.33 ml, 66.1 mmol)을 첨가하였다. 용액을 질소로 퍼징한 후 Pd/C (2.81 g, 2.64 mmol)를 조심스럽게 첨가하였다. 이어서, 용액을 0℃로 냉각시키고, 트리에틸실란 (76 ml, 476 mmol)을 천천히 적가하였다. 첨가 동안 H_2 발생이 관찰되었고, 이는 발열 반응이었다. 첨가 후, 이어서 반응물이 밤새 실온으로 서서히 가온되도록 하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 추가의 메탄올로 세척한 후, 진공 하에 증발시켰다. 이어서, 잔류물을 헥산으로 연화처리하고, 생성된 고체를 여과하고, 추가의 헥산으로 세척하고, 흡인 하에 건조되도록 하여 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (10.2 g, 48.0 mmol, 91% 수율)를 분홍색빛 고체로서 수득하였다.

[0395] ^{1}H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 8.78 (br. s., 1H), 8.31 (br. s., 2H), 4.24 (s., 2H), 3.39 (s., 2H), 1.48 (s, 9H).

[0396] tert-부틸 ((3,6,9-트리옥소-1-페닐-2-옥사-4,7,10-트리아자도데칸-12-일)옥시)카르바메이트, 5. N-메틸모르폴린 (5.17 ml, 47.0 mmol)을 무수 DMF (75 ml) 중 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (4 g, 18.81 mmol), 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)아세트아미도)아세트산 (5.01 g, 18.81 mmol) 및 HATU (7.87 g, 20.69 mmol)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 하였다. 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고, 1N HCl로 세척하였다. 이어서, 분리된 수층을 에틸 아세테이트의 추가의 부분으로 추출한 다음, 합한 유기부를 1N HCl, 염수, 포화 중탄산나트륨 용액으로 세척하고, 이어서 추가의 염수로 세척하였다. 이어서, 유기 층을 건조 (Na_2SO_4)시키고, 진공 하에 증발시켰다. 이어서, 조 물질을 칼럼 크로마토그래피에 의해 용리액으로서 에틸 아세테이트-헥산을 사용하여 정제하여 표제 화합물 6.25g (78%)을 수득하였다.

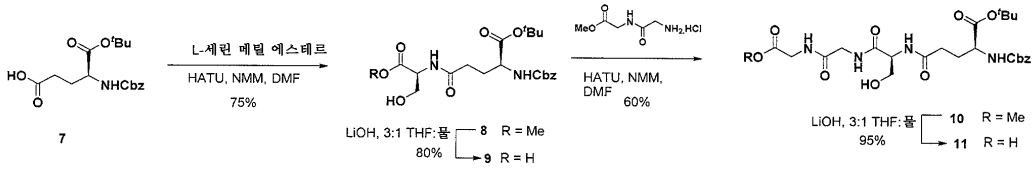
[0397] ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.69 (s, 1H), 7.41 - 7.28 (m, 6H), 7.00 - 6.87 (m, 1H), 5.81 (br s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.98 (dd, J=16.7, 5.7 Hz, 4H), 3.86 (t, J=4.8 Hz, 2H), 3.55 - 3.46 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

[0398] MS m/e 447.0 ($M+Na^+$).

[0399] tert-부틸 (2-(2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도)에톡시)카르바메이트 히드로클로라이드, 6. 5 (6.25 g, 14.72 mmol)를 무수 메탄올 (58.9 ml) 중에 용해시키고, 클로로포름 (1.782 ml, 22.09 mmol)을 첨가하고, 이어

서 Pd-C (1.567 g, 1.472 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 플라스크를 수소 (풍선)로 퍼징하고, 6시간 동안 교반되도록 한 후, 셀라이트를 통해 여과하고, 증발시켜, tert-부틸 2-(2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도)에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (4.87 g, 14.90 mmol, 101% 수율)를 수득하였다.

[0400] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.00 (br s, 1H), 8.71 (br t, J=5.7 Hz, 1H), 8.18 - 7.99 (m, 4H), 3.77 (d, J=5.7 Hz, 2H), 3.69 (t, J=5.9 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.36 - 3.23 (m, 3H), 1.41 (s, 9H).



7

[0401]

[0402] (S)-tert-부틸 2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-3-히드록시-1-메톡시-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트, 8. (S)-4-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산 (7., 켐임펙스(ChemImpex)로부터 구입함) (15g, 44.5 mmol) 및 (S)-메틸 2-아미노-3-히드록시프로파노에이트 히드로클로라이드 (6.92 g, 44.5 mmol)를 DMF (148 ml) 중에 용해시키고, 용액을 0℃로 냉각시켰다. HATU (18.60 g, 48.9 mmol)를 첨가하고, 이어서 N-메틸모르폴린 (12.22 ml, 111 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 N_2 하에 0℃에서 12시간 동안 교반되도록 하였다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 1N HCl로 켄칭한 다음, 포화 $NaHCO_3$, 및 염수로 세척하였다. 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 크로마토그래피 정제 (0-40% 아세톤/헥산)에 의해 정제하여 (S)-tert-부틸 2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-3-히드록시-1-메톡시-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트 (16.31 g, 36.5 mmol, 82% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.

[0403] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.37 (m, 5H), 6.5 (bs, 1H), 5.53 (m, 1H); 5.1(s, 2H), 4.7(m, 1H), 4.28(m, 1H), 4.1(bs, 1H), 3.95(m, 1H), 3.8(s, 3H), 2.4(m, 2H), 2.3(M, 1H), 1.7(m, 1H), 1.5(s, 9H);

[0404] MS m/e 439.2 ($M+H^+$).

[0405] (S)-2-((S)-4-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄아미도)-3-히드록시프로판산, 9. (S)-tert-부틸 2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-3-히드록시-1-메톡시-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트 (14 g, 31.9 mmol)를 THF (106 ml) 및 물 (53.2 ml) 중에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. 30분 동안 교반한 후, LiOH (0.688 g, 28.7 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 N_2 하에 이 온도에서 교반하였다. 반응이 완결된 후, 반응 혼합물의 pH를 0℃에서 ~4로 조정하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (3x150ml)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 회전 증발 하에 농축시켜 (S)-2-((S)-4-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄아미도)-3-히드록시프로판산 (13.01 g, 30.7 mmol, 96% 수율)을 회백색 고체로서 수득하였다.

[0406] MS m/e 425.0 ($M+H^+$).

[0407] (5S,10S)-메틸 5-(tert-부톡시카르보닐)-10-(히드록시메틸)-3,8,11,14-테트라옥소-1-페닐-2-옥사-4,9,12,15-테트라아자헵타데칸-17-오에이트, 10. 메틸 2-(2-아미노아세트아미도)아세테이트 히드로클로라이드 (5 g, 27.4 mmol)를 DMF (116 ml) 중에 용해시키고, (S)-2-((S)-4-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄아미도)-3-히드록시프로판산 (11.62 g, 27.4 mmol)을 채웠다. 이 반응 혼합물에 HATU (11.45 g, 30.1 mmol) 및 N-메틸모르폴린 (7.53 ml, 68.5 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 N_2 하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. LC/MS 및 HPLC는 반응의 완결을 나타내었다. 반응 혼합물을 EtOAc (150mL)로 희석하고, 1N HCl로 켄칭하였다. 유기 층을 분리하고, 염수 (50mL), 수성 $NaHCO_3$ (50mL) 및 최종적으로 염수 (3x50mL)로 세척하였다. 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 증발시켜 목적 생성물을 농후한 오일로서 수득하였으며, 이를 크로마토그래피 정제 (0-10% MeOH/DCM)하여 목적 생성물 (5S,10S)-메틸 5-(tert-부톡시카르보닐)-10-(히드록시메틸)-3,8,11,14-테트라옥소-1-페닐-2-옥사-4,9,12,15-테트라아자헵타데칸-17-오에이트 (14g, 25.3

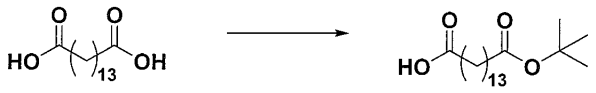
mmol, 93% 수율)를 농후한 오일로서 수득하였다.

[0408] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.38 (m, 5H), 5.1 (m, 2H), 4.0 (m, 6H), 3.7(s, 3H), 2.4(m, 2H), 2.2(M, ^{1}H), 1.9(m, 1H), 1.45(s, 9H);

[0409] MS m/e 553.2 ($M+H^+$).

[0410] (5S,10S)-5-(tert-부톡시카르보닐)-10-(히드록시메틸)-3,8,11,14-테트라옥소-1-페닐-2-옥사-4,9,12,15-테트라아자헵타데칸-17-산, 11. (5S,10S)-메틸 (5S,10S)-메틸 5-(tert-부톡시카르보닐)-10-(히드록시메틸)-3,8,11,14-테트라옥소-1-페닐-2-옥사-4,9,12,15-테트라아자헵타데칸-17-오에이트 (20 g, 36.2 mmol)를 THF (193 ml) 및 물 (97 ml) 중에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. 30분 동안 교반한 후, LiOH (0.780 g, 32.6 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 N_2 하에 5시간 동안 교반하였다. 반응의 진행을 LC/MS 및 HPLC에 의해 모니터링하였다. 반응이 완결된 후, 이것을 EtOAC (150mL)로 희석하고, 1N HCl로 중화시켰다. 유기 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc (3x50mL)로 추출하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시키고, 고진공 하에 12시간 동안 건조시켜 목적 생성물을 회백색 고체 (18g, 96% 수율)로서 수득하였다.

[0411] MS m/e 539.1 ($M+H^+$).



12 13

[0412]

[0413] 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산, 13. 아세트산 무수물 (70 ml) 중 펜타데칸디오산 (20.2 g, 70.5 mmol)의 현탁액을 Ar 하에 128℃로 가열하였다. 생성된 용액을 이 온도에서 6.0시간 동안 교반한 다음, 실온으로 냉각시켰다. 용액을 톨루엔 (100 mL)으로 희석하고, 증발시켰다. 잔류물을 톨루엔 (4x80 mL)으로 스트리핑하고, 진공 하에 6.5시간 동안 건조시켜 회백색 고체 27.53 g을 수득하였다. 상기 고체 (27.53 g) 및 t-부탄올 (235 ml)의 혼합물에 실온에서 Ar 하에 4-디메틸아미노피리딘 (34.8 g, 282 mmol)을 15분의 기간에 걸쳐 3 부분으로 첨가하였다. 혼합물을 50℃로 가열하고, 생성된 용액을 이 온도에서 34.0시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 톨루엔 (50 mL)으로 희석하고, 증발시켰다. 잔류물을 톨루엔 (2x100 mL)으로 스트리핑한 다음, 9/1 에테르/CH_2Cl_2 (600 mL) 중에 녹였다. 용액을 1M HCl (400 mL), 0.5M HCl (400 mL), 물 (300 mL) 및 염수 (300 mL)로 세척하였다. 유기 층을 건조 (Na_2SO_4)시키고, 증발시켰다. 조 물질을 CH_2Cl_2 (50 mL)에 녹이고, 초음파처리하였다. 생성된 현탁액을 중형 소결 깔때기를 통해 여과하고, 깔때기 내의 고체를 소량의 CH_2Cl_2로 2회 헹구었다. 여과물 및 헹군 액을 합하고, 증발시켰다. 농축물을 크로마토그래피 (120 g 플래쉬 칼럼 카트리지, CH_2Cl_2에서 9/1 CH_2Cl_2/i-PrOH)하여 하기 용리 순서로 수득하였다:

[0414] - 디-tert-부틸 펜타데칸디오에이트 및 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산의 ~5/1 혼합물 (7.19 g, 무색 오일).

[0415] - 백색 고체로서 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (4.38 g, 19% 수율): LC/MS $[M-H]^{-1}$ = 327;

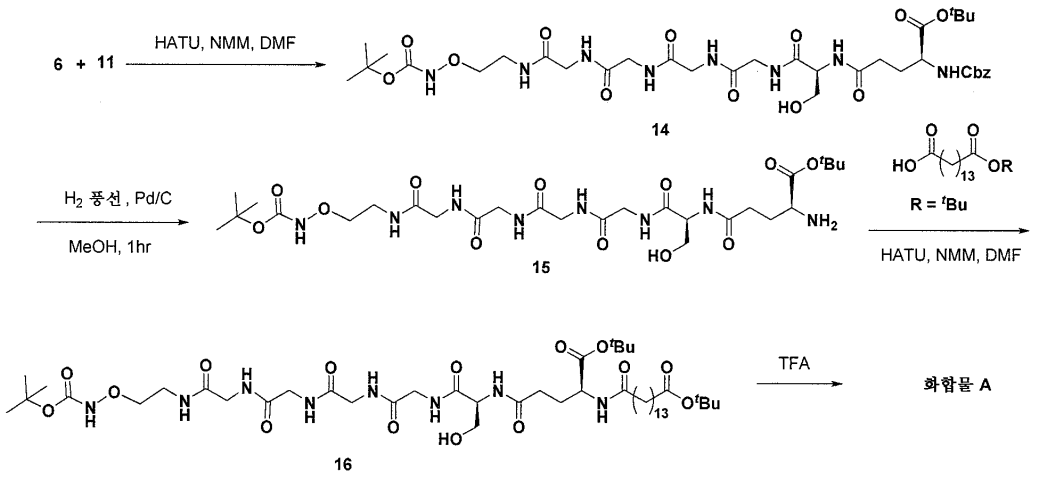
[0416] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.37 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.22 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.28 (m, 18H).

[0417] - 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 및 펜타데칸디오산의 ~4/1 혼합물 (4.42 g, 회백색 고체).

[0418] 디- 및 모노 tert-부틸 에스테르의 혼합물 (7.19 g)을 크로마토그래피 (120 g 플래쉬 칼럼 카트리지, CH_2Cl_2에서 9/1 CH_2Cl_2/i-PrOH)로 분리하여 추가량의 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (0.8 g, 4% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0419] 모노 tert-부틸 에스테르 및 이산의 혼합물 (4.42 g)을 크로마토그래피 (330 g 플래쉬 칼럼 카트리지, Hex에서 4/1 Hex/아세톤)로 분리하여 추가량의 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (2.92 g, 13% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0420] 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산의 총 단리된 양은 8.1 g (36% 수율)이었다.



[0421]

[0422] tert-부틸 N2-((벤질옥시)카르보닐)-N5-((S)-1-((2-((2-((2-((2,2-디메틸-4,10-디옥소-3,6-디옥사-5,9-디아자운데칸-11-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-3-히드록시-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타미네이트, 14. tert-부틸 2-(2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도)에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (3.73 g, 11.41 mmol) 및 (5S,10S)-5-(tert-부톡시카르보닐)-10-(히드록시메틸)-3,8,11,14-테트라옥소-1-페닐-2-옥사-4,9,12,15-테트라아자헵타데칸-17-산 (5.85 g, 10.87 mmol)을 DMF (36.2 ml) 중에 실온에서 질소 분위기 하에 용해시켰다. 용액을 0℃로 냉각시킨 후 HATU (4.55 g, 11.96 mmol)를 첨가하고, 이어서 N-메틸 모르폴린 (2.99 ml, 27.2 mmol)을 적가하였다. 반응물을 밤새 실온으로 가온되도록 하였다. 반응물을 0℃로 냉각시킨 후, 빙수로 켄칭하고, 얼음이 용융됨에 따라 격렬하게 교반하였다. 모든 얼음이 플라스크 주위에서 용융되었을 때, 침전물이 형성되었고, 이어서 이를 밤새 흡인에 의해 여과하였다 (느리게). 생성된 왁스상 고체를 메탄올 (200mL) 중에 용해시킨 후, 증발시켰다. 메탄올 (약 20mL)로 처리한 다음 디에틸 에테르를 첨가하였고, 이어서 생성물이 침전되었고, 이를 흡인에 의해 수집하여 (23S,28S)-tert-부틸 28-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25-헵타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24-헵타아자노나코산-29-오에이트 6.4 g (73% 수율)을 수득하였다.

[0423] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.24 - 8.01 (m, 5H), 7.87 (br t, J=5.6 Hz, 1H), 7.62 (br d, J=7.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 5H), 5.10 - 4.96 (m, 3H), 4.30 - 4.24 (m, 1H), 4.10 (q, J=5.3 Hz, 3H), 3.93 - 3.84 (m, 1H), 3.80 - 3.53 (m, 13H), 3.31 - 3.23 (m, 2H), 3.17 (d, J=5.3 Hz, 7H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.35 - 2.20 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.82 - 1.71 (m, 1H), 1.42 - 1.24 (m, 20H).

[0424] MS m/e 811.4 ($M+H^+$).

[0425] tert-부틸 N5-((S)-1-((2-((2-((2-((2,2-디메틸-4,10-디옥소-3,6-디옥사-5,9-디아자운데칸-11-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-3-히드록시-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타미네이트, 15. 메탄올 (158 ml)을 (23S,28S)-tert-부틸 28-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25-헵타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24-헵타아자노나코산-29-오에이트 (6.4 g, 7.89 mmol)에 한 번에 첨가하고, 아민이 용해될 때까지 (약 3시간) 고체가 질소 분위기 하에 교반되게 하였다. 이어서, Pd/C (0.840 g, 0.789 mmol)를 첨가한 다음, 수소 분위기를 풍선을 통해 도입하였다. 반응물을 실온에서 교반되도록 한 후, 유리 여과지를 통해 여과하고, 여과물을 증발시켜 (23S,28S)-tert-부틸 28-아미노-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25-헵타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24-헵타아자노나코산-29-오에이트 4.8 g (90% 수율)을 회백색의 파삭한 고체로서 수득하였다.

[0426] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.29 - 8.19 (m, 1H), 8.17 - 7.96 (m, 3H), 7.87 (br t, J=5.7 Hz, 1H), 5.00 (br s, 1H), 4.28 - 4.08 (m, 1H), 3.78 - 3.56 (m, 10H), 3.30 - 3.14 (m, 3H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.34 - 2.06 (m, 3H), 1.87 - 1.74 (m, 1H), 1.68 - 1.50 (m, 1H), 1.41 (d, J=4.3 Hz, 15H), 1.10 (s, 1H).

[0427] tert-부틸 (23S,28S)-28-(tert-부톡시카르보닐)-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25,30-옥타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24,29-옥타아자테트라테트라콘탄-44-오에이트, 16.

[0428] N-메틸 모르폴린 (1.950 ml, 17.73 mmol)을 (23S,28S)-tert-부틸 28-아미노-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25-헵타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24-헵타아자노나코산-29-오에이트 (4.8 g, 7.09 mmol), 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (2.446 g, 7.45 mmol) 및 HATU (2.97 g, 7.80 mmol)의 부분 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 적가하였다. 추가의 20mL DMF를 첨가하여 반응 혼합물을 가용화한 다음, 이를 실온으로 밤새 천천히 가온되도록 하였다. 이어서, 반응물을 얼음 배치에서 냉각시킨 후, 얼음으로 켄칭하고, 용융되게 하는 한편, 혼합물을 격렬하게 교반하였다. 이어서, 고체를 여과하여 검-유사 고체 (6.1g)를 수득하였으며, 이를 정제를 위해 SFC로 옮겼다. SFC 정제하여 (23S,28S)-tert-부틸 28-(tert-부톡시카르보닐)-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25,30-옥타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24,29-옥타아자테트라테트라콘탄-44-오에이트 (2.5 g, 2.53 mmol, 35.7% 수율)를 백색 고체로서 수득하였으며, 이를 후속 단계에 사용하였다.

[0429] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.23 - 8.02 (m, 1H), 7.97 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 7.84 (t, J=5.8 Hz, 1H), 4.96 (t, J=5.6 Hz, 1H), 4.32 - 4.21 (m, 1H), 4.17 - 4.03 (m, 1H), 3.85 (d, J=6.0 Hz, 1H), 3.76 (br d, J=5.1 Hz, 1H), 3.72 - 3.55 (m, 1H), 3.30 - 3.24 (m, 1H), 2.27 - 2.07 (m, 1H), 2.01 - 1.86 (m, 1H), 1.80 - 1.65 (m, 1H), 1.49 - 1.38 (m, 5H), 1.35 (br s, 1H), 1.29 - 1.16 (m, 4H).

[0430] MS m/e 987.7 ($M+H^+$).

[0431] (17S,22S)-1-(아미노옥시)-22-카르복시-17-(히드록시메틸)-4,7,10,13,16,19,24-헵타옥소-3,6,9,12,15,18,23-헵타아자옥타트리아콘탄-38-산, 화합물 A. (23S,28S)-tert-부틸 28-(tert-부톡시카르보닐)-23-(히드록시메틸)-2,2-디메틸-4,10,13,16,19,22,25,30-옥타옥소-3,6-디옥사-5,9,12,15,18,21,24,29-옥타아자테트라테트라콘탄-44-오에이트 (2.5 g, 2.53 mmol)를 냉각된 92:8 TFA:TIPS의 25mL + 10mL 세척 혼합물 중에 용해시켰다. 용액을 백색 고체에 직접 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 교반되도록 하였다. 용액을 0℃로 냉각시키고, 320 mL 헵탄: 40mL MTBE를 첨가한 후, 이를 밤새 냉장고로 이동시켰다. 투명한 오일이 분리되었고, 플라스크의 바닥에서 관찰되었다. 상청액을 제거하고, 차가운 디에틸 에테르 (1L)를 첨가하였다. 생성된 백색 고체를 2시간 동안 교반한 후, 신속하게 여과하고, 부흐너 깔때기에서 건조시켜 (17S,22S)-1-(아미노옥시)-22-카르복시-17-(히드록시메틸)-4,7,10,13,16,19,24-헵타옥소-3,6,9,12,15,18,23-헵타아자옥타트리아콘탄-38-산 2.1 g (95% 수율)을 수득하였다.

[0432] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.42 - 8.34 (m, 1H), 8.20 - 7.95 (m, 3H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.61 (dd, J=10.9, 4.6 Hz, 1H), 4.48 (dd, J=10.8, 7.5 Hz, 1H), 4.30 - 4.03 (m, 1H), 3.93 - 3.30 (m, 10H), 2.47 - 2.39 (m, 1H), 2.33 (dt, J=3.7, 1.9 Hz, 1H), 2.27 - 2.08 (m, 3H), 2.05 - 1.91 (m, 1H), 1.82 - 1.69 (m, 1H), 1.52 - 1.43 (m, 2H), 1.24 (s, 9H), 1.21 - 1.00 (m, 1H). CAD 검출에 의한 HPLC 분석은 81% 순도를 나타내었다. 애질런트 1100 LC/UV/CAD, ACE C18-300 300 X 4.6 mm ID, 5μm, A: 물 0.05%TFA;B: ACN 0.05%TFA.

[0433] 실시예 6: 추가의 PK 인핸서의 용액 상 합성

[0434] 분석 LCMS 조건 A: 칼럼: 워터스 액퀴티 UHPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 0.05% TFA 포함; 온도: 50℃; 구배: 3분에 걸쳐 0-100% B, 이어서 100% B에서 1.0-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 질량.

[0435] 분석 LCMS 조건 B: 칼럼: 워터스 액퀴티 UHPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50℃; 구배: 3분에 걸쳐 0-100% B, 이어서 100% B에서 1.0-분 유지; 유량: 1.0 mL/분; 검출: 질량.

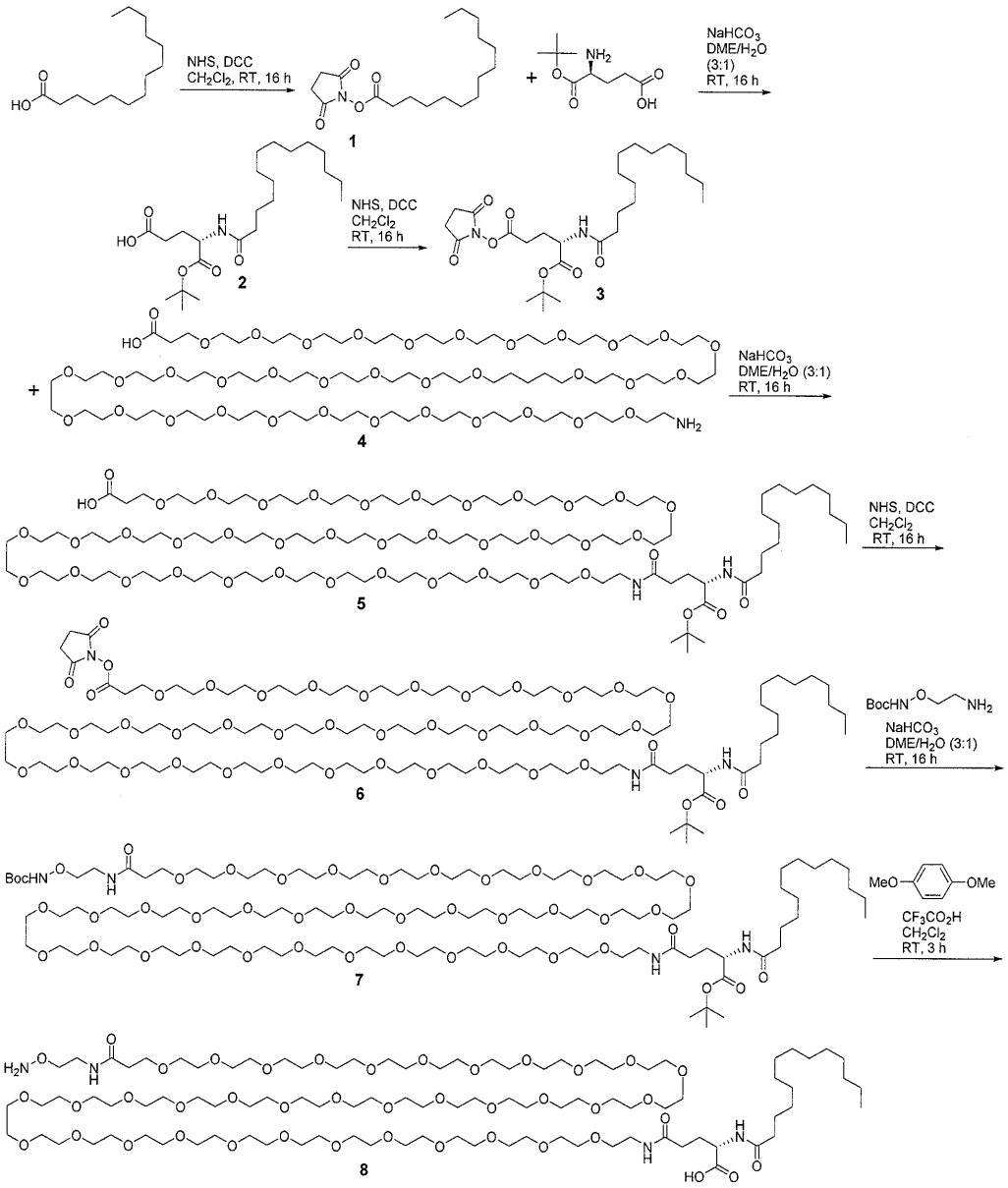
[0436] 분석 UHPLC-ELSD 조건 A: HPLC 조건: 칼럼: 워터스 BEH C18,150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분에서 15분까지 10% B에서 50% B, 16분에서 20분까지 50% B에서 60% B, 21분에서 26분까지 60% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 4.0분 유지; 후 실행 시간: 4분 (초기 이동상 조건 하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: 50/50 MeCN/물 중 1 mg/mL 샘플 5 μL; MS 조건: 질량 범위 m/z 120 - 2000. 이온화 및 방식: 전기분무 이온화, 양이온 방식. ELSD 조건: 획득: 20. 드리프트 튜브 온도: 60℃. 기체 유량: 40 psi.

[0437] 분석 UHPLC-ELSD 조건 B: HPLC 조건: 칼럼: 워터스 BEH CSH C18, 150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분에서 24분까지 10% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 3.0분 유지; 후 실행 시간: 4분 (초기 이동상 조건 하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: 50/50 MeCN/물 중 1 mg/mL 샘플 2 μL; MS 조건: 질량 범위 m/z 120 - 2000. 이온화 및 방식: 전기분무 이온화, 양이온 방식. ELSD 조건: 획득: 50. 드리프트 튜브 온도: 60℃. 기체 유량: 40 psi

[0438] 분석 UHPLC-CAD 조건 C: HPLC 조건: 칼럼: 워터스 BEH 페닐, 150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분에서 25분까지 10% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 2.0분 유지; 후 실행 시간: 4분 (초기 이동상 조건 하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: MeOH 중 1 mg/mL 샘플 5 μL; MS 조건: 질량 범위 m/z 120 - 2000. 이온화 및 방식: 전기분무 이온화, 양이온 방식. CAD 조건: 범위: 100PA. 기체 유량: 35 psi.

[0439] 분석 UHPLC-CAD 조건 D: HPLC 조건: 칼럼: 워터스 BEH 페닐, 150 x 2.1 mm, 1.7-μm 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 35℃; 구배 프로파일: 0분에서 15분까지 10% B에서 35% B, 16분에서 25분까지 35% B에서 95% B, 이어서 95% B에서 2.0분 유지; 후 실행 시간: 3분 (초기 이동상 조건 하); 유량: 0.35 mL/분; 주입 부피: 50/50 MeOH/물 중 1 mg/mL 샘플 2 μL; MS 조건: 질량 범위 m/z 120 - 2000. 이온화 및 방식: 전기분무 이온화, 양이온 방식. CAD 조건: 범위: 100PA. 기체 유량: 35 psi

[0440] PEG_{36}-Glu^{γ}-C_{13}-CH_3 (8)의 합성



[0441]

[0442] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 테트라데카노에이트 (1). CH_2Cl_2 중 DCC (1M, 99 mL, 99 mmol)를 DMF (100 mL) 중 테트라데칸산 (20.55 g, 90 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켰다. 생성된 고체를 에테르/헥산 (1:3, 80 mL) 중에 45분 동안 현탁시키고, 여과에 의해 수집하고, 건조시켜 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 테트라데카노에이트 (1) (16.96 g, 52.1 mmol, 58% 수율)를 백색 고체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0443] (S)-5-(tert-부톡시)-5-옥소-4-테트라데칸아미도펜탄산 (2). 물 (150 ml)을 DME (450 mL) 중 (S)-4-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산 (10.5 g, 51.7 mmol), 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 테트라데카노에이트 (1) (16.81 g, 51.7 mmol), 및 $NaHCO_3$ (5.21 g, 62.0 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. DME를 진공 하에 제거한 다음, 수성 HCl (1 M, 67.2 ml, 67.2 mmol)을 첨가하여 pH를 2-3으로 조정하였다. 생성된 현탁액을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음, 여과하였다. 생성된 백색 고체를 DME (2x)로 공비 건조시킨 다음, 에테르/헥산 1:3 (160 mL) 중에 실온에서 1시간 동안 현탁시켰다. 생성된 백색 고체를 여과에 의해 수집하고, 고진공 하에 건조시켜 (S)-5-(tert-부톡시)-5-옥소-4-테트라데칸아미도펜탄산 (2) (8.5 g, 21 mmol, 40% 수율)을 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0444] (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-테트라데칸아미도펜탄디오에이트 (3). CH_2Cl_2 중 DCC (1M,

26.6 mL, 26.6 mmol)를 실온에서 DMF (30 mL) 중 (S)-5-(tert-부톡시)-5-옥소-4-테트라데칸아미도펜탄산 (2) (10.0 g, 24.2 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (3.06 g, 26.6 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 CH_2Cl_2 중에 용해시키고, 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 EtOAc/헥산 (1:2)으로 용리시키면서 정제하여 (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-테트라데칸아미도펜탄디오에이트 (3) (8.95 g, 17.5 mmol, 73% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0445] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 6.29 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.58 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.70 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (m, 20H), 0.86 (t, J = 6.3 Hz, 3H). ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ ppm 173.0, 170.3, 168.7, 167.6, 82.4, 51.2, 36.0, 31.5, 29.29. 29.27, 29.25, 29.11, 28.97, 28.92, 27.6, 27.15, 27.10, 25.21, 25.11, 22.3, 13.7.

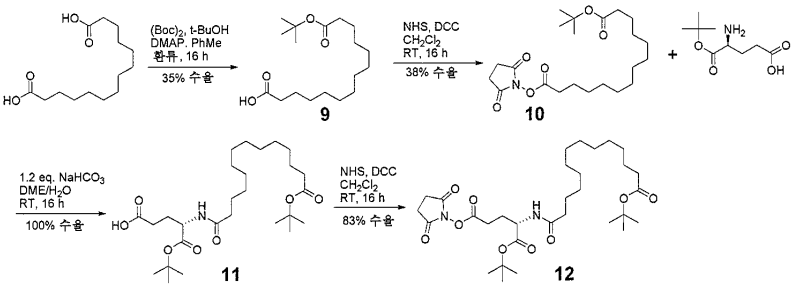
[0446] 화합물 5. 물 (4.5 mL)을 DME (13.5 mL) 중 화합물 4 (750 mg, 0.448 mmol), (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-테트라데칸아미도펜탄디오에이트 3 (297 mg, 0.582 mmol), 및 $NaHCO_3$ (75 mg, 0.90 mmol)의 교반 혼합물에 실온에서 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 실온에서 밤새 교반하고, 수성 HCl (1M, 0.896 mL, 0.896 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4OAc로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 5 (610 mg, 66% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. $(M+2H)^{2+}$ 1036, $(M+3H)^{3+}$ 691.

[0447] 화합물 6. CH_2Cl_2 중 DCC (1 M, 0.32 mL, 0.32 mmol)를 CH_2Cl_2 (12 mL) 중 화합물 5 (550 mg, 0.266 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (36.7 mg, 0.319 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 화합물 6을 백색 고체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

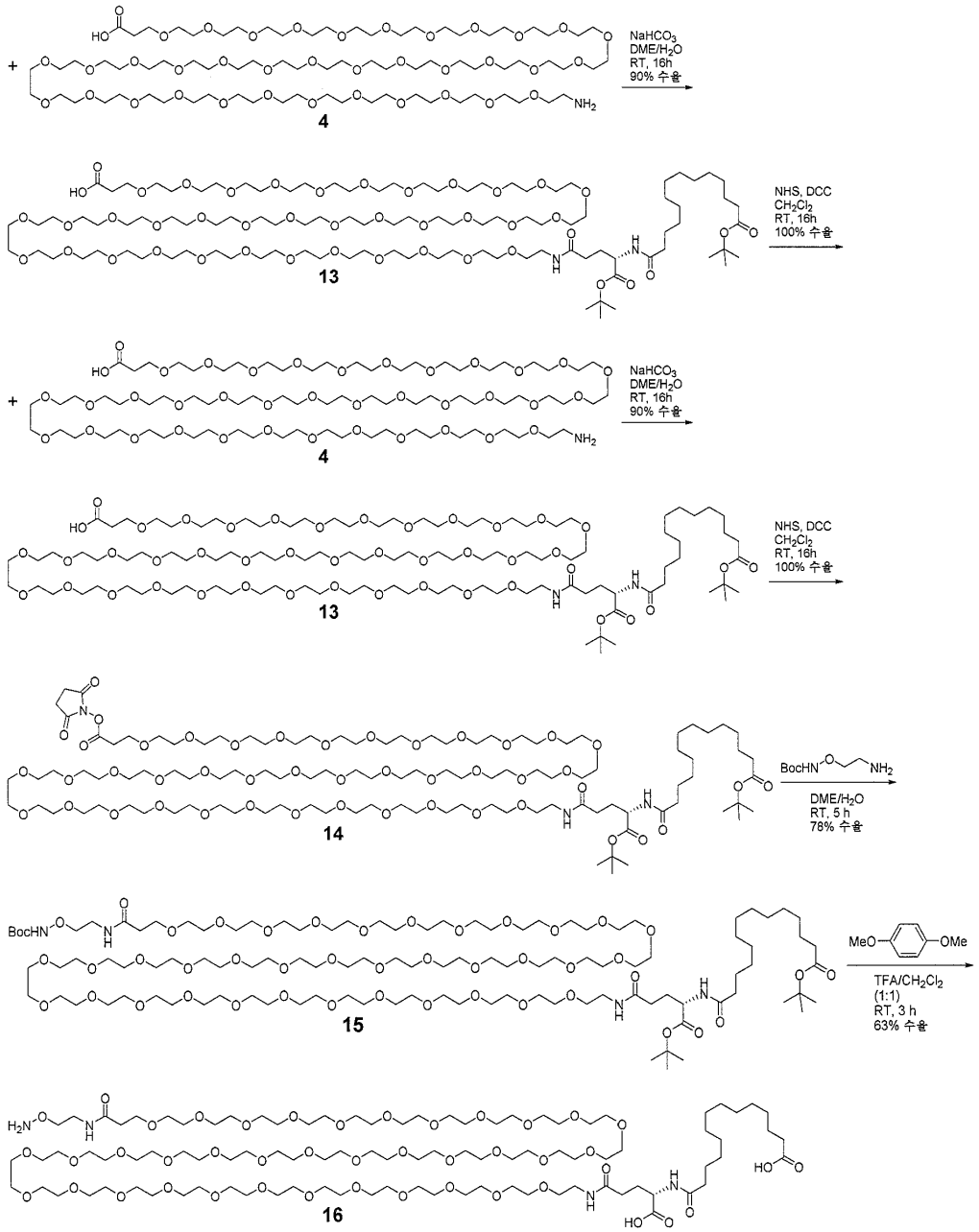
[0448] 화합물 7. 물 (2.5 mL)을 실온에서 DME (7.5 mL) 중 화합물 6 (577 mg, 0.266 mmol), tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 (Miao, Z.; Liu, J.; Norman, T.; Driver, R. WO 2006/069246) (70.3 mg, 0.399 mmol), 및 $NaHCO_3$ (33.5 mg, 0.40 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 농축시켰다. 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4Cl로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 7 (360 mg, 61% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. $(M+2H)^{2+}$ 1115, $(M+3H)^{3+}$ 743.

[0449] 화합물 8. TFA (2 mL)를 실온에서 CH_2Cl_2 (2 mL) 중 화합물 7 (274 mg, 0.123 mmol), 1,4-디메톡시벤젠 (155 mg, 1.12 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반한 다음, 농축시켰다. 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4Cl로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 8 (228 mg, 84% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 그의 UHPLC-ELSD 순도는 분석 UHPLC-ELSD 조건 A를 사용하여 93.3%인 것으로 결정되었다. $(M+2H)^{2+}$ 1037, $(M+3H)^{3+}$ 691.

[0450] PEG_{36}-Glu^{γ}-C_{13}-CO_2H (16)의 합성



[0451]



[0452]

[0453] 14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸산 (9). 1 L 화염 건조된 둥근 바닥 플라스크에 테트라데칸디오산 (21 g, 81 mmol), DMAP (9.93 g, 81 mmol) 및 톨루엔 (300 mL)을 채웠다. 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반한 후, 2-메틸프로판-2-올 (11.7 mL, 122 mmol) 및 디-tert-부틸 디카르보네이트 (26.6 g, 122 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반한 다음, 116℃에서 15시간 동안 가열하였다. 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 1% HOAc를 함유하는 EtOAc/헥산 (1:2)로 용리시키면서 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피하여,

14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸산 (9) (9.0 g, 29 mmol, 35% 수율)을 수득하였다. 물질은 ^{1}H NMR에 의하면 대략 80% 순수하였고 (주요 불순물은 디-tert-부틸 에스테르임), 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0454] 1-tert-부틸 14-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 테트라데칸디오에이트 (10). CH_2Cl_2 중 DCC (1M, 59.6 mL, 59.6 mmol)를 CH_2Cl_2 (200 mL) 중 14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸산 (9) (12.5 g, 39.8 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (6.86 g, 59.6 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 CH_2Cl_2로 용리시키면서 정제하여 1-tert-부틸 14-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 테트라데칸디오에이트 (10) (6.2 g, 15 mmol, 38% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0455] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2.84 (br s, 4H), 2.60 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (m, 2H), 1.26 (m, 14H). ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 173.4, 169.2, 168.7, 79.9, 35.6, 31.0, 29.54, 29.51, 29.47, 29.34, 29.31, 29.09, 28.8, 28.1, 25.6, 25.1.

[0456] (S)-5-(tert-부톡시)-4-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (11). 물 (40 ml)을 DME (120 mL) 중 (S)-4-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산 (1.600 g, 7.87 mmol), 1-tert-부틸 14-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 테트라데칸디오에이트 (10) (3.6 g, 7.87 mmol), 및 $NaHCO_3$ (0.794 g, 9.45 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. DME를 진공 하에 제거하고, 수성 HCl (1 M, 9.45 ml, 9.45 mmol)을 첨가하여 pH를 2-3으로 조정하였다. 혼합물을 CH_2Cl_2 (1 x 250 mL, 2 x 50 mL)로 추출하는 한편, 수성 층을 고체 NaCl로 포화시켰다. 합한 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 (S)-5-(tert-부톡시)-4-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (11) (5.14 g, 10.3 mmol)을 백색 고체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0457] (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)펜탄디오에이트 (12). CH_2Cl_2 중 DCC (1 M, 11.8 mL, 11.8 mmol)를 CH_2Cl_2 (100 mL) 중 (S)-5-(tert-부톡시)-4-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (11) (3.93 g, 7.87 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (1.359 g, 11.81 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반한 다음, 여과하였다. 여과물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 EtOAc/CH_2Cl_2 (1:19)로 용리시키면서 정제하여 ((S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)펜탄디오에이트 (12) (3.2 g, 68% 수율)를 수득하였다.

[0458] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 6.27 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.71 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 2.22 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 2.18 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.58 (m 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (m, 16H). ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) d 173.41, 173.37, 170.7, 169.1, 168.0, 82.8, 79.9, 51.6, 36.4, 35.6, 29.58, 29.47, 29.35, 29.30, 29.10, 28.12, 27.99, 27.55, 27.50, 25.59, 25.48, 25.13.

[0459] 화합물 13. 물 (4 mL)을 DME (12 mL) 중 화합물 4 (750 mg, 0.448 mmol) (오하이오주 파월 소재의 퀀타 바이오디자인(Quanta BioDesign)으로부터 구입함), (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(14-(tert-부톡시)-14-옥소테트라데칸아미도)펜탄디오에이트 (12) (401 mg, 0.672 mmol), 및 $NaHCO_3$ (45.1 mg, 0.537 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 수성 HCl (1M, 0.537 mL, 0.537 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4Cl로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 13 (870 mg, 90% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. $(M+2H)^{2+}$ 1079, $(M+3H)^{3+}$ 719.

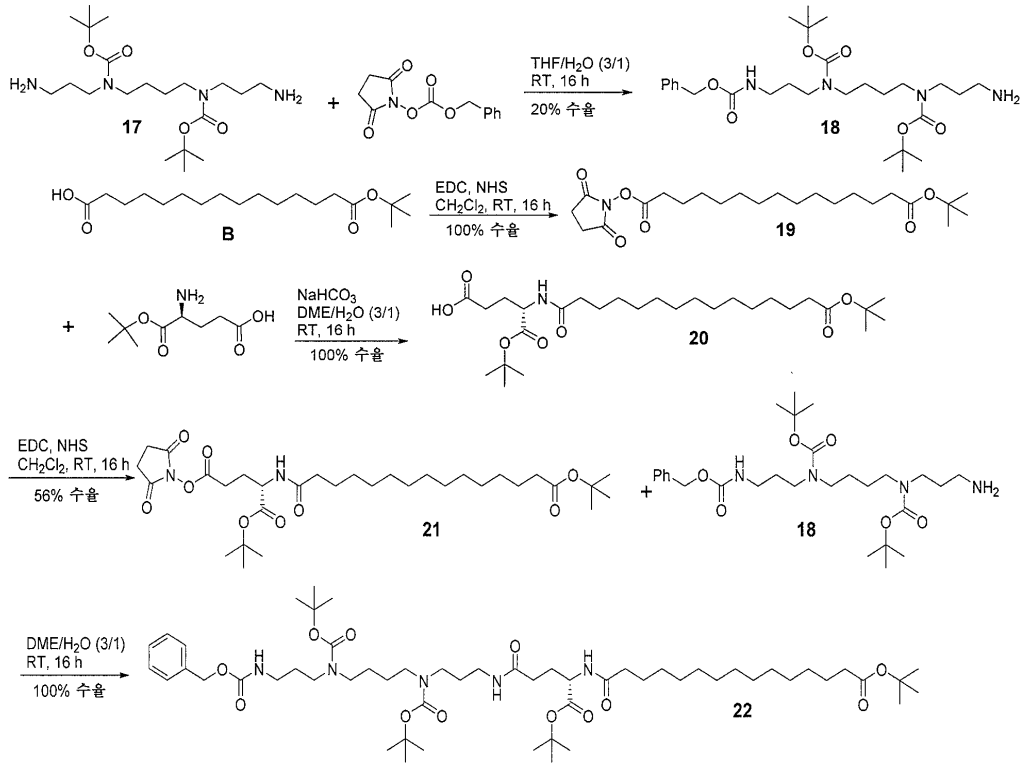
[0460] 화합물 14. CH_2Cl_2 중 DCC (1 M, 0.605 mL, 0.605 mmol)를 실온에서 CH_2Cl_2 (10 mL) 중 화합물 13 (870 mg, 0.403 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (69.6 mg, 0.605 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을

실온에서 밤새 교반하고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 화합물 14를 백색 고체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

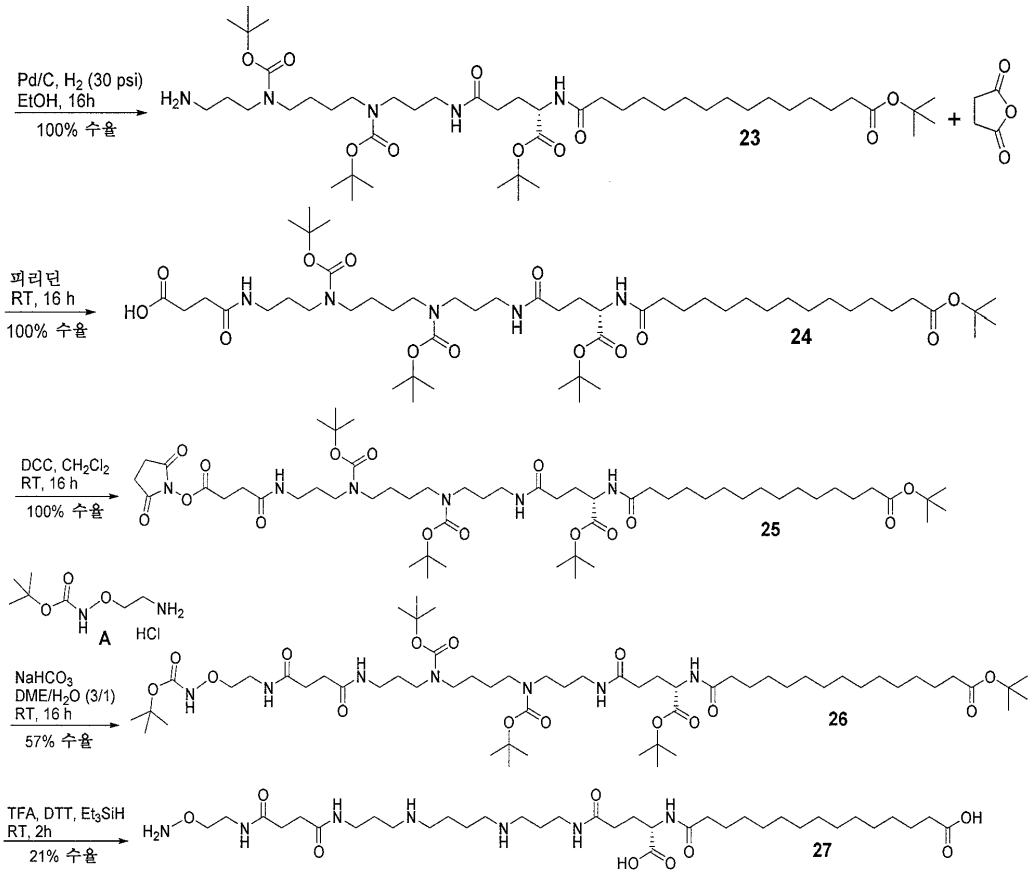
[0461] 화합물 15. 물 (4 mL)을 실온에서 DME (12 mL) 중 화합물 14 (908 mg, 0.403 mmol), 및 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 (2) (142 mg, 0.806 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 농축시키고, 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4Cl로 용리시키면서 정제하였다 (칼럼: 텔레다인 이스코 C18 레디 셉Rf 고성능 골드; 검출기: ELSD; 속도: 60 mL/분; 용매 A: 95% H_2O, 5% MeCN 10 mM NH_4OAc; 용매 B: 5% H_2O, 95% MeCN, 10 mM NH_4OAc). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 15 (730 mg, 78% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. $(M+2H)^{2+}$ 1158, $(M+3H)^{3+}$ 772.

[0462] 화합물 16. TFA (8 mL, 104 mmol)를 실온에서 CH_2Cl_2 (8 mL) 중 화합물 15 (420 mg, 0.181 mmol), 및 1,4-디메톡시벤젠 (201 mg, 1.451 mmol)의 교반 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하고, 농축시키고, 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 NH_4Cl로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기부를 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 16 (240 mg, 63% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 분석 UHPLC-ELSD 조건 B를 사용하여 그의 UHPLC-ELSD 순도는 75.2%인 것으로 결정되었다. $(M+2H)^{2+}$ 1052, $(M+3H)^{3+}$ 701.

[0463] 스페르민-Glu^{γ}-C_{14}-CO_2H (27)의 합성



[0464]



[0465]

[0466] tert-부틸 (4-((3-아미노프로필)(tert-부톡시카르보닐)아미노)부틸)(3-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)프로필)카르바메이트 (18). 물 (100 mL)을 THF (300 mL) 중 N-(벤질옥시카르보닐옥시)숙신이미드 (16.6 g, 66.4 mmol), 디-tert-부틸 부탄-1,4-디일비스((3-아미노프로필)카르바메이트) (17) (Stromgaard, K; Bjornsdottir, I; Andersen, K; Brierley, M. J.; Rizoli, S.; Eldursi, N; Mellor, I,. R.; 4 Peter N.R. Usherwood, P. N. R.; Hansen, S. H.; Krogsgaard-Larsen, P.; Jaroszewski, J. W. Chirality, 2000, 12, 93) (19.1 g, 47.4 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 이것을 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 THF을 진공 하에 제거하고, 혼합물을 CH_2Cl_2 (350 ml, 100 ml x 2)로 추출하는 한편, 수성 층을 고체 NaCl로 포화시켰다. 합한 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시키고, 플래쉬 크로마토그래피에 의해 2M NH_3-MeOH/CH_2Cl_2 (1:19에서 1:9까지)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 (4-((3-아미노프로필)(tert-부톡시카르보닐)아미노)부틸)(3-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)프로필)카르바메이트 (18) (5.19 g, 9.67 mmol, 20.4% 수율)를 수득하였다.

[0467] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.22 - 7.40 (m, 5 H), 5.01 - 5.12 (m, 2 H), 3.34 - 3.48 (m, 4 H), 3.01 - 3.31 (m, 5 H), 2.65 (br t, J=6.60 Hz, 2 H), 1.86 - 2.19 (m, 4 H), 1.55 - 1.75 (m, 4 H), 1.43 - 1.50 (m, 4 H), 1.43 (s, 9 H), 1.42 (s, 9 H). ^{13}C-NMR 스펙트럼은 회전이성질체의 존재로 인해 매우 복잡하였다.

[0468] 1-(tert-부틸) 15-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 펜타데칸디오에이트 (19). CH_2Cl_2 (100 mL) 중 15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸산 (실시예 4의 화합물 1) (3.28 g, 10.0 mmol), 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (1.73 g, 15.0 mmol), 및 EDC (2.88 g, 15.0 mmol)의 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이어서, 이것을 CH_2Cl_2 (200 mL)로 희석하고, 염수/물 (1:1)로 2회 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 1-tert-부틸 15-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 펜타데칸디오에이트 (19) (4.26 g, 10.0 mmol, 100% 수율)를 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0469] (S)-5-(tert-부톡시)-4-(15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (20). 물 (30 mL) 중 $NaHCO_3$ (1.01 g, 12.0 mmol)의 용액을 DME (90 mL) 중 (S)-4-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산 (2.44 g, 12.0 mmol), 및 1-tert-부틸 15-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 펜타데칸디오에이트 (19) (4.26 g, 10.0 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, 모든 DME를 진공 하에 제거하고, pH를 2-3으로 조

정하고, 혼합물을 CH_2Cl_2 (350 mL, 150 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 (S)-5-(tert-부톡시)-4-(15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (20) (5.14 g, 10.0 mmol, 100% 수율)을 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0470] 1-(tert-부틸) 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데카노일)-L-글루타메이트 (21). CH_2Cl_2 (100 mL) 중 (S)-5-(tert-부톡시)-4-(15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸아미도)-5-옥소펜탄산 (20) (5.14 g, 10.0 mmol), 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (1.73 g, 15.0 mmol), EDC (2.88 g, 15.0 mmol)의 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이어서, 이것을 CH_2Cl_2 (200 mL)로 희석하고, 염수/물 (1:1)로 2회 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 EtOAc/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸아미도)펜탄디오에이트 (21) (3.41 g, 5.58 mmol, 55.8% 수율) (3 단계 동안 55.8% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0471] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.20 (br d, J=7.82 Hz, 1 H), 4.62 (td, J=7.95, 4.89 Hz, 1 H), 2.80 - 2.91 (m, 4 H), 2.56 - 2.79 (m, 2 H), 2.29 - 2.42 (m, 1 H), 2.17 - 2.28 (m, 4 H), 2.02 - 2.16 (m, 1 H), 1.54 - 1.69 (m, 4 H), 1.48 - 1.53 (m, 9 H), 1.44 - 1.48 (m, 9 H), 1.21 - 1.39 (m, 18 H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.35, 173.33, 170.66, 168.95, 168.01, 82.82, 79.85, 51.66, 36.46, 35.66, 29.61, 29.49, 29.35, 29.31, 29.12, 28.15, 28.00, 27.62, 27.54, 25.60, 25.48, 25.15.

[0472] tert-부틸 (S)-8,13,21-트리스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-1-페닐-2-옥사-4,8,13,17,22-펜타아자헵타트리아콘탄-37-오에이트 (22). 물 (20 mL)을 DME (60 mL) 중 tert-부틸 (4-((3-아미노프로필)(tert-부톡시카르보닐)아미노)부틸)(3-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)프로필)카르바메이트 (18) (1.42 g, 2.65 mmol), (S)-1-tert-부틸 5-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-(15-(tert-부톡시)-15-옥소펜타데칸아미도)펜탄디오에이트 (21) (1.62 g, 2.65 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 휘발성 성분 (물 포함)을 고진공 하에 제거하고, 잔류물을 MeOH (2 x)와 공비 건조시켰다. 잔류물을 MeOH/CH_2Cl_2 (1:9, <10 mL) 중에 용해시키고, MeOH/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 (S)-tert-부틸 8,13,21-트리스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-1-페닐-2-옥사-4,8,13,17,22-펜타아자헵타트리아콘탄-37-오에이트 (22) (2.74 g, 2.65 mmol, 100% 수율)를 점성 액체로서 수득하였다.

[0473] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.29 - 7.39 (m, 5 H), 7.12 - 7.25 (m, 1 H), 6.69 - 6.89 (m, 1 H), 5.67 - 5.95 (m, 1 H), 5.03 - 5.15 (m, 2 H), 4.30 - 4.47 (m, 1 H), 3.38 - 3.54 (m, 8 H), 3.05 - 3.32 (m, 8 H), 2.12 - 2.35 (m, 6 H), 1.86 - 2.05 (m, 1 H), 1.51 - 1.76 (m, 7 H), 1.45 (s, 9 H), 1.44 (s, 27 H), 1.17 - 1.33 (m, 20 H). ^{13}C-NMR 스펙트럼은 회전이성질체의 존재로 인해 매우 복잡하였다.

[0474] tert-부틸 (S)-5-(3-아미노프로필)-10,18-비스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,15,20-트리옥소-3-옥사-5,10,14,19-테트라아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (23). 에탄올 (100 mL) 중 (S)-tert-부틸 8,13,21-트리스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-1-페닐-2-옥사-4,8,13,17,22-펜타아자헵타트리아콘탄-37-오에이트 (22) (1.36 g, 1.32 mmol), 및 Pd-C (0.140 g, 10wt%)의 혼합물을 파르 진탕기 (H_2, 30 psi)에서 실온에서 18시간 동안 수소화시켰다. 혼합물을 여과하고, EtOH로 세척하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 (S)-tert-부틸 5-(3-아미노프로필)-10,18-비스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,15,20-트리옥소-3-옥사-5,10,14,19-테트라아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (23) (1.19 g, 1.32 mmol, 100% 수율)를 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0475] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.91 - 7.09 (m, 1 H), 6.46 - 6.73 (m, 1 H), 4.34 - 4.54 (m, 1 H), 3.66 - 3.81 (m, 1 H), 3.10 - 3.36 (m, 10 H), 2.82 - 2.93 (m, 2 H), 2.58 - 2.67 (m, 3 H), 2.13 - 2.36 (m, 6 H), 1.55 - 1.72 (m, 6 H), 1.49 - 1.53 (m, 4 H), 1.48 (s, 9 H), 1.47 (d, J=3.18 Hz, 27 H), 1.22 - 1.37 (m, 20 H). ^{13}C-NMR 스펙트럼은 회전이성질체의 존재로 인해 매우 복잡하였다.

[0476] (S)-20,28,33-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,18,23,38-테트라옥소-3-옥사-19,24,28,33,37-펜타아

자헨테트라콘탄-41-산 (24). 피리딘 (13 mL)을 (S)-tert-부틸 5-(3-아미노프로필)-10,18-비스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,15,20-트리옥소-3-옥사-5,10,14,19-테트라아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (23) (1.19 g, 1.32 mmol), 및 디히드로푸란-2,5-디온 (0.66 g, 6.6 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 0.5% AcOH를 함유하는 MeOH/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 (S)-20,28,33-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,18,23,38-테트라옥소-3-옥사-19,24,28,33,37-펜타아자헨테트라콘탄-41-산 (24) (1.32 g, 1.32 mmol, 100% 수율)을 점성 액체로서 수득하였다.

[0477] ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 4.38 - 4.50 (m, 1 H), 3.47 - 3.58 (m, 1 H), 3.09 - 3.32 (m, 9 H), 2.75 (s, 4 H), 2.64 - 2.73 (m, 2 H), 2.46 - 2.59 (m, 2 H), 2.27 - 2.35 (m, 2 H), 2.17 - 2.27 (m, 4 H), 2.07 - 2.14 (m, 4 H), 1.83 - 2.04 (m, 1 H), 1.67 - 1.80 (m, 3 H), 1.55 - 1.66 (m, 4 H), 1.41 - 1.54 (m, 38 H), 1.19 - 1.37 (m, 20 H).

[0478] 21,36-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (S)-8,13-비스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-4,8,13,17,22-펜타아자헥사트리아콘탄-1,21,36-트리카르복실레이트 (25). CH_2Cl_2 중 DCC (1.0 M, 2.0 mL, 2.0 mmol)를 CH_2Cl_2 (20 mL) 중 (S)-20,28,33-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,18,23,38-테트라옥소-3-옥사-19,24,28,33,37-펜타아자헨테트라콘탄-41-산 (24) (1.32 g, 1.32 mmol), 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (0.23 g, 2.0 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, 이것을 여과하고, 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 21,36-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (S)-8,13-비스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-4,8,13,17,22-펜타아자헥사트리아콘탄-1,21,36-트리카르복실레이트 (25) (1.45 g, 1.32 mmol, 100% 수율)를 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0479] tert-부틸 (S)-18,23,31-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,28,33-펜타옥소-3,6-디옥사-5,9,14,18,23,27,32-헵타아자헵타테트라콘탄-47-오에이트 (26). 물 (4 mL) 중 $NaHCO_3$ (0.233 g, 2.77 mmol)의 용액을 실온에서 DME (12 mL) 중 (S)-21,36-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 8,13-비스(tert-부톡시카르보닐)-3,18,23-트리옥소-4,8,13,17,22-펜타아자헥사트리아콘탄-1,21,36-트리카르복실레이트 (25) (1.45 g, 1.32 mmol), 및 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (0.561 g, 2.64 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 후, 물을 포함한 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 THF와 공비 건조시켰다. 잔류물을 MeOH/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 tert-부틸 (S)-18,23,31-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,28,33-펜타옥소-3,6-디옥사-5,9,14,18,23,27,32-헵타아자헵타테트라콘탄-47-오에이트 (26) (0.87 g, 0.75 mmol, 57% 수율)를 점성 액체로서 수득하였다.

[0480] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4.33 - 4.48 (m, 1 H), 3.80 - 3.94 (m, 4 H), 3.42 - 3.55 (m, 14 H), 3.08 - 3.32 (m, 7 H), 2.68 - 2.77 (m, 4 H), 2.50 - 2.63 (m, 4 H), 2.13 - 2.34 (m, 4 H), 1.54 - 1.74 (m, 6 H), 1.43 - 1.53 (m, 45 H), 1.22 - 1.35 (m, 20 H). ^{13}C-NMR 스펙트럼은 회전이성질체의 존재로 인해 매우 복잡하였다.

[0481] (S)-1-(아미노옥시)-25-카르복시-4,7,22,27-테트라옥소-3,8,12,17,21,26-헥사아자헨테트라콘탄-41-산 (27). TFA (1.5 ml) 중 (S)-tert-부틸 18,23,31-트리스(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,28,33-펜타옥소-3,6-디옥사-5,9,14,18,23,27,32-헵타아자헵타테트라콘탄-47-오에이트 (26) (0.50 g, 0.43 mmol), 및 DTT (0.067 g, 0.43 mmol)의 혼합물에 트리에틸실란 (0.10 ml, 0.63 mmol) 및 물 (0.10 mL, 5.6 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 다음, 모든 휘발성 성분을 N_2의 흐름을 사용하여 밤새 제거하였다. 잔류물을 하기 조건: 칼럼: 워터스 CSH C18, 19 x 200 mm, 5-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 25분에 걸쳐 0-35% B, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제용 LC/MS에 의해 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기 성분을 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 질소의 흐름 하에 -78℃로 냉각시키고, 동결건조시켜 표제 화합물 (27)을 백색 고체 (72 mg, 21% 수율)로서 수득하였다. 분석 UHPLC-CAD 조건 C를 사용하여 그의 LC-CAD 순도는 94.9%인 것으로 결정되었다. $[MH]^+$ 745.09.

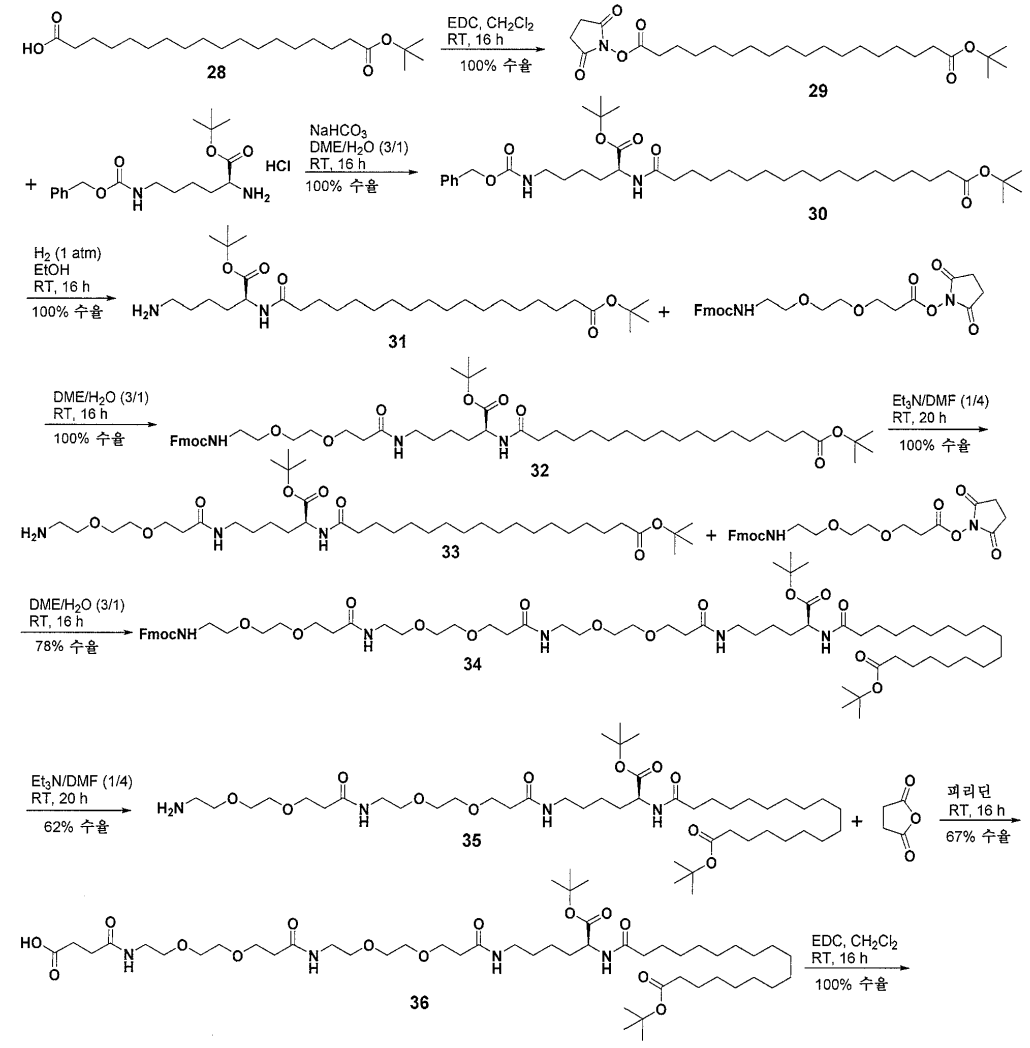
[0482] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.27분;

[0483] ESI-MS $(MH)^+$ = 744.55.

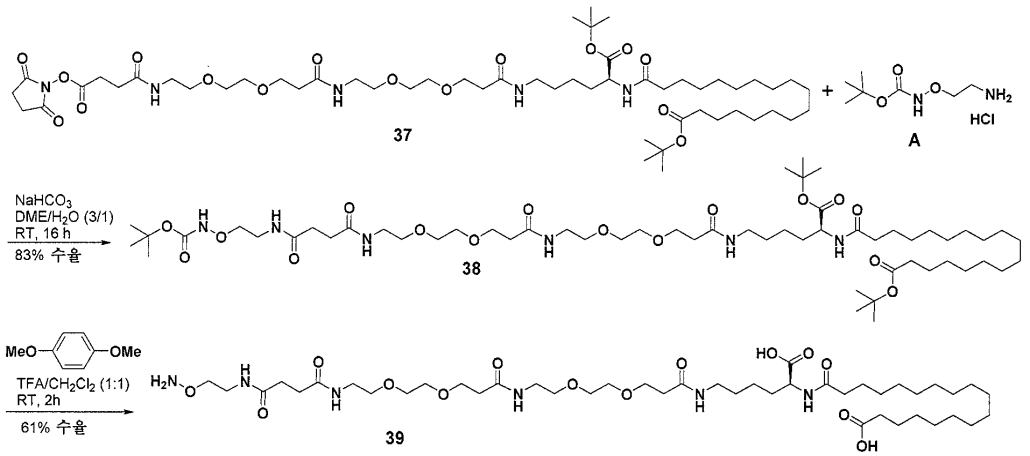
[0484] 분석 조건 B: 체류 시간 = 1.20분;

[0485] ESI-MS $(MH)^+$ = 744.40.

[0486] 화합물 39의 합성:



[0487]



[0488]

[0489] 1-(tert-부틸) 18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 옥타데칸디오에이트 (29). EDC (1.406 g, 7.33 mmol)를 CH_2Cl_2 (40 mL) 중 18-(tert-부톡시)-18-옥소옥타데칸산 (28) (실시예 4의 화합물 1을 제조하는데 사용된 것과 유사한 방법에 의해 제조함) (2.09 g, 5.64 mmol), 및 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (0.844 g, 7.33 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석하고, $NaHCO_3$으로 세척하였다. 분리 후, 수성 층을 CH_2Cl_2 (80 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 1-tert-부틸 18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 옥타데칸디오에이트 (29) (2.13 g, 4.55 mmol, 81% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0490] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.85 (br s, 4H), 2.62 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.22 (t, J=7.6 Hz, 2H), 1.77 (quin, J=7.5 Hz, 2H), 1.67 - 1.54 (m, 3H), 1.50 - 1.37 (m, 10H), 1.37 - 1.21 (m, 22H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.33, 169.12,168.67, 79.85, 35.67, 30.98, 29.65 (br s), 29.62 (br s), 25.61, 29.55, 29.50, 29.36, 29.31, 29.12, 29.09, 28.81, 28.15, 25.15, 24.60.

[0491] tert-부틸 (S)-18-((6-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (30). $NaHCO_3$ (0.41 g, 4.83 mmol)을 DME (60 mL) 및 물 (20 mL) 중 1-tert-부틸 18-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 옥타데칸디오에이트 (29) (1.13 g, 2.416 mmol), 및 Lys(N^{ε}-CBZ)-O^{t}Bu 히드로클로라이드 (1.17 g, 3.14 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 생성된 연한 현탁액을 실온에서 밤새 교반하였다. DME를 진공 하에 제거한 다음, 수성 HCl (1 M, 4.83 mL, 4.83 mmol)을 첨가하여 pH를 2-3으로 조정하였다. 혼합물을 EtOAc (200 mL, 100 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시키고, EtOAc/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 (S)-tert-부틸 18-((6-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (30) (1.66 g, 2.42 mmol, 100% 수율)을 무색의 점성 액체로서 수득하였다.

[0492] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.29 - 7.38 (m, 5 H), 6.08 (br d, J=7.34 Hz, 1 H), 5.06 - 5.19 (m, 2 H), 4.84 - 5.02 (m, 1 H), 4.48 (td, J=7.70, 5.14 Hz, 1 H), 3.07 - 3.27 (m, 2 H), 2.15 - 2.24 (m, 4 H), 1.75 - 1.88 (m, 1H), 1.49 - 1.70 (m, 7 H), 1.46 (s, 9 H), 1.44 (s, 9 H), 1.20 - 1.34 (m, 26 H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.30, 172.87, 171.81, 171.05, 156.49, 136.67, 128.47, 128.03, 82.03, 79.82, 66.55, 60.35, 52.24, 40.66, 36.65, 35.64, 32.35, 29.67, 29.64, 29.61, 29.50, 29.48, 29.44, 29.33, 29.29, 29.10, 28.13, 28.00, 25.63, 25.13, 22.25, 21.00, 14.19. $[MH]^+$ 689.62.

[0493] tert-부틸 (S)-18-((6-아미노-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (31). EtOH (50 mL) 중 (S)-tert-부틸 18-((6-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (30) (1.060 g, 1.2 mmol), 및 Pd-C (0.128 g, 1.200 mmol)의 혼합물을 실온에서 밤새 수소화시켰다 (풍선). 질소에 의한 진공 퍼징의 수회 사이클 후, 반응 혼합물을 조심스럽게 여과하고, EtOH로 세척하였다. 여과물을 농축시키고, 고진공 하에 건조시켜 (31) (S)-tert-부틸 18-((6-아미노-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (0.67 g, 1.2 mmol, 100% 수율)를 무색 액체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0494] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.40 - 6.59 (m, 1 H), 4.30 - 4.50 (m, 1 H), 3.16 - 3.37 (m, 2 H), 2.65 - 2.81 (m, 2 H), 2.10 - 2.25 (m, 4 H), 1.72 - 1.84 (m, 1 H), 1.47 - 1.67 (m, 7 H), 1.43 (s, 9 H), 1.41 (s, 9 H), 1.22 - 1.36 (m, 26 H). ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ ppm 173.53, 173.48, 171.90, 82.10, 79.95, 52.47, 50.19, 40.80, 36.50, 35.62, 32.11, 30.66, 29.63, 29.60, 29.56, 29.48, 29.44, 29.33, 29.25, 29.05, 28.07, 27.94, 25.66, 25.09, 22.41. $[MH]^+$ 555.63.

[0495] tert-부틸 (S)-19-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,21-트리옥소-2,7,10-트리옥사-4,14,20-트리아자옥타트리아콘탄-38-오에이트 (32). $NaHCO_3$ (0.202 g, 2.40 mmol)을 DME (15 mL) 및 물 (5) 중 2,5-디옥

소피롤리딘-1-일 1-(9H-플루오렌-9-일)-3-옥소-2,7,10-트리옥사-4-아자트리데칸-13-오에이트 (0.715 g, 1.44 mmol), (S)-tert-부틸 18-((6-아미노-1-(tert-부톡시)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-18-옥소옥타데카노에이트 (31) (0.67 g, 1.2 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 EtOAc/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여 (S)-tert-부틸 19-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,21-트리옥소-2,7,10-트리옥사-4,14,20-트리아자옥타트리아콘탄-38-오에이트 (32) (1.12 g, 1.20 mmol, 100% 수율)를 무색의 점성 액체로서 수득하였다.

[0496] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.78 (d, J=7.58 Hz, 2 H), 7.63 (d, J=7.34 Hz, 2 H), 7.37 - 7.47 (m, 2 H), 7.30 - 7.36 (m, 2 H), 6.21 - 6.37 (m, 1 H), 6.00 - 6.17 (m, 1 H), 5.43 - 5.63 (m, 1 H), 4.40 - 4.54 (m, 3 H), 4.19 - 4.33 (m, 1 H), 3.75 (t, J=5.87 Hz, 2 H), 3.53 - 3.68 (m, 6 H), 3.42 (br d, J=4.89 Hz, 2 H), 3.22 (q, J=6.28 Hz, 2 H), 2.44 (br t, J=5.38 Hz, 2 H), 2.22 (t, J=7.58 Hz, 4 H), 1.75 - 1.89 (m, 1 H), 1.55 - 1.69 (m, 7 H), 1.47 (s, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 1.20 - 1.35 (m, 26 H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.34, 173.01, 171.82, 171.38, 156.56, 143.99, 141.34, 127.70, 127.05, 125.06, 119.98, 82.07, 79.87, 70.25, 70.12, 70.05, 67.29, 66.63, 52.27, 47.33, 40.86, 38.99, 37.03, 36.67, 35.67, 32.45, 29.70, 29.67, 29.64, 29.63, 29.53, 29.51, 29.38, 29.33, 29.13, 29.03, 28.15, 28.04, 25.68, 25.16, 22.47. $[MH]^+$ 936.80.

[0497] tert-부틸 (S)-1-아미노-15-(tert-부톡시카르보닐)-9,17-디옥소-3,6-디옥사-10,16-디아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (33). Et_3N (2.5 mL, 18 mmol)을 DMF (10 mL) 중 (S)-tert-부틸 19-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,21-트리옥소-2,7,10-트리옥사-4,14,20-트리아자옥타트리아콘탄-38-오에이트 (32) (1.12 g, 1.20 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 추가의 Et_3N (1.0 mL, 7.2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 추가로 7시간 동안 교반하였다. 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 고진공 하에 건조시켜 (S)-tert-부틸 1-아미노-15-(tert-부톡시카르보닐)-9,17-디옥소-3,6-디옥사-10,16-디아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (33) (0.857 g, 1.20 mmol, 100% 수율)를 무색 액체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다. $[MH]^+$ 714.70.

[0498] tert-부틸 (S)-39-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,23,33,41-펜타옥소-2,7,10,17,20,27,30-헵타옥사-4,14,24,34,40-펜타아자옥타펜타콘탄-58-오에이트 (34). $NaHCO_3$ (0.20 g, 2.4 mmol)을 DME (15 mL) 및 물 (5 mL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 1-(9H-플루오렌-9-일)-3-옥소-2,7,10-트리옥사-4-아자트리데칸-13-오에이트 (0.715 g, 1.44 mmol), (S)-tert-부틸 1-아미노-15-(tert-부톡시카르보닐)-9,17-디옥소-3,6-디옥사-10,16-디아자테트라트리아콘탄-34-오에이트 (33) (0.857 g, 1.20 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 수성 HCl (1 M, 2.4 mL, 2.4 mmol)을 첨가하여 pH를 2-3으로 조정하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (200 mL, 100 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 MeOH/CH_2Cl_2로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)하여 (S)-tert-부틸 29-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,23,31-테트라옥소-2,7,10,17,20-펜타옥사-4,14,24,30-테트라아자옥타테트라콘탄-48-오에이트 (34) (1.03 g, 0.940 mmol, 78% 수율)를 무색의 점성 액체로서 수득하였다.

[0499] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.78 (d, J=7.58 Hz, 2 H), 7.63 (br d, J=7.34 Hz, 2 H), 7.39 - 7.46 (m, 2 H), 7.30 - 7.36 (m, 2 H), 6.74 (br s, 1 H), 6.27 - 6.39 (m, 1 H), 6.05 - 6.24 (m, 1 H), 5.60 - 5.78 (m, 1 H), 5.19 - 5.40 (m, 3 H), 4.38 - 4.55 (m, 3 H), 4.17 - 4.32 (m, 1 H), 3.74 - 3.79 (m, 2 H), 3.72 (t, J=5.99 Hz, 2 H), 3.61 - 3.67 (m, 4 H), 3.54 - 3.61 (m, 8 H), 3.48 - 3.54 (m, 6 H), 3.37 - 3.47 (m, 4 H), 3.17 - 3.29 (m, 2 H), 2.49 (br t, J=5.87 Hz, 2 H), 2.43 (t, J=5.87 Hz, 2 H), 2.18 - 2.26 (m, 4 H), 1.76 - 1.90 (m, 1 H), 1.51 - 1.73 (m, 7 H), 1.48 (s, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 1.18 - 1.37 (m, 26 H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.34, 173.04, 171.80, 171.43, 171.34, 156.62, 144.00, 141.35, 127.69, 127.05, 125.04, 119.97, 82.05, 79.87, 77.55, 70.22, 70.18, 70.16, 70.07, 69.92, 67.23, 66.51, 53.40, 52.29, 50.86, 47.34, 40.99, 39.18, 39.04, 37.04, 36.95, 36.67, 35.67, 32.42, 29.70 (br s), 29.68 (br s), 29.65 (br s), 29.63 (br s), 29.54, 29.51, 29.38, 29.34, 29.32, 29.12, 29.01, 28.15, 28.0, 25.68,

25.16, 22.51. $[MH]^+$ 1254.90.

[0500] tert-부틸 (S)-1-아미노-25-(tert-부톡시카르보닐)-9,19,27-트리옥소-3,6,13,16-테트라옥사-10,20,26-트리아자테트라테트라콘탄-44-오에이트 (35). Et_3N (1.2 mL, 8.61 mmol)을 DMF (3 mL) 중 (S)-tert-부틸 29-(tert-부톡시카르보닐)-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,13,23,31-테트라옥소-2,7,10,17,20-펜타옥사-4,14,24,30-테트라아자옥타테트라콘탄-48-오에이트 (34) (330 mg, 0.301 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 고진공 하에 제거하였다. 잔류물을 2M NH_3-MeOH/CH_2Cl_2 (1:9)로 용리시키면서 플래쉬 크로마토그래피하여, (S)-tert-부틸 1-아미노-25-(tert-부톡시카르보닐)-9,19,27-트리옥소-3,6,13,16-테트라옥사-10,20,26-트리아자테트라테트라콘탄-44-오에이트 (35) (164 mg, 0.188 mmol, 62.3% 수율)를 무색 액체로서 수득하였다.

[0501] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.78 - 6.92 (m, 1 H), 6.48 - 6.62 (m, 1 H), 6.15 - 6.35 (m, 1 H), 4.35 - 4.53 (m, 1 H), 3.75 (q, J=6.11 Hz, 4 H), 3.59 - 3.68 (m, 8 H), 3.54 - 3.59 (m, 2 H), 3.49 - 3.54 (m, 2 H), 3.40 - 3.48 (m, 3 H), 3.16 - 3.29 (m, 2 H), 2.80 - 2.92 (m, 2 H), 2.38 - 2.57 (m, 4 H), 2.12 - 2.32 (m, 4 H), 1.75 - 1.87 (m, 1 H), 1.49 - 1.75 (m, 8 H), 1.47 (s, 9 H), 1.45 (s, 9 H), 1.20 - 1.38 (m, 26 H). ^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.32, 173.04, 171.80, 171.47, 171.37, 81.99, 79.85, 74.86, 73.34, 70.30, 70.23, 70.12, 70.08, 69.88, 67.30, 52.31, 50.60, 41.74, 39.18, 39.00, 37.05, 37.00, 36.64, 35.65, 32.35, 29.67, 29.66, 29.61, 29.52, 29.48, 29.33, 29.31, 29.31, 29.11, 29.04, 28.13, 28.03, 25.68, 25.13, 22.51. $[MH]^+$ 873.75.

[0502] (S)-23-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,21,29,39,49-펜타옥소-3,32,35,42,45-펜타옥사-22,28,38,48-테트라아자도펜타콘탄-52-산 (36). 피리딘 (5.0 mL)을 실온에서 (S)-tert-부틸 1-아미노-25-(tert-부톡시카르보닐)-9,19,27-트리옥소-3,6,13,16-테트라옥사-10,20,26-트리아자테트라테트라콘탄-44-오에이트 (35) (164 mg, 0.188 mmol), 및 디히드로푸란-2,5-디온 (94 mg, 0.939 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 모든 휘발성 성분을 고진공 하에 제거하였다. 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 TFA로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기 성분을 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 (S)-23-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,21,29,39,49-펜타옥소-3,32,35,42,45-펜타옥사-22,28,38,48-테트라아자도펜타콘탄-52-산 (36) (123 mg, 0.126 mmol, 67.3% 수율)을 무색 액체로서 수득하였다. $[MH]^+$ 973.81.

[0503] 29,47-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) (S)-3,13,23,31-테트라옥소-7,10,17,20-테트라옥사-4,14,24,30-테트라아자헵타테트라콘탄-1,29,47-트리카르복실레이트 (37). (S)-23-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,21,29,39,49-펜타옥소-3,32,35,42,45-펜타옥사-22,28,38,48-테트라아자도펜타콘탄-52-산 (36) (123 mg, 0.126 mmol), 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (21.8 mg, 0.190 mmol), 및 EDC (31.5 mg, 0.164 mmol)의 혼합물에 CH_2Cl_2 (5 mL)를 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 실온에서 밤새 교반하였고, LC/ELSD-MS는 대략 70% 전환을 나타내었다. 추가의 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (21.8 mg, 0.190 mmol), 및 EDC (31.5 mg, 0.164 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 3.5시간 동안 교반하였다. LC/ELSD-MS는 완전한 전환을 나타내었다. 혼합물을 CH_2Cl_2 (150 mL)로 희석하고, 물/염수 (2:1)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 고진공 하에 농축시켜 (S)-29,47-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 3,13,23,31-테트라옥소-7,10,17,20-테트라옥사-4,14,24,30-테트라아자헵타테트라콘탄-1,29,47-트리카르복실레이트 (37) (135 mg, 0.126 mmol, 100% 수율)를 무색 액체로서 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 사용하였다. $[MH]^+$ 1070.93.

[0504] tert-부틸 (S)-39-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,23,33,41-헥사옥소-3,6,17,20,27,30-헥사옥사-5,9,14,24,34,40-헥사아자옥타펜타콘탄-58-오에이트 (38). $NaHCO_3$ (21.2 mg, 0.252 mmol)을 DME (4.5 mL) 및 물 (1.5 mL) 중 (S)-29,47-디-tert-부틸 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 3,13,23,31-테트라옥소-7,10,17,20-테트라옥사-4,14,24,30-테트라아자헵타테트라콘탄-1,29,47-트리카르복실레이트 (37) (135 mg, 0.126 mmol), 및 tert-부틸 2-아미노에톡시카르바메이트 히드로클로라이드 (53.6 mg, 0.252 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 생성된 투명한 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 모든 휘발성 성분을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 TFA로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링

함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기 성분을 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 동결건조시켜 표제 화합물 (S)-tert-부틸 39-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,23,33,41-헥사옥소-3,6,17,20,27,30-헥사옥사-5,9,14,24,34,40-헥사아자옥타펜타콘탄-58-오에이트 (38) (118 mg, 0.104 mmol, 83.0% 수율)를 수득하였다. $[MH]^+$ 1131.99.

[0505] (S)-1-(아미노옥시)-33-카르복시-4,7,17,27,35-펜타옥소-11,14,21,24-테트라옥사-3,8,18,28,34-펜타아자도펜타콘탄-52-산 (39). TFA (2 mL)를 CH_2Cl_2 (2 mL) 중 (S)-tert-부틸 39-(tert-부톡시카르보닐)-2,2-디메틸-4,10,13,23,33,41-헥사옥소-3,6,17,20,27,30-헥사옥사-5,9,14,24,34,40-헥사아자옥타펜타콘탄-58-오에이트 (38) (118 mg, 0.104 mmol), 및 1,4-디메톡시벤젠 (144 mg, 1.043 mmol)의 혼합물에 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 5분 동안 교반한 다음, 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시킨 다음, 고진공 하에 30분 동안 건조시켰다. 잔류물을 C-18 칼럼 상에서 중압 역상 크로마토그래피에 의해 MeCN/수성 TFA로 용리시키면서 정제하였다 (ELSD-MS에 의해 모니터링함). 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 휘발성 유기 성분을 질소의 흐름을 사용하여 제거하였다. 목적 생성물을 함유하는 생성된 수용액을 질소의 흐름 하에 -78℃로 냉각시키고, 동결건조시켜 (S)-1-(아미노옥시)-33-카르복시-4,7,17,27,35-펜타옥소-11,14,21,24-테트라옥사-3,8,18,28,34-펜타아자도펜타콘탄-52-산 (39) (60.0 mg, 0.064 mmol, 61.3% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. 분석 UHPLC-CAD 조건 D를 사용하여 그의 LC-CAD 순도는 98.0%인 것으로 결정되었다. $[MH]^+$ 919.88, [M+2H]+/2 460.69.

[0506] 실시예 7: 세포내 cAMP 축적 검정

[0507] H2 렐락신의 효과는 그의 동족 G 단백질 커플링된-수용체, 렐락신 패밀리 펩티드 수용체 (RXFP1)를 통해 매개되고, 이는 세포 유형 의존적인 세포 신호전달 경로의 조합의 자극으로 이어지며, 아데닐레이트 시클라제, 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, 포스파티딜이노시톨 3-키나제, 및 세포외 신호전달 조절 키나제 (Erk 1/2)를 포함할 수 있다. 문헌 [Bathgate, et al., 2006. Pharmacol. Rev. 58, 7-31]. 본원에 기재된 세포내 cAMP 축적 검정을 렐락신 생물활성 및 효능을 평가하는데 사용하였다. 시험 화합물은 WT-RLX (도 1), AQ1 (도 2) 및 BM25/AN1 (도 3)을 기초로 하였다. 제시된 바와 같은 PK 연장제를 실시예 3에 기재된 바와 같이 옥심 연결을 통해 AQ1 및 BM25/AN1 내에 함유된 파라-아세틸-페닐알라닌에 접합시켰다.

[0508] 인간 RXFP1 수용체 (유전자좌 번호 LOC59350)를 안정하게 발현하는 CHO-K1 세포 (ATCC; Cat. # CRL-9618) (10,000/웰)를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 37℃ 및 5% CO_2에서 밤새 배양하였다. 다음날 배지를 웰로부터 제거하고, 세포를 50 uL 완충제 (1X HBSS, 5 mM HEPES (7.2), 0.5 mM IBMX, 0.1% BSA) 중 리간드 (렐락신 폴리펩티드)의 첨가에 의해 자극하고; 37℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 비자극된 세포를 참조 대조군으로서 사용하였다. 반응을 종결시키고, 제조업체의 프로토콜에 따라 균질 시간 분해 형광 (HTRF) 동적 2 cAMP 키트 (시스바이오(CisBio), #62AM4PEC)를 사용하여 세포 cAMP 수준을 측정하였다. 플레이트를 엔비전 2104 멀티라벨 리더(EnVision 2104 Multilablel Reader) (퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 분석하였다. 신호는 형광 강도 @ 665 nm/형광 강도 @ 620nm x 10,000의 비의 관점에서 표현하였다. 샘플 중 cAMP 농도는 공지된 농도의 cAMP로부터 생성된 표준 곡선과의 비교에 의해 결정하였다. 각각의 렐락신의 효능을 이중으로 수행된 10-포인트 농도 반응 곡선을 사용하여 결정하였다. 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Excel), 버전 2013 엑스엘핏 (Xlfit) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 가변 기울기가 허용되는 4-파라미터 로지스틱 방정식을 사용하여 반응이 1/2 최대인 지점인 유효 농도 50 (EC50) 값을 계산하였다 (표 3).

[0509] 표 3. 세포내 cAMP 축적 검정 결과. 약어가 이러한 표에 사용되었다: dK: D-리신; Sar: 사르코신 (N-메틸글리신); dGlu: D-글루탐산; 20kDa PEG: 폴리(에틸렌 글리콜), 20 kDa 분자량; PEGn (예를 들어, n은 2, 12, 24, 또는 36임): $-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$; -C13-: $-(C=O)-(CH_2)_{12}-$; -C14-: $-(C=O)-(CH_2)_{13}-$; -C15-: $-(C=O)-(CH_2)_{14}-$ (이들 약어는 화학식 I의 -Cn- 또는 이러한 표 외에서의 이들 용어의 사용을 예시하나 이에 제한되지는 않음). 표 3의 Glu^{γ}-C13-, Glu^{γ}-C14-, Glu^{γ}-C15-, 및 Glu^{γ}-C17-에서, 지방산의 제1 카르보닐 탄소는 아미드 결합을 통해 (감마) Glu 잔기에 결합된다.

[0510]

렐락신 접합체 명칭	hRXFP1/CHO-K1 cAMP EC50 (nM, avg)	펩티드 성분 SEQ ID NO:
WT-RLX	0.12	
BM25/AN1	0.09	
BM25/AN1-C13-CH3	1.85	
AQ1	0.11	
AQ1-20kDa PEG	3.22	
AQ1-Glu-C13-CH3	0.95	
AQ1-Glu-C13-COOH	0.18	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	0.15	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	0.25	
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.14	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	0.32	102
AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.08	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.29	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.22	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.31	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.09	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.65	108
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.19	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.28	110
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.39	111
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.32	112
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.59	113
AQ1-KKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.34	114
AQ1-KKSGGSGG-Glu$^{\alpha}$-C13-COOH	0.27	115
AQ1-KKSAGSAG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.27	116
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.24	117
AQ1-KKKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.14	118

AQ1-KKSGGSGGEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.16	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.10	120
AQ1-EESGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.83	121
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.55	122
AQ1-GSGSGSGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	2.79	123
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	5.26	124
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C17-COOH	10.52	125
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	0.38	126
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	0.46	127
AQ1-EEEGGG-dGlu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.91	128
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.88	129
AQ1-EGGGGSK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.31	130
AQ1-EEEEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	11.06	131
AQ1-화합물 39	2.23	
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.33	133
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	0.34	134
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEGGG-C14-CH3	0.16	135
AQ1-EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Gluγ-C14-CH3	0.67	136
AQ1-KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.81	137
AQ1- EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	4.96	138
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH[a]	0.28	139
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.10	140
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.34	141
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	0.40	142
AQ1-EEEEEE-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.38	143
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.35	144
AQ1-KGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.27	145
AQ1-KGPKGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.23	146
AQ1-SGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.32	147

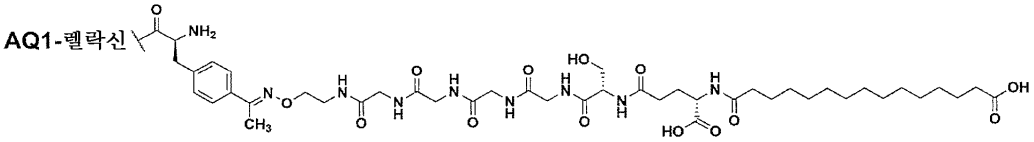
[0511]

AQ1-KGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.34	148
AQ1-KGGGSE-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.37	149
AQ1-GSPGSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.29	150
AQ1-GGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.39	151
AQ1-EGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.33	152
AQ1-EGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.44	153
AQ1-KGPGSE-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.60	154
AQ1-스페르민-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.39	
AQ1-KKGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.36	156

[0512]

[0513] [a] 렐락신 접합체 AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (서열식별번호: 139)-C14-COOH는 서열식별번호: 35의 렐락신 A 쇄 폴리펩티드

및 서열식별번호: 6의 렐락신 B 쇄 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 상기 렐락신 A 쇄 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 변형된 파라-아세틸-L-페닐알라닌은 화학식 III에 도시된 바와 같이 GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH를 포함하는 PK 인핸서에 연결된다.



(화학식 III)

[0514]

[0515] 실시예 8: 생체내 약동학적 (PK) 연구

[0516] 수컷 스프라그-돌리 래트 (n=3)에게 적합한 완충제 (예를 들어, 20 mM 히스티딘, 750 mM NaCl, pH 6.0) 중에서 제제화된 렐락신 구축물 (상기 실시예 7에 기재된 바와 같음)의 단일 정맥내 (IV) 또는 피하 (SC) 용량 (1 mg/kg)을 제공하였다. 혈액 샘플을 상이한 시점에 경정맥을 통해 72시간까지 수집하였다. 혈액 샘플을 실온에서 응고되도록 하고 (30-60분), 이어서 4℃에서 원심분리 (1500-2000)하여 혈청을 수득하였다. 원심분리 후, 혈청 샘플을 96 웰 플레이트로 옮기고, 생물분석까지 -80℃에서 저장하였다. 렐락신 농도를 ELISA에 의해 혈청으로부터 측정하였다.

[0517] 개별 동물로부터의 렐락신 농도-시간 프로파일을 분석을 위해 사용하였다. 약동학적 파라미터는 포에닉스 윈논린(Phoenix WinNonlin) (버전 6.4) 또는 키네티카(Kinetica) (버전 5)를 사용하여 비-구획 방법에 의해 계산하였다. 평균 약동학적 파라미터 C_{max}, AUC_{inf}, C_{24} 및 반감기를 보고하였다 (표 4).

[0518] 표 4. 생체내 PK 데이터 (약어는 표 3에서와 같음)

렐락신 접합체 명칭	래트 PK SC 용량 (mg/kg)	래트 PK AUC 총 h*nmol/L	래트 PK C24 (nM)	펩티드 성분의 SEQ ID NO:
AQ1-20kDa PEG	1.0[a]	1475	39	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	1.0	1003	9.7	
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.8	1096	1.52	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	1.0	1008	0.38	102
AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	38	0.05	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	987	0.10	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	866	0.18	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	1381	0.29	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	258	0.24	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	1112	0.28	108
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	231	0.10	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	582.0	0.46	110
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	814	0.73	117
AQ1-KKKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	264	0.21	118
AQ1-KKSGGSGGEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	676	0.09	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	31.2	0.06	120
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0[b]	5526	44	122
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0	3553	22	124
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	1.0	274	0.4	126

[0519]

AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	1.0	370	0.89	127
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0[c]	2137	5.2	129
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	2308	17	139
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	451	1.5	141
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0	820	8.8	142
AQ1-GSPGSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	1979	5	150
AQ1-GGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	2179	3.9	151

[0520]

[0521] [a] 0.2 mpk로부터 조정됨

[0522] [b] 0.3 mpk로부터 조정됨

[0523] [c] 0.5 mpk로부터 조정됨

[0524] 실시예 9: 래트 신장 혈류 연구

[0525] 수컷 스프라그 돌리 래트 (~250-300g)를 소듐 펜토바르비탈 (50 mg/kg)로 마취시키고, 기관을 PE-205 튜빙으로 캐뉼라삽입하여 기도 개존성을 유지시키고, 가열된 수술 플레이트를 사용하여 온도를 37℃로 유지시켰다. 1.4F 압력 카테터 (밀러 인크.(Millar Inc.), 텍사스주 휴스턴)를 우측 경동맥으로 전진시켜 대동맥 혈압을 측정하였다. 우측 경정맥을 시험 물품의 투여를 위해 PE-50 튜빙으로 캐뉼라삽입하였다. 좌측 신장을 복막후 절개에 의해 노출시키고, 도플러 유동 프로브 (모델 0.5 VB, 트랜소닉 시스템 인크.(Transonic System Inc.), 뉴욕주 이타카)를 좌측 신동맥에 부착시켜 혈류를 모니터링하였다. 이들 수술 절차의 완료 후 소듐 펜토바르비탈 (15 mg/kg, 복강내)을 보충하였다. 10-15분 평형 후, 렐락신을 주입 펌프 (하버드 어패러투스(Harvard Apparatus), 매사추세츠주 홀리스톤)를 통해 30초에 걸쳐 0.15 내지 1.82 mL/kg의 투여 부피로 1 mg/kg으로 정맥내로 투여하였다. 랩차트(LabChart) 7-프로 데이터 획득 소프트웨어 (에이디인스트루먼츠(ADInstruments), 뉴질랜드 더니든)를 구동하는 데스크톱 컴퓨터에 연결된 밀러(Millar) MPVS 울트라 시그널 컨디셔닝 유닛을 사용하여 렐락신 투여 후 45분 동안 혈압, 심박수 및 신장 혈류를 연속적으로 기록하였다 (표 5).

[0526] 표 5. 래트 신장 혈류 변화 (약어는 표 3에서와 같음).

렐락신 접합체	기준선 대비 RBF에서의 변화 %	펩티드 성분의 SEQ ID NO:
WT-RLX	+25	
AQ1-20kDa PEG	+21	
BM25/AN1	-20	
BM25/AN1-C13-CH3	-100[a]	
BM25/AN1- PEG36-C13-CH3	-90	
BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3	-25	
AQ1	-17	
AQ1-Glu-C13-CH3	-27[b]	
AQ1-Glu-C13-COOH	+14[b]	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	+20[b]	
AQ1-PEG36-C13-COOH	+22	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	+24	
AQ1-PEG36-Glu-C15-COOH	+30	
AQ1-PEG24-Glu-C13-COOH	+15	
AQ1-PEG12-Glu-C13-COOH	+5	
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+2	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	+11	102
AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+12	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+19	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+11	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+7[b]	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+10[b]	107
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+9	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+16	110

[0527]

AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+6	157
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+5	158
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+17	117
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	+1	126
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	+18	127
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	+10	139

[0528]

[0529] [a] 동물은 화합물 투여 직후 사망하였다. 부검은 연한 색의 신장을 나타내었고, 이는 혈류의 완전한 손실을 나타

낸다.

[0530] [b] 화합물은 난용성인 것으로 관찰되었다.

[0531] 상기 표로 나타낸 결과는 접합체 구조 및 위치 사이의 복잡한 관계 및 생성된 신장 혈류를 예시한다. WT-RLX 단독은 기준선에 비해 신장 혈류에서 대략 25% 증가를 도출하였고, 이는 렐락신의 공지된 혈관 활성을 고려하여 예상되었다. 렐락신 효능제인 다양한 시험 화합물 (실시예 7 참조)이 마찬가지로 신장 혈류의 증가를 도출할 것으로 예상되었다. 그러나 놀랍게도, 화합물 중 일부는 신장 혈류에서 감소를 도출하였음이 관찰되었다. 신장 혈류의 이러한 손상은 신장 손상이 종종 관찰되는 임상적으로 유의한 금기, 특히 심부전일 수 있다. 화합물 BM25/AN1, BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3, AQ1, 및 AQ1-Glu-C13-CH3은 모두 손상된 신장 혈류를 초래하였다 (상기 표 5).

[0532] 이러한 결과는 예상외의 것이었고, 예측불가능하였다. 구조적으로 관련된 화합물은 신장 혈류에 대해 불일치하는 효과를 나타내었다. 당뇨병의 치료를 위한 인슐린의 FDA-승인된, 시판되는 장기-작용 형태인 레베미르(LEVEMIR)®는, 안전성이 입증된 인슐린-C13-CH3 접합체이다 (노보 노르디스크 A/S(Novo Nordisk A/S)에 의한 NDA 21-878, 페이지 1). 대조적으로, 레베미르®와 구조적으로 유사한 BM25/AN1-C13-CH3의 투여는 래트에서 치명적이고, 부검은 연한 신장을 나타내었으며, 이는 신장 혈류가 차단되었음을 나타낸다. 또한, A 쇄의 위치 1에서 파라-아세틸-페닐알라닌에 의한 단일 아미노산 치환을 함유하는 AQ1 렐락신은 신장 혈류를 감소시키는 반면, 동일한 비-천연 아미노산 치환을 함유하지만 20kDa PEG에 접합된 AQ1-20kDa PEG 화합물은 신장 혈류를 증가시켰다. 추가로, BM25/AN1-PEG36-Glu-C13-CH3은 신장 혈류를 감소시켰지만, AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3은 신장 혈류를 증가시켰다. 감소된 신장 혈류를 유발하는 상기 언급된 화합물 중 몇몇은 메틸 기로 종료되는 PK 인핸서, 예를 들어 BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-C13-CH3, 및 AQ1-Glu-C13-CH3을 함유하였다. 그러나, AQ1-EEEGGG-Glu[Y]-C15-CH3 및 AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3으로 처리된 동물은 우수한 신장 혈류를 나타내었고, 이는 메틸 기가 언제나 불량한 신장 혈류를 유발하지는 않는다는 것을 나타낸다. 대조적으로, AQ1-GGGGS-Glu[Y] (서열식별번호: 139)-C14-COOH, 및 펩티드 성분 및 -C13-COOH, -C14-COOH 또는 -C15-COOH 지방산을 포함하는 PK 인핸서에 접합된 다른 시험된 AQ1 렐락신 분자는 일반적으로 개선된 신장 혈류를 나타내었다 (상기 표 5).

[0533] 실시예 10: 래트 독성 연구

[0534] AQ1-20kDa-PEG를 10일 동안 1, 5 및 15 mg/kg/일의 용량으로 피하 투여에 의해 래트에게 제공하였다. 최종 용량 후, 동물을 안락사시키고, 해부하고, 신장 조직병리학을 수행하였다. 모든 용량에서 신장 세관 상피 세포에서 공포가 관찰되었다 (도 7C). 대조적으로, 10일 동안 피하로 비히클 (10 mM 시트레이트 완충제 중 150 mM Arg, pH 5.5)을 투여한 래트의 신장 세관 상피 세포에서는 공포가 관찰되지 않았다 (도 7A).

[0535] AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH를 7일 동안 10 및 40 mg/kg/일의 용량으로 피하 투여에 의해 래트에게 제공하였다. 최종 용량 후, 동물을 안락사시키고, 해부하고, 신장 조직병리학을 수행하였다. 모든 용량에서 신장 세관 상피 세포에서 공포가 관찰되었다 (도 7B).

[0536] AQ1-GGGGS-Glu[Y] (서열식별번호: 139)-C14-COOH를 7일 동안 5, 20, 및 40 mg/kg/일의 용량으로 피하 투여에 의해 래트에게 제공하였다. 최종 용량 후, 동물을 안락사시키고, 해부하고, 신장 조직병리학을 수행하였다. 모든 용량에서, 신장 세관 상피 세포는 정상으로 보였고, 시험-물품 관련 공포는 입증되지 않았다 (도 7D).

[0537] 화합물 AQ1-GGGGS-Glu[Y] (서열식별번호: 139)-C14-COOH도 또한 양호한 신장 혈류 결과 (실시예 9), 바람직한 용해도 프로파일 (데이터는 제시되지 않음), 및 AQ1-20kDa PEG보다 유의하게 더 낮은 점도를 나타냈다.

[0538] 실시예 11: 인간 1차 심장 섬유모세포에 대한 렐락신의 효과

[0539] 1차 인간 심장 섬유모세포 (NHCF-V)를 뉴저지주 페어론 소재의 론자(Lonza)에서 구입하였다 (Cat.#: CC-2904). NHCF-V 세포를 정상, 성인 심장 조직의 심실로부터 단리하였다. 세포는 평활근 α-액틴에 대해 양성으로 염색되었고, ≥ 90% 콜라겐 I 및 ≤ 10% 폰 빌레브란트 인자 VIII을 발현하였다. 계대배양 3 내지 6의 세포를 실시간 정량적 역전사-폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 연구에 사용하였다. 세포를 10% FBS 완전 배지를 함유하는 FGM™-3 불렛키트(BulletKit)™ (Cat. #: CC-4526, 론자)에서 배양하였다. 전면생장률에서, 세포를 분할하고, 완전 배지에서 24시간 동안 150,000개/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에서 배양하였다. 후속해서, 세포를 무혈청 배지 (Cat. #: CC-3131, 섬유모세포 기초 배지, 론자)로 24시간 동안 바꾼 다음, 0.5 ng/mL의 TGF-

β (Cat. #: 240-B, 알앤디 시스템즈(R&D Systems))의 존재 하에 인간 H2 렐락신 (Cat. #: 3596-RN, 알앤디 시스템즈) 또는 AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH로 또 다른 24시간 동안 처리하였다. 프로파일링 및 치료 지속기간을 위한 TGF-β 농도의 선택은 이전 보고서에 기초하였다. 6-웰 플레이트 내의 세포를 총 RNA 추출 및 qRT-PCR 분석을 위해 수거하였다.

[0540] RN이지(RNeasy) 미니 키트 (Cat. #: 74106, 퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 게놈 cDNA의 칼럼-상 제거를 포함한 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA를 추출하였다. 실시간 qRT-PCR을 2-단계 방식으로 수행하였고; cDNA 합성 및 실시간 검출을 각각 PTC-100 써멀 사이클러(Thermal Cycler) (엠제이 리서치(MJ Research)) 및 ABI 프리즘 7700 서열 검출 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))에서 수행하였다. 택맨 유니버셜 PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈)를 후속 PCR 반응에 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 모든 qRT-PCR 반응을 이중으로 수행하였다. 평활근 알파-액틴 (센스: 5'-AAATACTCTGTCTGGATCGGTGGCTCC-3' (서열식별번호: 51); 안티센스: 5'-CACATAGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGCTA-3' (서열식별번호: 52)) 및 하우스키핑 유전자 L30 (센스: 5'-GCTGGAGTCGATCAACTCTAGG-3' (서열식별번호: 53); 안티센스: 5'-CCAATTTCGCTTTGCCTTGTC-3' (서열식별번호: 54))에 대한 서열-특이적 프라이머를 공개된 서열 (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 기초하여 프라이머 발현 버전 2 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 설계하였다. 평활근 알파 액틴의 발현 수준을 하우스키핑 유전자 L30의 발현 수준에 대해 정규화하였다. AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH로 처리된 인간 심장 섬유모세포를, 비히클-처리된 세포와의 유의성 차이에 대해 스튜던트 T-검정을 사용하여 분석하였고 (마이크로소프트 엑셀, 버전 2013), ≤ 0.05의 P 값이 유의한 것으로 간주되었다.

[0541] AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH는 TGF-베타 처리된 (0.5 ng/mL; 24시간) 1차 인간 심장 섬유모세포에서 섬유화유발 유전자, 평활근 알파-액틴의 발현을 감소시키는 것으로 입증되었다. 도 6A-6B에 제시된 바와 같이, 유전자 발현에서의 감소는 농도 의존성이었고, 인간 H2 렐락신 및 AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH 둘 다의 경우 동등하게 강건하였다. AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (서열식별번호: 139)-C14-COOH는 섬유화 질환, 예를 들어 심장 섬유증을 치료하기 위한 항섬유화제로서 사용될 수 있다.

[0542] 실시예 12: PK 인핸서의 추가 실시예

[0543] 하기 표 6에 제시된 바와 같은 PK 인핸서를, 일반적으로 상기 실시예 4, 5 및 6에 기재된 방법에 따라 생산하였다. 이들 PK 인핸서를 실시예 3에 기재된 방법을 사용하여 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드에 접합시키고 (예를 들어, A 쇄 위치 1, 예컨대 RLX-AQ1에서), 실시예 7-11에 기재된 바와 같이 생물학적 활성, 약동학적 특성, 신장 혈류에 대한 효과, 공포 형성 및 심장 섬유모세포에 대한 효과를 시험하는 것을 포함하여 특징화하였다.

[0544] 표 6. 예시적인 PK 인핸서 (약어는 표 3, 및 하기 표시된 바와 같음).

PK 인핸서 구조	**펩티드 성분 SEQ ID NO:**
AAAAAS-X-FA	159
AAAAS-X-FA	160
AAAS-X-FA	161
AASAASAASAA-X-FA	162
AASAASAAS-X-FA	163
AASAAS-X-FA	164
AASSA-X-FA	165
AAS-X-FA	166
AGAGS-X-FA	167
AGAGS-X-FA	168
AGAS-X-FA	169
AGAS-X-FA	170
AGGAS-X-FA	171
AGGAS-X-FA	172
AGGGS-X-FA	173
AGGGS-X-FA	174
AS-X-FA	175
$A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}S$-X-FA	176
$A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}S$-X-FA	177
$A^{\beta}A^{\beta}S$-X-FA	178
$A^{\beta}S$-X-FA	179
EGGEGG-Z-FA	180
EGGEGP-Z-FA	181
EGPEGP-Z-FA	182
GGAAS-X-FA	183
GGAAS-X-FA	184
GGAS-X-FA	185
GGAS-X-FA	186

[0545]

GGGAS-X-FA	187
GGGAS-X-FA	188
GGGGGGS-X-FA	189
GGGGGS-X-FA	190
GGGGS-FA	191
GGGGS-PEG2-PEG2-X-FA	192
GGGGS-X-C14-COOH	193
GGGGS-X-FA-말론산 꼬리	194
GGGGS-X-FA-숙신산 꼬리	195
GGGGS-Z-FA	196
GGGGS-Z-FA	197
GGGGT-FA	198
GGGSG-X-FA	199
GGGSSS-X-FA	200
GGGSS-X-FA	201
GGGSS-X-FA	202
GGGS-X-FA	203
GGGTTTT-X-FA	204
GGSGGGGG-X-FA	205
GGSGGSGGSGG-X-FA	206
GGSGGSGGS-X-FA	207
GGSGGS-X-FA	208
GGSGG-X-FA	209
GGSGS-X-FA	210
GGSSG-X-FA	211
GGSSSS-X-FA	212
GGSSS-X-FA	213
GGSS-X-FA	214
GGSS-X-FA	215
GGSS-X-FA	216
GGS-Z-FA	217
GGTTTT-X-FA	218

[0546]

GGTTT-X-FA	219
GGTT-X-FA	220
GSGGG-X-FA	221
GSGGS-X-FA	222
GSGSGSGSGS-X-FA	223
GSGSGSGS-X-FA	224
GSGSGS-X-FA	225
GSGSG-X-FA	226
GSGS-X-FA	227
GSP-Z-FA	228
GSSSS-X-FA	229
GSSS-X-FA	230
GSS-X-FA	231
GS-Z-FA	232
GTTT-X-FA	233
GTT-X-FA	234
KGGGS-Z-FA	235
KGGKGG-Z-FA	236
KK-PEG2-PEG2-X-FA	237
KKS-FA	238
KKS-Z-FA	239
KKT-FA	240
KKT-Z-FA	241
KK-X-말론산 꼬리	242
KK-X-숙신산 꼬리	243
KK-Z-FA	244
KPKS-Z-FA	245
KSGGGSK-Z-FA	246
KSGKSG-Z-FA	247
SGGGGG-X-FA	248
SGGGG-X-FA	249
SGGGG-X-FA	250

[0547]

SGGGS-X-FA	251
SGGG-X-FA	252
SGG-X-FA	253
SG-X-FA	254

[0548]

[0549] X = Glu^{γ}, (D)-Glu^{γ}, Asp^{α}, Asp^{β}, (D)-Asp^{α}, 또는 (D)-Asp^{β}

[0550] Z = (D)-Glu^{γ}, Asp^{α}, Asp^{β}, (D)-Asp^{α}, 또는 (D)-Asp^{β}

[0551] FA = 지방산 = 예를 들어, C13-COOH, C14-COOH, 또는 C15-COOH; 달리 나타내지 않는 한

[0552] 하기 표 7에 제시된 PK 인핸서를 일반적으로 본원의 실시예 3-5에 기재된 방법에 따라 합성하였다. 이들 PK 인핸서를 실시예 3에 기재된 방법을 사용하여 비-자연 코딩 아미노산을 포함하는 변형된 렐락신 폴리펩티드에 접

합시키고 (예를 들어, A 쇄 위치 1, 예컨대 RLX-AQ1에서), 실시예 7-11에 기재된 바와 같이 생물학적 활성, 약동학적 특성, 신장 혈류에 대한 효과, 공포 형성 및 심장 섬유모세포에 대한 효과를 시험하는 것을 포함하여 특징화하였다.

[0553] 표 7. 예시적인 PK 인핸서 (약어: N-MeK: 6-N-메틸리신; Dap: 2,3-디아미노프로피온산; 다른 것은 표 3에서와 같음).

PK 인핸서 구조	**펩티드 성분 SEQ ID NO:**
GS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	255
GGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	256
GSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	257
EGGEGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	258
Glu$^{\gamma}$GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	259
EGGEGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	260
EGPEGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	261
스페르민-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	
KGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	262
KSGGGSK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	263
KSGKSG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	264
KGGKGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	265
KPKS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	266
dKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	267
DapDapDapDapDapDap-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	268
N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	269
dKdKdKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	270
GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	271
GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C17-COOH	272

[0554]

KKKKP-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	273
KKKKKK-C13-COOH	274
KAQKAQA-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	275
KKKKPKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	276
KKKKKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	277
EEEGGG-dGlu$^{\gamma}$-C13-CH3	278
GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	279

[0555]

[0556] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 본원에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 제안될 것이고, 이들은 본 출원의 취지 및 범위 내 및 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되어야 한다는 것이 이해된다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 예시적인 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 첨부된 청구범위에 의해서만 제한되는 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 본 출원에 인용된 모든 공개, 특허, 특허 출원, 및/또는 다른 문헌은 각각의 개별 공개, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌이 개별적으로 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 나타내어진 바와 같이 모든 목적상 그 전문이 참조로 포함된다.

도면

도면1

```
WT-RLX      A-쇄      QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
            B-쇄      ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
```

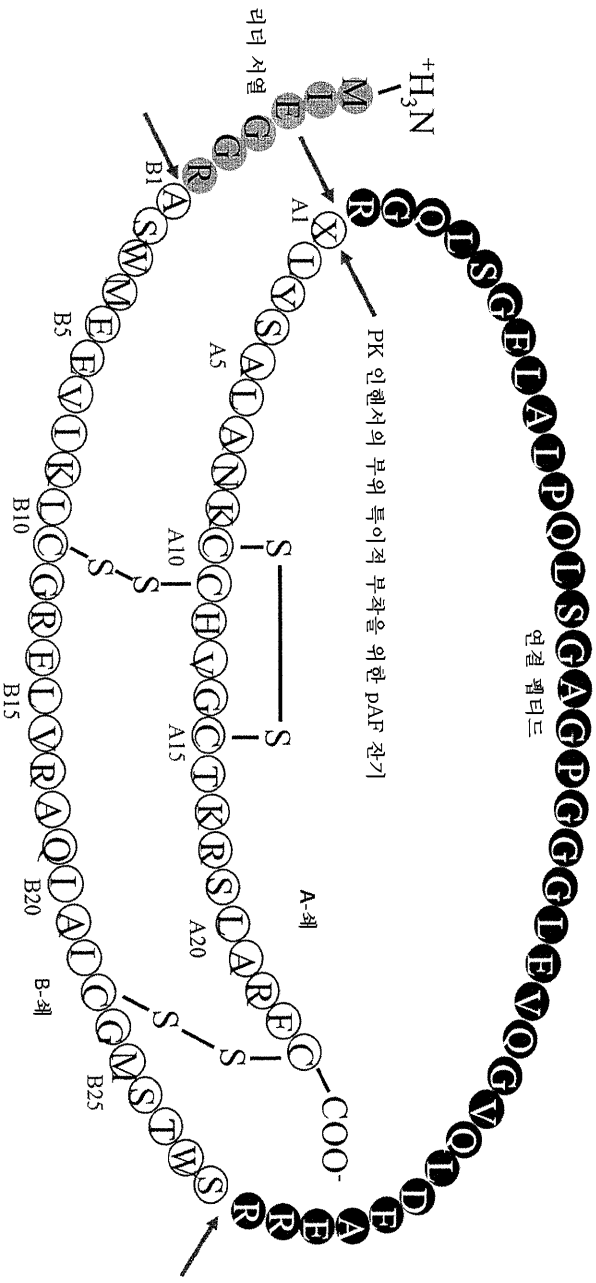
도면2

```
RLX-AQ1     A-쇄      (pAcF)LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
            B-쇄      ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
```

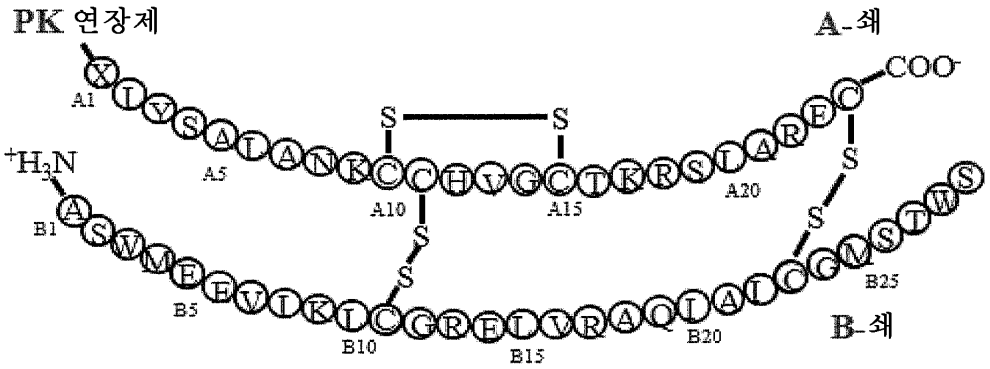
도면3

```
RLX-BM25/AN1 A-쇄     NLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
             B-쇄     ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG(pAcF)STWS
```

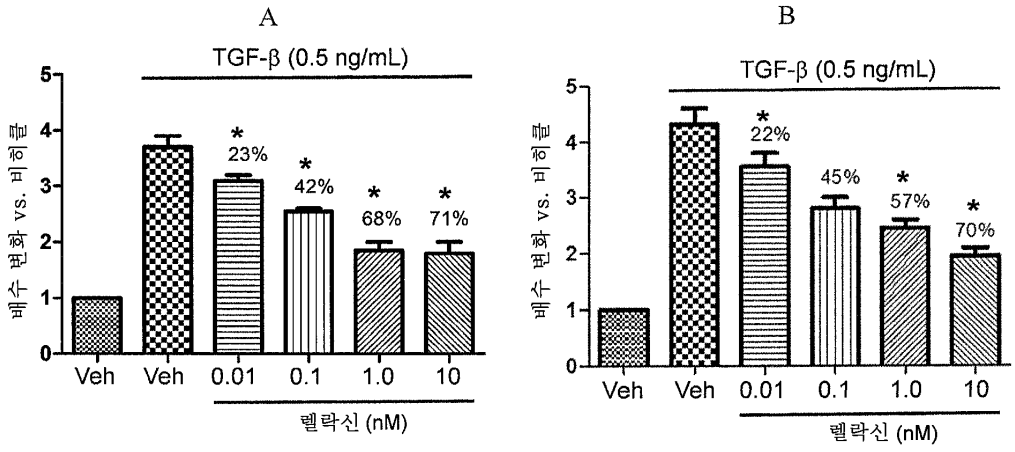
도면4



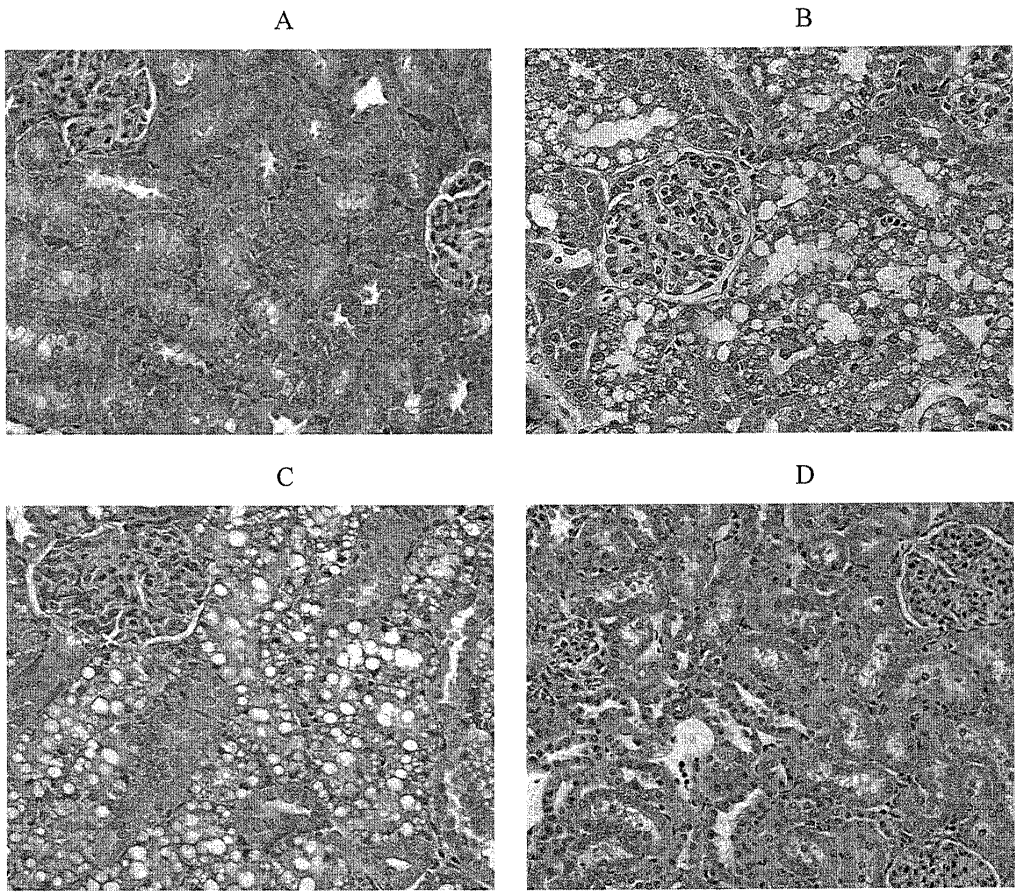
도면5


PK 연장제
A-쇄
B-쇄
COO-
+H3N
A1
A5
A10
A15
A20
B1
B5
B10
B15
B20
B25

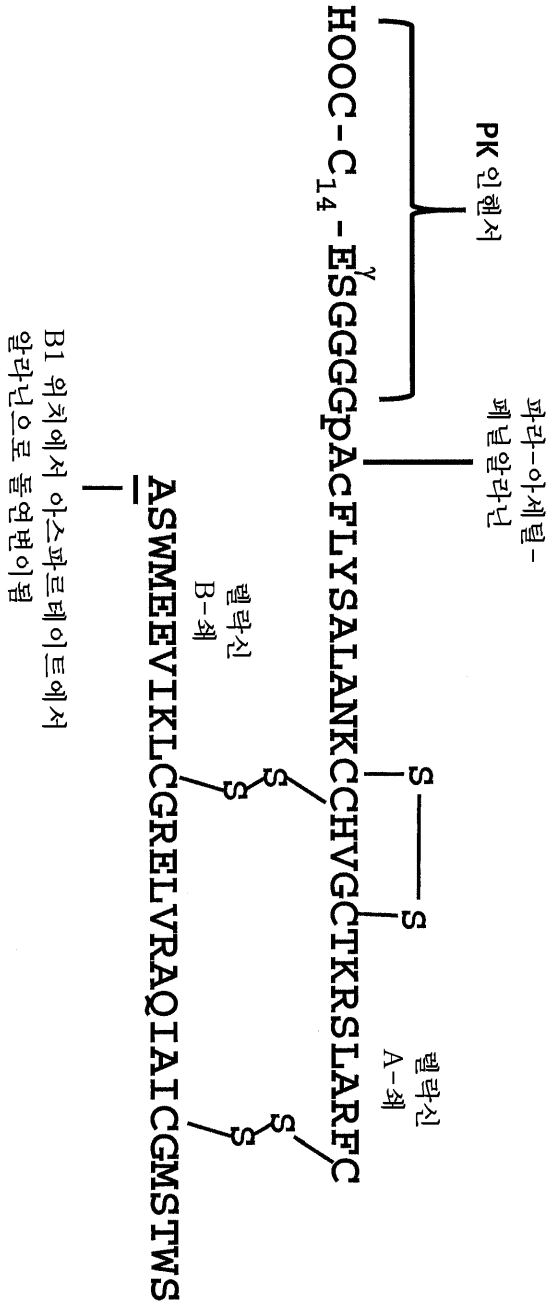
도면6


A
TGF-β (0.5 ng/mL)
배수 변화 vs. 비히클
23%
42%
68%
71%
Veh
Veh
0.01
0.1
1.0
10
렐락신 (nM)
B
TGF-β (0.5 ng/mL)
배수 변화 vs. 비히클
22%
45%
57%
70%
Veh
Veh
0.01
0.1
1.0
10
렐락신 (nM)

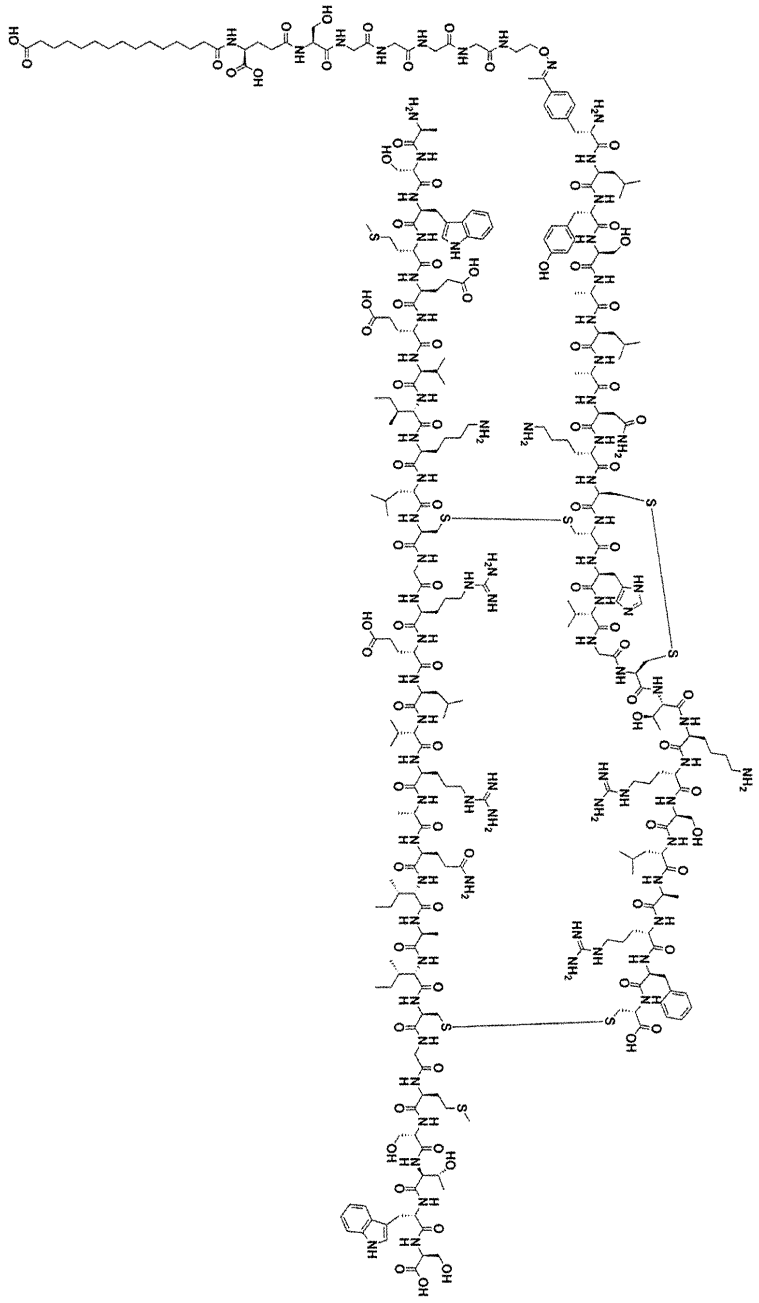
도면7



도면8


PK 인핸서
파라-아세틸-
페닐알라닌
HOOC-C14-EγSGGGGpAcFLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
S
S
S
S
S
S
렐락신
A-쇄
렐락신
B-쇄
ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
B1 위치에서 아스파르테이트에서
알라닌으로 돌연변이됨

도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> MODIFIED RELAXIN POLYPEPTIDES COMPRISING A PHARMACOKINETIC ENHANCER AND USES THEREOF

<130> 46561.2413

<150> 62/627,411

<151> 2018-02-07

<150> 62/456,161

<151> 2017-02-08

<160> 279

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu
20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly

1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu

20 25 30

Gln Lys Arg

35

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg

1 5

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gc 72

<210> 11

<211> 87

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgcagatt 60

gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87

<210> 12

<211> 159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120

cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgaaaaaga atatcgcatt tcttcttaaa cgg 33

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgattgaag gtggtcgt 18

<210> 15

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15
Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30
Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45
Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80
Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 16

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant synthetase derived from Methanococcus jannaschii synthetase

<400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu

305

<210> 17

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Mutant tRNA derived from Methanococcus jannaschii tRNA

<400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccgc cggacca 77

<210> 18

<211> 77

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 18

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccggcccgc cggacca 77

<210> 19

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized amber supressor tRNA

<400> 19

cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60

gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 20

<

211> 89

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> An optimized AGGA frameshift supressor tRNA

<400> 20

gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt 60

cgagggttcg aatccctccc ctcgcacca 89

<210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-azido-L-phenylalanine

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 22
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-benzoyl-L-phenylalanine
<400> 22
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 23

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of propargyl-phenylalanine

<400

> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys

195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys

210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile

225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

245 250 255

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

260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn

275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

290 295 300

Leu

305

<210> 24

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-phenylalanine

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
145 150 155 160
Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300
Leu
305
<210> 25
<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

propargyl-phenylalanine

<400> 25

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300
Leu
305

<210> 26
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine
<400> 26
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 27

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 27

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 28
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 28
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
145 150 155 160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305
<210> 29
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 30
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine
<400> 30
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His

145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 31

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of p-acetyl

-phenylalanine

<400> 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 32
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-acetyl-phenylalanine
<400> 32
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 33

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 34
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Aminoacyl tRNA synthetase for the incorporation of

p-azido-phenylalanine

<400> 34
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 35

<211> 24

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Modified relaxin polypeptide A chain

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is a non-naturally encoded amino acid such as
para-acetyl-L-phenylalanine
<400> 35
Xaa Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20
<210> 36
<211> 24
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Modified relaxin polypeptide A chain
<400> 36
Asn Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20
<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Modified relaxin polypeptide B chain
<220><221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa is a non-naturally encoded amino acid such as
para-acetyl-L-phenylalanine
<400> 37
Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Xaa Ser Thr Trp Ser
20 25

<210> 38

<211> 94

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Modified relaxin polypeptide (prepro sequence)

<220><221> misc_feature

<222> (71)..(71)

<223> Xaa is a non-naturally encoded amino acid such as
para-acetyl-L-phenylalanine

<400> 38

Met Ile Glu Glu Gly Arg Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30

Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Gly Arg Xaa Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Exemplary insulin leader amino acid sequence

<400> 39

Met Ile Glu Glu Gly Arg
1 5

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<400> 46

000

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> PCR Primer

<400> 51

aaatactctg tctggatcgg tggctcc 27

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> PCR Primer

<400> 52

cacataggta acgagtcaga gctttggcta 30

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> PCR Primer

<400> 53

gctggagtcg atcaactcta gg 22

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> PCR Primer

<400> 54

ccaatttcgc tttgccttgt c 21

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Polyhistidine purification tag

<400> 55

His His His His His His Ser Gly Gly

1 5

<210> 56

<400> 56

000

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<400> 74

000

<210> 75

<400> 75

000

<210> 76

<400> 76

000

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<400> 81

000

<210> 82

<400> 82

000

<210> 83

<400> 83

000

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<400> 86

000

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<400> 92

000

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210

> 95

<400> 95

000

<210> 96

<400> 96

000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 101

Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 102

Asp Arg Asp Asp Arg Asp

1 5

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 103

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu
1 5

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 13

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 104

Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
1 5 10

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223
> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 105

Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223

> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 106

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH
<400> 107
Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu
1 5
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 11
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH
<400> 108
Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Glu
1 5 10
<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 109

Gly Gly Gly Lys Lys Lys Glu

1 5

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 110

Gly Ser His His His His His Gly Ser Glu

1 5 10

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..4

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 6..9

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 111

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Glu

1 5 10

<210> 112

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..4

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 112

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Glu

1 5

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..3

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 113

Xaa Xaa Xaa Glu Glu Glu

1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 114

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> alpha carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 115

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu

1 5

<210

> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 116

Lys Lys Ser Ala Gly Ser Ala Gly Glu

1 5

<210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 117

Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 118

Lys Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 11

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 119

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu Glu Glu

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..6

<223> D-amino acid(s)

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 120

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu

1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 121

Glu Glu Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 122

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 124

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 125

<211>

7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C17-COOH

<400> 125

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-CH3

<400> 126

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-CH3

<400> 127

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> D-amino acid(s)

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 128

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220

><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 129

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 130

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Lys Glu

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 131

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5

<210> 132

<400> 132

000

<210> 133

<211> 20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 20

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-CH3

<400> 133

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu

20

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 20

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-CH3

<400> 134

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu

20

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 20

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-CH3

<400> 135

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu

1 5 10 15

Glu Gly Gly Gly

20

<210> 136

<211> 20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 20

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-CH3

<400> 136

Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu

20

<210> 137

<211> 27

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 27

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-COOH

<400> 137

Lys Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Pro Lys Gly

1 5 10 15

Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu

20 25

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 22

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-COOH

<400> 138

Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu Ala

1 5 10 15

Gln Lys Ala Gln Ala Glu

20

<210> 139

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223

> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 139

Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 140

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 140

Lys Lys Glu

1

<210> 141

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 141

Lys Lys Glu

1

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 142

Lys Lys Glu

1

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222
> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-CH3

<400> 143

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5

<210> 144

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-CH3

<400> 144

Lys Lys Glu

1

<210> 145

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 145

Lys Gly Pro Glu

1

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 146

Lys Gly Pro Lys Gly Pro Glu

1 5

<210> 147

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 147

Ser Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 148

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 148

Lys Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<

213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 149

Lys Gly Gly Gly Ser Glu Glu

1 5

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221

> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 150

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Glu

1 5

<210> 151

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 151

Gly Gly Gly Gly Pro Glu

1 5

<210> 152

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 152

Glu Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 153

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 153

Glu Gly Gly Gly Pro Glu

1 5

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 154

Lys Gly Pro Gly Ser Glu Glu

1 5

<210> 155

<400> 155

000

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH

<400> 156

Lys Lys Gly Gly Ser Glu

1 5

<210

> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..4

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 157

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Glu

1 5

<210> 158

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..3

<223> Sarcosine (N-methyl glycine)

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 158

Xaa Xaa Xaa Glu Glu Glu

1 5

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<400> 159

Ala Ala Ala Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 160

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220

><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 160
Ala Ala Ala Ala Ser Xaa

1 5
<210> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 161
Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5
<210> 162
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 12

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 12

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 162

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Xaa

1 5 10

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 163

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Xaa

1 5 10

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 164

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 165

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 165

Ala Ala Ser Ser Ala Xaa
1 5

<210> 166

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 166

Ala Ala Ser Xaa
1

<210> 167

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 167

Ala Gly Ala Gly Ser Xaa
1 5

<210> 168

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 168

Ala Gly Ala Gly Ser Xaa

1 5

<210> 169

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 169

Ala Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 170

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 170

Ala Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 171

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220

><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 171

Ala Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 172

Ala Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 173

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 173

Ala Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 174

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 174

Ala Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 175

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 175

Ala Ser Xaa

1

<210> 176

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 1..5

<223> joined by beta linkages

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 176

Ala Ala Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 177

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 1..4

<223> joined by beta linkages

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 177

Ala Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 178

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 1..3

<223> joined by beta linkages

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 178

Ala Ala Ser Xaa
1

<210> 179

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 1..2

<223> joined by beta linkage

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222>
3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 179

Ala Ser Xaa

1

<210> 180

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 180

Glu Gly Gly Glu Gly Gly Xaa

1 5

<210> 181

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<

220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 181

Glu Gly Gly Glu Gly Pro Xaa

1 5

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 182

Glu Gly Pro Glu Gly Pro Xaa

1 5

<210> 183

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220

><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 183

Gly Gly Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 184

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 184

Gly Gly Ala Ala Ser Xaa

1 5

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 185

Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 186

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 186

Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 187

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 187

Gly Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 188

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 188

Gly Gly Gly Ala Ser Xaa

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 189

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 190

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 190

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 191

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 191

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 192

<211> 6

<212> PRT

<213

> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 5..6

<223> joined by -PEG2-PEG2- linkage

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 192

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 193

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 193

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 194

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH having malonic acid tail

<400> 194

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 195

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH having a succinic acid tail

<400> 195

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 196

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 196

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 197

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 197

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 198

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221>

MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 198

Gly Gly Gly Gly Thr

1 5

<210> 199

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 199

Gly Gly Gly Ser Gly Xaa

1 5

<210> 200

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 200

Gly Gly Gly Ser Ser Ser Xaa

1 5

<210> 201

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 201

Gly Gly Gly Ser Ser Xaa

1 5

<210> 202

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 202

Gly Gly Gly Ser Ser Xaa

1 5

<210> 203

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 203

Gly Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 204

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 8

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 204
Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Xaa
1 5
<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES
<222> 9
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 9
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 205
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5
<210> 206
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 12

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 12

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 206

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Xaa

1 5 10

<210> 207

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 207

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa

1 5 10

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 208

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 209

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 209

Gly Gly Ser Gly Gly Xaa
1 5

<210> 210

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223
> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 210

Gly Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5

<210> 211

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 211
Gly Gly Ser Ser Gly Xaa
1 5
<210> 212
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 212
Gly Gly Ser Ser Ser Ser Xaa
1 5
<210> 213

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 213

Gly Gly Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 214

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 214

Gly Gly Ser Ser Xaa

1 5

<210> 215

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 215

Gly Gly Ser Ser Xaa

1 5

<210> 216

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220>
<221> MOD_RES
<222> 5
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 216
Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5
<210> 217
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 4
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 4
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 217
Gly Gly Ser Xaa
1

<210> 218

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222

> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 218

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Xaa

1 5

<210> 219

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 219

Gly Gly Thr Thr Thr Xaa

1 5

<210> 220

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 220

Gly Gly Thr Thr Xaa

1 5

<210> 221

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221

> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 221

Gly Ser Gly Gly Gly Xaa

1 5

<210>

222

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 222

Gly Ser Gly Gly Ser Xaa

1 5

<210> 223

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 11

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 11

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 223

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa

1 5 10

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 9

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 224

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa

1 5

<210> 225

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 225

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa

1 5

<210> 226

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 226

Gly Ser Gly Ser Gly Xaa

1 5

<210> 227

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 227

Gly Ser Gly Ser Xaa

1 5

<210

> 228

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 228

Gly Ser Pro Xaa

1

<210> 229

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 229

Gly Ser Ser Ser Ser Xaa

1 5

<210> 230

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 230

Gly Ser Ser Ser Xaa

1 5

<210> 231

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 231

Gly Ser Ser Xaa

1

<210> 232

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221>

MOD_RES

<222> 3

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 232

Gly Ser Xaa

1

<210> 233

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 233

Gly Thr Thr Thr Xaa

1 5

<210> 234

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 4
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 234
Gly Thr Thr Xaa
1
<210> 235
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES

<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,
or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 235
Lys Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5
<210> 236
<211> 7
<212
> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,
or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 236

Lys Gly Gly Lys Gly Gly Xaa
1 5

<210> 237

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 2..3

<223> joined by -PEG2-PEG2- linkage

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 237

Lys Lys Xaa

1

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 238

Lys Lys Ser

1

<210> 239

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<

223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 239

Lys Lys Ser Xaa

1

<210> 240

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 240

Lys Lys Thr

1

<210> 241

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<

223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 241

Lys Lys Thr Xaa

1

<210> 242

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a malonic acid tail

<400> 242

Lys Lys Xaa

1

<210> 243

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a succinic acid tail

<400> 243

Lys Lys Xaa

1

<210> 244

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,

or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 244
Lys Lys Xaa
1
<210> 245
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223
> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,
or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 245
Lys Pro Lys Ser Xaa
1 5
<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES
<222> 8
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,
or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 8
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 246
Lys Ser Gly Gly Gly Ser Lys Xaa
1 5
<210> 247
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta, (D)-Asp-alpha,
or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 247
Lys Ser Gly Lys Ser Gly Xaa
1 5
<210> 248

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220

><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 248

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5

<210> 249

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 249

Ser Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5

<210> 250

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 250

Ser Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5

<210> 251

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES
<222> 6
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 251
Ser Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5
<210> 252
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223
> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,
(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta
<220><221> MOD_RES
<222> 5
<223> optionally linked to a half-life extending moiety
such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH
<400> 252
Ser Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 253

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 253

Ser Gly Gly Xaa

1

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alpha, Asp-beta,

(D)-Asp-alpha, or (D)-Asp-beta

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as a fatty acid, such as C13-COOH, C14-COOH, or C15-COOH

<400> 254

Ser Gly Xaa

1

<210> 255

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222

> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 3

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 255

Gly Ser Glu

1

<210> 256

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 256

Gly Gly Ser Glu

1

<210> 257

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 4

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 257

Gly Ser Pro Glu

1

<210> 258

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 258

Glu Gly Gly Glu Gly Gly Glu

1 5

<210> 259

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> 1..2

<223> joined by gamma linkage

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C14-COOH

<400> 259

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 260

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 260

Glu Gly Gly Glu Gly Pro Glu

1 5

<210> 261

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C14-COOH

<400> 261

Glu Gly Pro Glu Gly Pro Glu

1 5

<210> 262

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222>

1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH
<400> 262
Lys Gly Gly Gly Ser Glu
1 5
<210> 263
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 8
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH
<400> 263
Lys Ser Gly Gly Gly Ser Lys Glu
1 5
<210> 264
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-COOH

<400> 264

Lys Ser Gly Lys Ser Gly Glu

1 5

<210> 265

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-COOH

<400> 265

Lys Gly Gly Lys Gly Gly Glu

1 5

<210> 266

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 5

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C15-COOH

<400> 266

Lys Pro Lys Ser Glu

1 5

<210> 267

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..6

<223> D-amino acid(s)

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH

<400> 267

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu

1 5

<210> 268

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..6

<223> 2,3-diaminopropionic acid

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 268

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu

1 5

<210> 269

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 1..6

<223> 6-N-methyllysine

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 269

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu

1 5

<210> 270

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 1..3
<223> D-amino acid(s)
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-COOH
<400> 270
Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 271
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Synthetic linker
<220><221> MOD_RES
<222> 1
<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide
<220><221> MOD_RES
<222> 7
<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C15-COOH
<400> 271
Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu
1 5
<210> 272
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C17-COOH

<400> 272

Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu

1 5

<210> 273

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222>

1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 273

Lys Lys Lys Lys Pro Glu

1 5

<210> 274

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 274

Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 275

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220

><221> MOD_RES

<222> 8

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 275

Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu

1 5

<210> 276

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 276

Lys Lys Lys Lys Pro Lys Lys Lys Lys Glu

1 5 10

<210> 277

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 10

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety

such as C13-COOH

<400> 277

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu

1 5 10

<210> 278

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a

para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> D-amino acid(s)

<220><221> MOD_RES

<222> 7

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-CH3

<400> 278

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu

1 5

<210> 279

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Synthetic linker

<220><221> MOD_RES

<222> 1

<223> optionally linked to side-chain carbonyl group of a
para-acetyl-phenylalanine residue of a modified relaxin polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> 6

<223> gamma carbon optionally linked to a half-life extending moiety
such as C13-CH3

<400> 279

Gly Gly Gly Gly Ser Glu

1 5